
RODRIGO CALIL TELES ABDO

**Análise da alfa-defensina no líquido sinovial para diagnóstico de
infecção de prótese total de joelho**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo Pécora

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca Central FMUSP

São Paulo

2021

RODRIGO CALIL TELES ABDO

**Análise da alfa-defensina no líquido sinovial para diagnóstico de
infecção de prótese total de joelho**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo Pécora

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca Central FMUSP

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Abdo, Rodrigo Calil Teles
Análise da alfa-defensina no líquido sinovial
para diagnóstico de infecção de prótese total de
joelho / Rodrigo Calil Teles Abdo. -- São Paulo,
2021.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.

Orientador: José Ricardo Pécora.

Descritores: 1.Prótese do joelho 2.Prótese
articular 3.Ensaio de imunoadsorção enzimática
4.Alfa-defensinas 5.Líquido sinovial 6.Testes
diagnósticos de rotina

USP/FM/DBD-444/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À minha esposa Julia Abdu, que me apoia em tudo que faço, e em ser essa pessoa, mãe e esposa maravilhosa, que consegue fazer 1000 coisas ao mesmo tempo com tanta eficiência. Às minhas filhas, Luiza e Olivia, que são a razão da minha vida e que nos alegram diariamente, por sua pureza, meiguice e bom coração. E ao meu filho mais velho e companheiro de todas as horas, Fred.

Aos meus pais José Calil e Regina Célia, que puderam me proporcionar uma excelente formação e me ensinaram a ser uma pessoa educada e respeitosa.

À minha irmã Tatiana, que é minha parceira e amiga, e que me aturou durante todos esses anos.

À minha afilhada/prima Nina, que tenha um futuro brilhante pela frente.

Ao todo resto da minha família, em especial ao meu avô, Melem (*in memoriam*), por sempre ter sido um grande amigo e fã meu.

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande amigo e companheiro de profissão Professor Doutor Riccardo Gomes Gobbi, chefe do Grupo do Joelho do IOT-HCFMUSP, que me apoiou, ajudou e foi fundamental nessa empreitada desde o início até hoje.

Ao Professor Doutor José Ricardo Pécora, meu orientador e ex-presidente da Sociedade Brasileira da Cirurgia do Joelho, por ser uma referência no assunto e ter me orientado com maestria.

Ao meu grande amigo Professor Doutor Marco Kawamura Demange, que me deu a oportunidade de retornar à minha faculdade e ao IOT-HCFMUSP, depois de tantos anos longe, para a realização desse sonho que acabou se tornando um projeto grandioso.

Ao Professor Doutor Gilberto Luis Camanho, Professor Titular de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da USP, referência em cirurgia do joelho, pelo apoio e elogios referentes ao nosso projeto.

À Professora Doutora Ana Lúcia Lei Munhoz Lima, a maior referência mundial em infecção osteomuscular, que participou ativamente da elaboração e execução do projeto.

À Professora Doutora Eloísa Bonfá, diretora do HCFMUSP, que foi muito importante em todas as fases do projeto, desde a fase inicial, submissões para congressos e publicações, e que nos deu a oportunidade de realizar a nossa pesquisa no laboratório que coordena.

À Doutora Sandra Pasoto, assistente da Reumatologia do IOT-HCFMUSP, que me auxiliou a desvendar muitas dúvidas técnicas que surgiram durante o projeto, e teve papel importante em várias fases do projeto.

À biomédica Elaine Leon, que participou de todo o projeto desde o início, com papel fundamental no preparo, armazenamento e na realização de todos os testes ELISAs do projeto.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Buchpiguel, Professor Titular e chefe do Centro de Medicina Nuclear do HCFMUSP, que nos deu a “ideia” e a oportunidade de realizar os exames de PET-RM nos pacientes do projeto e foi fundamental para a aprovação na FAPESP e continuidade do projeto.

Ao amigo Dr. Marcos Santos Lima, médico nuclear e radiologista, que participou comigo da realização de todos os exames de PET-RM e me ensinou tudo que eu sei sobre PET-RM.

A todos os funcionários do Centro de Medicina Nuclear do HC-FMUSP, especialmente à Ivani, à Tatiana e à Elisa, que me ajudaram muito desde o agendamento e realização da PET-RM, coleta de exame de sangue e com a punção articular, tendo um papel fundamental nesse projeto.

Ao amigo Chilan Leite, que entrou no meio do projeto e teve um papel fundamental nas publicações, apresentações recentes em congressos e na estatística.

Aos colegas assistentes e residentes do Grupo do Joelho do IOT-HCFMUSP, que me auxiliaram na captação dos casos para a realização do estudo.

Aos colegas assistentes infectologistas do IOT-HCFMUSP, que participaram da discussão dos casos do projeto.

À assistente social Olga do IOT-HCFMUSP, que me auxiliou inúmeras vezes com listas de pacientes e em contatar alguns pacientes do estudo.

Às Sras. Tânia Borges e Rosana Costa, que me auxiliaram desde o início do projeto, pelo apoio da secretaria da Pós-graduação

À ex-secretária do Grupo do Joelho do IOT-HCFMUSP Tânia Fernanda, que sempre me ajudou com a parte burocrática do projeto e foi fundamental para conseguir o apoio da FAPESP e também para as compras do kit da alfa-defensina, tendo papel determinante na realização desse projeto.

Às bibliotecárias Camila e Andressa (*in memoriam*) que me auxiliaram na edição e formatação da minha qualificação e da minha tese.

À minha banca de qualificação do doutorado, formada pelos Doutores Leandro Einsjman e Fernando Brandão, pelas sugestões e correções sugeridas, que melhoraram muito a qualidade do meu trabalho.

Além dessas pessoas que tiveram ação direta no projeto, gostaria de agradecer:

Ao meu sócio e amigo desde o primeiro dia da Faculdade, Fábio Leme Ortega, que me apoiou nesse projeto desde muito antes do início.

Ao meu amigo e colega de trabalho, Dr. Alexandre Guilherme, que me ajudou e não deixou a peteca cair no hospital que trabalhamos durante as fases mais trabalhosas do projeto.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Nomes das estruturas anatômicas baseados na Terminologia Anatômica: Terminologia Anatômica Internacional, Editora Manole, 1a ed. São Paulo, 2001.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5a edição, 2009, elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo decreto nº 6583/2008.

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	4
	2.1 Objetivo primário.....	4
	2.2 Objetivo secundário.....	4
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	5
	3.1 Epidemiologia e importância da infecção de prótese.....	5
	3.2 Diagnóstico infecção ATJ.....	7
	3.2.1 Análise sérica.....	12
	3.2.2 Análise do líquido sinovial.....	14
	3.2.2.1 Alfa-defensina.....	16
	3.2.3 Anatomia patológica.....	21
	3.2.4 Culturas.....	22
4	MÉTODOS.....	26

4.1	Desenho do estudo.....	26
4.2	Aprovação na comissão de ética em pesquisa e termo de consentimento.....	26
4.3	População estudada.....	27
4.4	Critérios de seleção.....	27
4.4.1	Critérios de inclusão.....	27
4.4.2	Critérios de exclusão.....	29
4.5	Período da seleção.....	30
4.6	Amostra selecionada.....	30
4.7	Procedimentos realizados.....	30
4.7.1	Exames séricos realizados.....	30
4.7.2	Punção articular e análise do líquido sinovial.....	31
4.7.3	Alfa-defensina.....	33
4.7.4	Cirurgia.....	39
4.8	Critérios diagnósticos.....	40
4.9	Outros dados coletados.....	43
4.10	Cálculo da Amostra.....	45
4.11	Análise estatística.....	45
4.12	Custo e financiamento do estudo.....	46
5	RESULTADOS.....	47
5.1	Características da amostra.....	47
5.2	Diagnóstico de acordo com o MSIS 2013 e ICM 2018.....	48
5.3	Alfa-defensina.....	51

5.3.1	Análise do teste inicial de padronização da diluição da amostra.....	51
5.3.2	Análise completa da alfa-defensina.....	54
5.3.2.1	Curva ROC, AUC e definição do valor de corte (<i>cutoff</i>).....	55
5.3.2.2	Análise final.....	56
5.4	Outros resultados.....	57
5.4.1	Aspecto macroscópico do líquido sinovial.....	57
5.4.2	Avaliação de outros testes isolados.....	59
6	DISCUSSÃO.....	63
7	CONCLUSÃO.....	71
8	ANEXOS.....	72
9	REFERÊNCIAS.....	90
	APÊNDICES	

ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

18F-FDG	Fluorodesoxiglicose
ATJ	Artroplastia Total de Joelho
Ac	Acurácia
AD	Alfa-defensina
AR	Artrite Reumatóide
AUC	<i>Area under the curve</i>
E	Especificidade
EBJIS	Sociedade Europeia de Infecção de Osso e Articulação
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ensaio de imunoabsorção enzimática)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDG	Fluorodesoxiglicose
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
HNP 1-3	<i>Human Neutrophil Peptides 1, 2 and 3"</i>
ICM	<i>International Consensus Meeting</i>
ICM 2018	Critérios definidos em 2018 para infecção
IL-6	Interleucina 6

IOT-HC-	Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas
FMUSP	da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LS	Líquido sinovial
MSIS	<i>Musculoskeletal Infection Society</i>
MSIS 2013	Critérios definidos em 2013 para infecção
n	Tamanho da amostra
OA	Osteoartrite
PCR	Proteína C-reativa
PCT	Procalcitonina
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PMN	Polimorfonucleares
RCP	Reação em Cadeia da Polimerase
RM	Ressonância Magnética
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
S	Sensibilidade
SSID	Sociedade Suíça de Doenças Infecciosas
SSO	Sociedade Suíça de Ortopedia
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TMB	Tetrametilbenzidina
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem de radioluscência na interface do componente tibial da prótese com o planalto tibial medial, caracterizando uma área de lise (erosão).....	29
Figura 2 – A. Tubo com tampa roxa com EDTA, B. Tubo seco estéril.....	33
Figura 3 – Caixa do kit Elisa da alfa-defensina mostrando os reagentes e a placa com os poços de microtitulação.....	34
Figura 4 – Colocação de TMB nos poços durante processo de dosagem da alfa-defensina.....	36
Figura 5 – Visão geral da sequência de etapas da análise da alfa-defensina em foto retirada e traduzida do manual do kit Elisa da alfa-defensina (HNP 1-3) da empresa Hycult Biotech® (Uden, Holanda).....	37
Figura 6 – Espectrofotômetro utilizado para medir a densitometria óptica da alfa-defensina.....	38
Figura 7 – A. Líquido sinovial aspecto normal. B. Líquido sinovial aspecto hemático. C. Líquido sinovial aspecto purulento. D. Líquido sinovial aspecto misto (indeterminado). E. Líquido sinovial aspecto misto (indeterminado).....	44
Figura 8 – Resultados da concentração de alfa-defensina (mg/L) de acordo com a diluição (1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:5000). As amostras 1 a 5 referem-se a casos com infecção e as	

amostras 6 a 10 referem-se a casos sem infecção (casos assépticos).....	53
Figura 9 – Resultados dos valores de alfa-defensina do líquido sinovial dos 40 pacientes nas diluições 1:1000 e 1:5000.....	54
Figura 10 – Curva ROC dos 40 pacientes nas diluições 1:1000 e 1:5000.....	55
Figura 11 – Gráficos mostrando a distribuição dos valores observados nos pacientes sem infecção e com infecção de acordo com o MSIS 2013 ⁶ do VHS (mm/hr), do PCR (mg/L), da contagem de leucócitos (células/ μ l) e % de PMN. As linhas vermelhas indicam os valores de corte do VHS, PCR, contagem de leucócitos e da % de PMN de 80% (MSIS 2013 ⁶) e a linha verde indica os valores de corte da % de PMN de 70% (ICM 2018 ¹¹).....	61
Figura 12 – Gráfico mostrando a distribuição das concentrações da alfa-defensina nos pacientes sem infecção e com infecção de acordo com o MSIS 2013 ⁶ . A linha vermelha indica o valor de corte da amostra estudada de 5,2 mg/L.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios maiores e menores da definição de infecção crônica periprotética - MSIS 2013 ⁶	40
Tabela 2 – Critérios maiores para definição de infecção crônica periprotética - MSIS 2018 ¹¹	41
Tabela 3 – Critérios menores e as suas pontuações para definição de infecção crônica periprotética - MSIS 2018 ¹¹	42
Tabela 4 – Perfil demográfico da amostra.....	48
Tabela 5 – Informações dos pacientes estudados de acordo com a classificação pelo critério de infecção MSIS 2013 ⁶	50
Tabela 6 – Mediana e variação dos valores da alfa-defensina (em mg/L) dos 10 casos iniciais (5 do grupo infectado e 5 do grupo asséptico) em várias diluições.....	52
Tabela 7 – Mediana e variação dos valores de alfa-defensina no líquido sinovial (em mg/L) dos 40 pacientes.....	54
Tabela 8 – Mediana e variação dos valores de alfa-defensina no líquido sinovial (em mg/L) de todos os pacientes.....	57
Tabela 9 – Testes laboratoriais analisados individualmente.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição do aspecto líquido sinovial em pacientes sem infecção (MSIS 2013).....	58
Gráfico 2 – Distribuição do aspecto líquido sinovial em pacientes com infecção (MSIS 2013).....	58

RESUMO

Abdo RCT. *Análise da alfa-defensina no líquido sinovial para diagnóstico de infecção de prótese total de joelho* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021

INTRODUÇÃO: A Artroplastia Total de Joelho é uma cirurgia realizada em casos avançados de osteoartrite do joelho. Com o envelhecimento da população, o número de artroplastias vem crescendo e, consequentemente, o número de complicações também. Dentre as complicações, a infecção periprotética é a que traz os maiores desafios. Atualmente, não existe método padrão "ouro" para o diagnóstico de infecção periprotética. Um critério bastante utilizado é o proposto pela Sociedade de Infecção Musculoesquelética em 2013 e atualizado em 2018, durante o *International Consensus Meeting* (Encontro Internacional do Consenso). A alfa-defensina é um biomarcador que tem sido bastante estudada no líquido sinovial para o diagnóstico de infecção periprotética com ótimos resultados, porém existe pouca experiência nacional com a utilização desse peptídeo. **OBJETIVO:** O objetivo principal deste estudo foi avaliar a sensibilidade e especificidade da alfa-defensina laboratorial para o diagnóstico de infecção de artroplastia total de joelho de acordo com o critério da Sociedade de Infecção Musculoesquelética em 2013 em pacientes com suspeita de infecção de artroplastia total de joelho. Como objetivos secundários, descrever a técnica da análise da alfa-defensina quantitativa no líquido sinovial, avaliando a potencial influência da diluição, a definição do valor de corte da alfa-defensina para o diagnóstico de infecção periprotética de joelho e comparar os resultados obtidos com o novo consenso, proposto em 2018. **MÉTODOS:** Cinquenta e três amostras de líquido sinovial de pacientes com suspeita de infecção periprotética no joelho foram obtidas. Inicialmente, dez amostras de líquido sinovial, sendo cinco com infecção e 5 sem infecção, foram avaliadas para análise quantitativa de alfa-defensina utilizando pelo método *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática).

Diferentes razões de diluição (1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:5000) foram testadas. As diluições com melhor desempenho foram aplicadas e comparadas nas demais amostras. **RESULTADOS:** Dessas amostras, 22 pacientes apresentaram infecção de prótese e 31 pacientes foram considerados assépticos de acordo com o consenso de 2013. Para os casos de infecção, um aumento gradual na diluição da amostra levou a um aumento do nível de alfa-defensina. O mesmo não foi observado nos casos assépticos. As diluições 1:1000 e 1:5000 apresentaram resultados satisfatórios na diferenciação de casos infectados e assépticos, e então, foram analisados mais casos nessas diluições. A diluição 1:1000 resultou em uma sensibilidade de 88,2% e especificidade de 95,7%, enquanto a diluição 1:5000 apresentou uma sensibilidade de 94,1% e uma especificidade de 100%. Após esses resultados preliminares, as 13 amostras restantes foram testadas na diluição 1:5000 onde foram obtidas uma sensibilidade final de 95,5% e uma especificidade de 100%. Esses mesmos resultados foram obtidos quando se utilizou o consenso de 2018. Foi obtido um valor de corte de 5,2mg/L para a diluição 1:5000. **CONCLUSÃO:** A alfa-defensina apresentou uma excelente acurácia para o diagnóstico de infecção periprotética no joelho. Além disso, a diluição do fluido articular teve uma influência importante no desempenho diagnóstico utilizando o método *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* de alfa-defensina sendo a diluição de 1:5000 a que apresentou o melhor desempenho para o diagnóstico de infecção periprotética no joelho, obtendo um valor de corte de 5,2 mg/L.

Descritores: Prótese de joelho, Prótese Articular, Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, Alfa-defensinas, Líquido sinovial, Testes diagnósticos de rotina

ABSTRACT

Abdo, RCT. *Analysis of alpha-defensin in synovial fluid for diagnosis of PJI at the knee*. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

INTRODUCTION: Total knee arthroplasty is a surgery performed in advanced cases of knee osteoarthritis. With the aging of the population, the number of knees arthroplasties has been growing and, consequently, the number of complications as well. Among the complications, periprosthetic joint infection is presents the greatest challenges. Currently, there is no "gold" standard method for diagnosing periprosthetic joint infection. A widely used criterion is that proposed by the Musculoskeletal Infection Society in 2013 and updated in 2018, during the International Consensus Meeting. Alpha-defensin is a biomarker that has been extensively studied in synovial fluid for the diagnosis of PJI with excellent results, but there is little national experience with the use of this peptide.

OBJECTIVE: The main objective of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of laboratory alpha-defensin for the diagnosis of TKA infection according to 2013 criteria. As secondary objectives, to describe the technique of analysis of quantitative alpha-defensin in synovial fluid, evaluating the potential influence of dilution, to define the alpha-defensin cutoff value for the diagnosis of PJI at the knee and to compare the results obtained with the new consensus in 2018. **METHODS:** Fifty-three samples of synovial fluid from patients with suspected knee periprosthetic joint infection were obtained. Initially, ten synovial fluid samples, five with periprosthetic joint infection and five without infection, were evaluated for quantitative alpha-defensin analysis by the Enzyme Linked Immunosorbent Assay method. Different dilution ratios (1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 and 1:5000) were tested. The dilutions with the best performance were applied and compared in the other samples. **RESULTS:** Of these samples, twenty-two patients had prosthesis infection and thirty-one patients were considered aseptic according to 2013 criteria. For cases of periprosthetic joint

infection, a gradual increase in sample dilution led to an increase in the level of alpha-defensin. The same was not observed in aseptic cases. Dilutions 1:1000 and 1:5000 showed satisfactory results in differentiating infected and aseptic cases, and further analysis were performed on 40 samples available so far. The 1:1000 dilution resulted in a sensitivity of 88.2% and a specificity of 95.7% while the 1:5000 dilution showed a sensitivity of 94.1% and a specificity of 100%. After these preliminary results, as 13 remaining were tested in the 1:5000 dilution a final sensitivity of 95.5% and a specificity of 100% was found. These same results were obtained when the 2018 criteria were used. A cut-off value of 5.2 mg / L was obtained for the 1:5000 dilution. **CONCLUSION:** Alpha-defensin showed an excellent accuracy for the diagnosis of periprosthetic joint infection in the knee. In addition, the dilution of the joint fluid had an important influence on the diagnostic performance of the alpha-defensin Enzyme Linked Immunosorbent Assay method, with the dilution of 1: 5000 being the one that presented the best performance for the diagnosis of periprosthetic joint infection in the knee, obtaining a cut-off value of 5,2 mg/L.

Descriptors: Knee Prosthesis, Joint Prosthesis, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Alpha-defensins, Synovial Fluid, Diagnostic Tests

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A artroplastia total de joelho (ATJ) é uma cirurgia realizada em casos avançados de osteoartrite do joelho que tem como objetivos melhora da dor e da função da articulação, melhorando assim a qualidade de vida do paciente. Com o envelhecimento da população, indicação mais precoce do procedimento e devido aos ótimos resultados do procedimento, o número de artroplastias primárias vem crescendo e, como consequência, aumenta também o número de complicações. Em 2017, era estimado a realização de 60 a 70 mil ATJs por ano no Brasil¹. Já nos EUA, em um estudo onde foi utilizada uma projeção conservadora, Inacio et al estimaram um aumento de 143% no número de ATJs nos EUA, com a realização de 725 ATJs por 100.000 habitantes².

Dentre as complicações, um dos maiores desafios para os ortopedistas e infectologistas é a infecção periprotética (IPP), que ocorre em 1-2 % das próteses primárias e 3-5% das revisões³. A IPP pode gerar sérios problemas de saúde na vida do paciente, como a artrodese do joelho, amputação do membro e até mesmo a morte⁴. Além do impacto para a saúde do paciente, a IPP causa um grande impacto financeiro na saúde do país. Em uma publicação de 2012, Kurtz et al. estimaram algo em torno de 60 a 70 mil próteses infectadas nos EUA em 2020, com o custo decorrente desses casos superando 1 bilhão de dólares por ano em 2020⁵.

O diagnóstico da IPP muitas vezes é complexo e impreciso. Em muitos casos, o único sintoma disponível é a dor. Além disso, as taxas de infecção possivelmente seriam maiores se houvesse algum método de diagnóstico com

melhor acurácia e eficácia do que os métodos disponíveis. Atualmente, não existe consenso para o diagnóstico de infecção de prótese. Um método bastante utilizado é o proposto pela Sociedade Internacional de Infecção Periprotética em 2013 (MSIS)⁶. Esse critério se baseia em uma análise em conjunto de exames séricos inflamatórios e da análise do líquido sinovial, porém todos inespecíficos para IPP, com exceção da presença de fístula articular e de duas culturas positivas do mesmo agente, que são confirmatórias para o diagnóstico de IPP⁶.

Muitas vezes, o diagnóstico de infecção de prótese é feito apenas durante o ato operatório ou no pós-operatório, sendo importante buscar algum método pré-operatório e com boa acurácia como parte do planejamento cirúrgico, visto que a cirurgia de revisão de prótese muda em casos sépticos e assépticos, podendo acarretar grandes problemas para o paciente se houver um diagnóstico inadequado.

Devido a essa falta de consenso e dessa dificuldade diagnóstica, alguns autores têm buscado novas opções diagnósticas para IPP. Na última década, alguns biomarcadores no líquido sinovial têm sido estudados para auxiliar esse diagnóstico. Dentre eles, alguns apresentaram uma sensibilidade e especificidade maior que 95%, como a alfa-defensina, elastase neutrofílica 2 (ELA- 2), lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), proteína de aumento da permeabilidade bactericida (BPI) e lactoferrina⁷.

Dentre esses marcadores, o que mais ganhou destaque foi a alfa-defensina, que é um peptídeo antimicrobiano que atua no apoio da resposta inata imune do hospedeiro à invasão do patógeno⁸. A consequência dessa resposta inata é a liberação de peptídeos como a alfa-defensina⁹. Esse peptídeo interage com a membrana celular do patógeno, causando sua despolarização e

morte. Deirmengian et al demonstraram em um outro estudo que a utilização do alfa-defensina isolada apresenta uma sensibilidade de 97,3% e uma especificidade de 95,5% mesmo na presença de doença inflamatória e na vigência do uso de antibiótico¹⁰. Alguns autores pelo mundo têm estudado o comportamento da alfa-defensina no diagnóstico de infecção de prótese com resultados promissores, porém não está ainda totalmente definido o seu papel. Apesar da sua importância crescente no diagnóstico de infecção de prótese, ainda não existe experiência nacional em literatura com o uso desse peptídeo. Isso se deve pela dificuldade técnica da sua análise e pelo seu custo elevado. No novo consenso proposto durante o *International Consensus Meeting* em 2018 (ICM 2018)¹¹, a alfa-defensina foi incluída como um dos critérios menores, mostrando assim a sua importância como auxílio no diagnóstico de IPP, demonstrando uma necessidade em se realizar pesquisas para entender o comportamento desse peptídeo.

OBJETIVOS

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo primário

Avaliar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da alfa-defensina no líquido sinovial de joelhos para o diagnóstico de infecção de prótese total de joelho de acordo com o critério MSIS 2013.

2.2 Objetivo secundário

- a) descrever a técnica da análise da alfa-defensina quantitativa no líquido sinovial de pacientes com suspeita de infecção de prótese total de joelho, avaliando a potencial influência da diluição das amostras;
- b) obter o valor de corte da alfa-defensina para o diagnóstico de infecção de prótese total de joelho;
- c) comparar os resultados obtidos com o novo consenso ICM 2018 de diagnóstico de infecção de prótese.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Epidemiologia e importância da infecção de prótese

Mariani et al.¹² (1998) realizam uma revisão onde relatam a prevalência de 5 a 10% de desconforto da ATJ, sinalizando uma possível falência do implante, boa parte causada pela presença de bactérias, compatível com uma IPP.

Kurtz et al.¹³ (2011) publicam um artigo que coleta dados de 18 países desenvolvidos, obtidos de banco de dados de internações e de registros publicados, totalizando uma população total de 755 milhões de pessoas, com uma estimativa de realização de 1,324 milhão de artroplastias primária e de revisão.

Maradit Kremers et al.¹⁴ (2015) estudam a estimativa da prevalência de artroplastias nos EUA no ano de 2010, baseados em dados de incidência histórica da Pesquisa Nacional de Alta Hospitalar e dos Bancos de Dado Estaduais de 1969 a 2010, com censo populacional geral e contagem de mortalidade, e estimam que 0,83% da população vive com prótese de quadril e 1,52% com prótese de joelho, algo em torno de 7 milhões de pessoas.

Inacio et al.² (2017) publicam um estudo utilizando uma abordagem de projeção conservadora utilizando regressão logística estimando um aumento de 69% no número de próteses total de joelho, indo de 429 próteses por 100.000 habitantes em 2012 para 725/100.000 em 2050 no Estados Unidos.

Sadigursky et al.¹ (2017) em uma revisão estimam a realização de 60 a 70 mil ATJs por ano no Brasil, porém sem base de dados confiáveis.

Ferreira et al.¹⁵ (2018) analisam o número de autorizações de internação hospitalar para cirurgias de artroplastia total de joelho e de quadril no Brasil, entre os anos de 2008 e 2015, e o correlaciona com aspectos demográficos e epidemiológicos regionais e observa uma média de 4,00 ATJ/100 mil habitantes e 8,01 ATQ/100 mil habitantes, apresentando taxas mais elevadas nas regiões sul e sudeste.

Blom et al.³ (2004) publicam um artigo onde acompanham 931 artroplastias primárias de joelho e 69 revisões por um período de 6,5 anos encontrando 9 pacientes infectados com ATJ primária (1%) e 4 pacientes com prótese de revisão com infecção (5,8%).

Pulido et al.¹⁶ (2008) revisam dados coletados prospectivamente de 9245 pacientes submetidos à prótese primária de joelho ou quadril entre janeiro de 2001 e julho de 2006 e obtém uma taxa de infecção de 0,7%, sendo a maioria (67%) no primeiro ano pós-operatório.

Cochran et al.¹⁷ (2016) identificam 1.493.924 pacientes com prótese de joelho nos EUA entre pela base de dados do sistema de saúde entre 1º de outubro de 2005 e 31 de dezembro de 2011 e, de acordo com o código internacional de doenças, encontram 16.622 pacientes com infecção de ATJ, equivalente a 1,1%.

Mortazavi et al.¹⁸ (2010) revisam retrospectivamente 476 joelhos com 499 revisões realizadas entre março de 1998 e dezembro de 2005 e encontram 44 casos (9%) com infecção profunda, sendo a maior parte em pacientes submetidos a revisão para infecção do que em revisões assépticas.

Kurtz et al.⁵ (2012) publicam um artigo com uma estimativa de 60 a 70 mil casos de próteses infectadas nos EUA em 2020, com o custo decorrente desses casos superando 1 bilhão de dólares por ano em 2020, causando grande impacto na saúde pública no país.

Além do impacto financeiro, a infecção de prótese de joelho pode levar a sérios problemas à saúde do paciente como artrodese do joelho, amputação do membro e até mesmo a morte. Son et al.⁴ (2017) realizam um estudo de coorte utilizando o Medicare Inpatient Claims Database nos EUA e mostram uma taxa de 4% de amputação e 3% de artrodese entre os pacientes com IPP. E mostrou também um aumento de 28% no risco de mortalidade dos pacientes que foram amputados e não houve alteração do risco de mortalidade nos pacientes que foram submetidos à artrodese.

3.2 Diagnóstico infecção ATJ

Cuckler et al.¹⁹ (1991) publicam um artigo demonstrando a dificuldade diagnóstica de IPP, atingindo uma acurácia de 80% pré-operatória utilizando a cintilografia com 111 Indium, a velocidade de hemossedimentação (VHS) e a aspiração articular pré-operatória, dando importância a uma abordagem cirúrgica de revisão prudente com a possibilidade de uma IPP subclínica ser a causa da falha do implante.

Spangehl et al.²⁰ (1999) realizam uma análise prospectiva com 202 revisões de quadris em 178 pacientes das investigações diagnósticas pré-operatórias e intraoperatórias e concluem que o diagnóstico é de difícil

confirmação tanto pela variabilidade dos sintomas como pela falta de consenso sobre os critérios diagnósticos como testes séricos laboratoriais, punção articular e da biópsia por congelação e sugerem uma combinação desses critérios como diretrizes para esse diagnóstico.

Parvizi et al.²¹ (2006) conduzem 3 estudos separados de uma coorte ampla e utilizam: 1) análise do líquido sinovial, incluindo contagem de células e diferenciais; 2) modalidades intraoperatórias incluindo culturas, coloração de Gram, impressão do cirurgião e biópsia de congelação; e 3) FDG-PET scan. E para o diagnóstico de infecção de prótese como comparação utilizam os valores da Proteína C-reativa (PCR) e do VHS, culturas do líquido sinovial e intraoperatória e o aspecto purulento intraoperatório e chegam à conclusão que alguns testes séricos, incluindo o VHS e PCR, são excelentes para o screening de infecção. E eles podem ser suplementados com culturas do aspirado articular e a contagem de leucócitos e os diferenciais para confirmar o diagnóstico de infecção.

Schinsky et al.²² (2008) avaliam 235 ATQs consecutivas e utilizam um algoritmo para definir infecção e os casos tratados com reoperação. Como critérios para infecção utiliza, a presença de 2 dos 3 critérios: cultura positiva intraoperatória, purulência macroscópica no momento da reoperação e achados histopatológicos positivos. Acabam concluindo que a contagem de leucócitos acima de 3000 células/ μ L é o teste Peri operatório mais indicativo para determinar a presença de infecção, quando combinado com um valor de VHS e PCR elevados pré-operatórios.

Parvizi et al.²³ (2008) realizam uma coorte retrospectiva com 889 pacientes que foram submetidos à revisão de ATJ de 3 grandes centros e

diagnosticados como infecção de prótese se: 1) presença de abscesso ou fístula; 2) cultura positiva pré-operatória de meio sólido; ou 3) 2 ou mais culturas intraoperatórias positivas ou uma cultura de meio sólido positiva associada à presença de pus intracapsular ou histologia anormal. Concluem que culturas intraoperatórias não devem ser usadas como padrão "ouro" para infecção de prótese devido às altas porcentagens de casos falso-negativos e falso-positivos. E quando combinada com o julgamento clínico, a contagem total de leucócitos e a porcentagem de neutrófilos no líquido sinovial reflete com mais precisão a infecção. E além disso, quando combinada com exames séricos, exclui ou confirma com segurança a infecção.

Parvizi et al.²⁴ (2011) publicam um estudo retrospectivo de 192 pacientes que foram submetidos à revisão de ATJ e tiveram um análise do líquido sinovial anteriormente e aplicam 6 critérios previamente publicados para infecção de prótese para determinar a variação em sua incidência utilizando cada conjunto de critério. Em seguida, comparam esses critérios diagnósticos com critérios novos próprios que são baseados em um fluxograma e contém: 1) presença de fístula; 2) pus intraoperatório; 3) cultura positiva; 4) 3 desses outros critérios (aumento do VHS, PCR, PMN e leucócitos) e chegam à conclusão que há uma discrepância entre as definições de infecção e isso dificulta a interpretação da literatura e o tratamento de ATJ com infecção e sugerem o estabelecimento de um conjunto comum de critérios diagnósticos com base na aspiração articular para melhorar o tratamento da infecção e facilitar a interpretação da literatura.

Parvizi et al.²⁵ (2011) participam de um grupo de trabalho com a Sociedade de Infecção Musculoesquelética (MSIS) em 2011 e propõem uma nova definição de Infecção periprotética que será considerado infecção se 1)

presença de fístula ou 2) presença de 2 culturas positivas do mesmo patógeno ou 3) presença de 4 de 6 critérios: a) aumento do PCR e VHS sérico, b) aumento do número de leucócitos no LS, c) aumento da %PMN, d) presença de pus na articulação, e) 1 cultura positiva ou F) mais que 5 neutrófilos por campo em 5 campos na análise histológica com aumento de 400 vezes.

Osmon et al.²⁶ (2013) publicam um guideline da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) para o diagnóstico e conduta nos casos de infecção de prótese e como critérios diagnósticos utilizam a presença de 1 ou mais dos seguintes critérios: 1) presença de fístula; 2) presença de pus ao redor da prótese sem outra etiologia presente; 3) inflamação aguda encontrada na análise histológica do tecido periprotético e 4) a presença de 2 ou mais culturas positivas com o mesmo organismo.

Ainda em 2013, um grupo grande de experts se reúne na Filadélfia no Encontro do Consenso Internacional em Infecção de Prótese (*International Consensus Meeting on PJI*) e então, Parvizi e Gehrke.⁶ (2014) propõem algumas discretas alterações no critério da MSIS 2011, como a inclusão do teste da Esterase Leucocitária como critério menor para o diagnóstico de infecção de prótese.

Ochner et al.²⁷ (2014) publicam um livro proposto pela Sociedade Suíça de Ortopedia (SSO) e pela Sociedade Suíça de Doenças Infecciosas (SSID) e que já são utilizados por diversos estudos com critérios para definir infecção que são baseados na presença de 1 ou mais dos seguintes achados: 1) presença de pus em volta da prótese ou fístula; 2) aumento da contagem de leucócitos; 3) histologia positiva ou 4) crescimento microrganismo no líquido sinovial, tecido periprotético ou na cultura com sonicação. Em setembro de 2017, esses critérios

são utilizados pela Sociedade Europeia de Infecção de Osso e Articulação (EBJIS) como critérios de definição de infecção de prótese.

Renz et al.²⁸ (2018) publicam um estudo comparando os métodos diagnósticos do MSIS 2014, IDSA e EBJIS com a utilização da análise qualitativa da alfa-defensina e encontram uma grande diferença nos diagnósticos entre os grupos, principalmente do critério da EBJIS com os outros 2.

Parvizi et al.²⁹ (2018) propõem um novo critério separando achados definidores de infecção como a presença de fístula ou 2 culturas do mesmo agente, achados pré-operatórios que se baseiam em uma pontuação para cada critério incluindo aqui a alfa-defensina como novo critério, e caso ainda o diagnóstico seja inconclusivo, são utilizados critérios intra-operatórios como culturas e anatomia patológica.

E, ainda em 2018, Shohat et al.¹¹ em nova reunião do grupo no Encontro do Consenso Internacional (*International Consensus Meeting on PJI*), realizam pequenas alterações nesse novo critério, mantendo os achados definidores de infecção como a presença de fístula ou 2 culturas positivas do mesmo agente, porém unificam os critérios pré-operatórios e pós-operatórios em um sistema de pontuação unificado, mantendo as 3 possibilidades diagnósticas, sendo: asséptica, se a soma for menor que 3 pontos; inconclusiva se a soma for entre 3 e 5 pontos; e infectada, se a soma for maior ou igual a 6 pontos.

E ainda mais recente, McNally et al.³⁰ (2021) publicam um artigo com o resultado de um projeto desenvolvido pela Sociedade Europeia de Infecção de Osso e Articulação (EBJIS), e apoiado pela MSIS e pelo Grupo de Estudo da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas, onde realizam uma revisão abrangente da literatura, discussão aberta com membros

das sociedades e especialistas, onde concluem que a definição de infecção de prótese apresenta uma nova abordagem de três níveis para o diagnóstico, com base na evidência mais robusta, que será útil para os médicos na prática diária.

3.2.1 Análise sérica

Na presença de um paciente com suspeita de infecção de ATJ, os marcadores séricos são muito importantes para auxiliar no diagnóstico. Embora não exista nenhum teste específico para infecção de ATJ, eles fazem parte da avaliação inicial de todo o paciente com alguma suspeita de infecção. A grande vantagem dos marcadores séricos é que eles são relativamente baratos e pouco invasivos, além de apresentarem uma alta sensibilidade.

Bilgen et al.³¹ (2001) avaliam as alterações nos níveis do PCR e do VHS em pacientes com osteoartrite primária que foram submetidos à artroplastia. Eles demonstram que o PCR sobe rapidamente no pós-operatório, atingindo o seu pico no segundo dia, e vai caindo gradualmente até níveis pré-operatórios no vigésimo primeiro dia em ATQ e no final do segundo mês em ATJ. O VHS atinge o seu pico no quinto dia após a cirurgia, caindo gradualmente e chegando perto de níveis pré operatórios no final do terceiro mês em ATQ e no final no nono mês em ATJ.

Shahi et al.³² (2017) demonstram que o VHS não é um bom marcador para infecção aguda pois pode demorar até 6 semanas para voltar aos níveis pré-operatórios.

Alijanipour et al.³³ (2013) revisam retrospectivamente 1962 pacientes que foram submetidos a revisão de artroplastia sendo 1095 quadris e 594 joelhos por falha asséptica e 108 quadris e 165 joelhos com infecção de acordo com os critérios MSIS 2013. Encontram os níveis de VHS e PCR na infecção crônica tardia maior nos joelhos que nos quadris. Além disso, encontram limiares semelhantes de VHS nos joelhos e quadris (46,5 e 48,5 mm/hr, respectivamente) e diferentes de PCR nos joelhos e quadris (23,5 e 13,5 mg/L respectivamente), sugerindo diferentes valores dos níveis do PCR no diagnóstico de infecção de prótese de joelho e quadril.

Berbari et al.³⁴ (2010) publicam uma metanálise que inclui 3909 revisões de artroplastias totais de quadril ou joelho. A prevalência de infecção articular protética é de 32,5% (1270). A precisão dos marcadores de inflamação avaliados é de 314,7 pg/mL para interleucina-6 em 3 estudos, 13,1 mg/L para o PCR em 23 estudos e 7,2 mm/hr para o VHS em 25 estudos. Com esses resultados, observam que a acurácia diagnóstica da infecção da articulação periprotética é melhor para a interleucina-6, seguida pelo PCR e depois, o VHS.

Greidanus et al.³⁵ (2007) realizam um estudo prospectivo onde avaliam 151 joelhos com revisão de ATJ e são avaliados prospectivamente quanto à presença de infecção com a medida VHS e do PCR. Os resultados mostram um critério de positividade ótima do VHS de 22,5 mm/h e de 13,5 mg/L para o nível do PCR. Tanto o VHS (sensibilidade 93%; especificidade 83%; razão de verossimilhança positiva, 5,81; precisão, 0,86) e o PCR (Sensibilidade 91%; especificidade, 86%; razão de verossimilhança positiva, 6,89; precisão, 0,88) têm o desempenho excelente do teste diagnóstico. Quando utilizados em conjunto, com a elevação do VHS e do PCR, obtém-se uma sensibilidade de

95%, especificidade de 93% e valor preditivo negativo de 97%, sendo considerados como bons marcadores para a investigação inicial.

Bottner et al.³⁶ (2007) realizam um estudo prospectivo que avalia o papel de novos marcadores laboratoriais no diagnóstico de infecção de prótese de 78 pacientes, sendo 21 sépticas de acordo com as culturas intraoperatórias. De acordo com a curva ROC, o valor de corte do PCR é de 3,2 md/dl, da interleucina-6 de 12 pg/ml ambos com uma sensibilidade de 95%, porém a IL-6 com menor especificidade que a PCR (0,87 vs 0,96). A combinação de proteína C-reativa e interleucina-6 identifica todos os pacientes com infecção de prótese. A procalcitonina (> 0,3 ng/ml) e o TNF-alfa (> 40 ng/ml) obtém resultados muito específicos (0,98 vs 0,94), mas com uma baixa sensibilidade (0,33 vs 0,43).

3.2.2 Análise do líquido sinovial

A punção articular é uma das mais importantes ferramentas no diagnóstico de infecção de prótese sendo recomendada em praticamente todos os casos de suspeita de infecção de ATJ. A maioria dos autores concordam que na suspeita clínica de infecção, com os testes inflamatórios elevados (PCR e VHS), a punção articular deva ser realizada³⁷. O objetivo da punção é a obtenção do líquido sinovial da articulação suspeita e realizar testes de cultura, contagem de células e diferenciais, além da observação da presença de pus.

Trampuz et al.³⁸ (2004) realizam um estudo prospectivo com 133 pacientes, sendo 99 pacientes com soltura asséptica e 34 pacientes com infecção periprotética, nos quais amostras de líquido sinovial foram coletadas

antes da revisão da artroplastia total do joelho, excluindo pacientes com doença inflamatória. A contagem de leucócitos do líquido sinovial apresenta valores significativamente maior em pacientes com infecção da articulação protética (18900 células/ μ L, intervalo de 300 a 178000 células/ μ L) do que naqueles com insuficiência asséptica (300 células/ μ L, intervalo de 100 a 16000 células/ μ L), com uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 88% para o diagnóstico de infecção periprotética. quando o diferencial de neutrófilos é acima de 65%, obtém-se uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 98%.

Ghanem et al.³⁹ (2008) analisaram o líquido sinovial de 429 joelhos submetidos à revisão de ATJ em 3 instituições acadêmicas, sendo 161 joelhos infectados e 268 joelhos assépticos. Os valores de corte foram definidos em 1100 leucócitos/ml e d 64% de PMN. Quando ambos os testes apresentaram resultados abaixo de seus valores de corte, o valor preditivo negativo da combinação aumentou para 98,2%, enquanto quando ambos os testes apresentaram resultados maiores que seus valores de corte, a infecção foi confirmada em 98,6% dos casos nessa coorte.

Christensen et al.⁴⁰ (2013), em um estudo multicêntrico com 571 pacientes, avaliam a progressão natural da contagem de leucócitos, porcentagem de polimorfonucleares e a contagem total de neutrófilos no líquido sinovial em pacientes sem evidências de infecção periprotética e submetidos à aspiração articular e observam que a contagem de leucócitos do líquido sinovial e a porcentagem de PMN mudaram em taxas diferentes ao longo dos primeiros dois anos após a artroplastia total do joelho, com a contagem de leucócitos exibindo uma diminuição inicialmente mais rápida e a porcentagem de PMN demonstrando uma redução mais linear. Sendo assim, a contagem total de

neutrófilos, que combina esses dois parâmetros, pode fornecer um método melhor para identificar pacientes com infecção periprotética da articulação.

Dinneen et al.⁴¹ (2013) avaliam 75 pacientes submetidos à revisão de ATJ e ATQ por suspeita de infecção da articulação protética com análise do líquido sinovial e amostras de tecido periprotético para exame histológico e microbiológico. O valor de corte ideal para o diagnóstico de infecção de prótese de joelho e de quadril obtido é de 1590 leucócitos/ μ L e 65% de neutrófilos.

Parvizi et al.⁴² (2011) publicam uma pesquisa com 108 joelhos sendo 30 infectados e 78 sem infecção onde testam a presença da esterase leucocitária com o uso da tira colorimétrica simples. A mudança de cor (graduada como negativa, traço, + ou ++), que correspondia ao nível da enzima, é observada após um ou dois minutos. Quando apenas a leitura de ++ é considerada positiva, o teste da esterase leucocitária obtém sensibilidade de 80,6% e especificidade de 100%, com um valor preditivo positivo de 100% e um valor preditivo negativo de 93,3%.

3.2.2.1 Alfa-defensina

Ganz et al.⁸ (1985) publicam um trabalho descrevendo a descoberta de 3 peptídeos antibióticos pequenos e sendo denominados de HNP 1-3 e referidos como defensinas.

Desde a descoberta da alfa-defensina, ela não foi utilizada na ortopedia, sendo estudada em outras patologias. Mizukawa et al.⁴³ (2001) realizam um estudo com o objetivo de demonstrar a localização e distribuição imunohistoquímica de alfa e beta-defensinas humanas em tecido de carcinoma

mucoepidermóide oral e observam que as células cancerosas que constituem os ductos, assim como os neutrófilos, foram positivamente imunocoradas com o anticorpo anti-alfa-defensina. Ayabe et al.⁴⁴ (2004) publicam uma revisão demonstrando o papel das células de Paneth e dos seus peptídeos antimicrobianos, dentre eles a alfa-defensina, na defesa inata do hospedeiro.

Deirmengian et al.⁷ (2014) avaliam as características diagnósticas de 16 biomarcadores no líquido sinovial promissores para o diagnóstico de IPP de 95 pacientes, sendo 29 infecções e 66 assépticos, mesmo com uso de antibiótico ou presença de doença inflamatória. Cinco biomarcadores, incluindo alfa-defensina humana 1-3, elastase neutrofílica 2, proteína de aumento da permeabilidade bactericida, lipocalina associada à gelatinase neutrofílica e lactoferrina, preveem corretamente a classificação MSIS de todos os pacientes deste estudo, com 100% de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de infecção de prótese.

Parvizi e al.¹⁰ (2014) colaboradores demonstram em um outro estudo que a utilização da alfa-defensina isolada apresenta uma sensibilidade de 97,3% e uma especificidade de 95,5% mesmo na presença de doença inflamatória e na vigência do uso de antibiótico. E quando associada ao PCR sinovial com limiar de 3 mg/L, demonstram uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 100%.

Deirmengian et al.⁴⁵ (2015) comparam os valores do ELISA da alfa-defensina sinovial com a tira colorimétrica da esterase leucocitária em 46 pacientes, sendo 23 com infecção e 23 sem infecção de acordo com os critérios do MSIS. A alfa-defensina apresentou uma sensibilidade e especificidade de 100% para o diagnóstico de infecção. A esterase leucocitária não pôde ser

interpretada em oito das 46 amostras (17%) devido à interferência do sangue. A análise das tiras esterase leucocitária que poderiam ser interpretadas produziu uma sensibilidade de 69% e uma especificidade de 100%, concluindo que a alfa-defensina é superior ao teste da esterase leucocitária no diagnóstico de infecção de prótese.

Shari et al.⁴⁶ (2016) realizam um estudo retrospectivo com 106 artroplastias de quadril e joelho com infecção de acordo com os critérios da MSIS. Desses pacientes, 30 foram tratados com antibiótico e 76 não foram tratados antes da investigação diagnóstica. A utilização do antibiótico não é associada a um nível mediano de alfa-defensina diminuído. Além disso, o teste da alfa-defensina apresenta uma sensibilidade de 100% no diagnóstico de infecção de prótese entre pacientes sob antibióticos, sendo superior quando comparada com o VHS e o PCR, apresentando uma sensibilidade de 69% e 79,3%, respectivamente.

Bonanzinga et al.⁴⁷ (2017) realizam um estudo prospectivo em 156 pacientes, sendo 29 com infecção de prótese, para determinar a performance da alfa-defensina no diagnóstico de infecção de ATJ e quais características clínicas poderiam ser responsáveis por resultados falso-positivos e falso-negativos e obtém uma sensibilidade de 97%, especificidade de 97%, valor preditivo positivo de 88% e valor preditivo negativo de 99%. Dos 4 falso-positivos, 2 apresentaram metalose e um desgaste do polietileno. O único caso de falso-negativo era de um paciente com a presença de fístula.

Partridge et al.⁴⁸ (2017) publicam um relato de caso de uma paciente com prótese de joelho e com suspeita de infecção de prótese e apresentou o teste do fluxo lateral (Synovasure - Zimmer-Biomet®) positivo para infecção, porém sem

preencher os critérios necessários para infecção de prótese do MSIS, sugerindo que artropatia gotosa, que essa paciente apresentou, seja a responsável pela positividade do teste da alfa-defensina.

Berger et al.⁴⁹ (2017) realizam um estudo multicêntrico prospectivo utilizando o teste do fluxo lateral (Synovasure - Zimmer-Biomet®) em 121 pacientes com prótese dolorosa, sendo 34 pacientes com infecção e obtém uma sensibilidade de 97,1%, especificidade de 96,6%, valor preditivo positivo de 91,7% e valor preditivo negativo de 98,8%, sugerindo que o teste do fluxo lateral pode ser uma importante ferramenta no diagnóstico de infecção de prótese.

Suen et al.⁵⁰ (2018) realizam uma metanálise para comparar a precisão da alfa-defensina laboratorial pelo teste ELISA (quantitativa) e o teste de fluxo lateral (qualitativa) incluindo todos os estudos clínicos em que o diagnóstico de infecção de prótese foi incerto. Eles utilizam como método diagnóstico os critérios do MSIS, com a inclusão de 10 estudos com 759 pacientes. A sensibilidade e a especificidade reunidas no teste laboratorial é de 95,3% e 96,5%, respectivamente. O coeficiente de verossimilhança positivo e razão de verossimilhança negativa é 34,86. A sensibilidade agrupada e a especificidade do teste de fluxo lateral são de 77,4% e 91,3%, respectivamente, concluindo que a sensibilidade e a especificidade do teste de fluxo lateral foram menores do que aqueles do teste laboratorial.

Ahmad et al.⁵¹ (2018) publicam metanálise comparando a acurácia geral dos marcadores sinoviais PCR, alfa-defensina laboratorial, alfa-defensina pelo teste de fluxo lateral, IL-6 e esterase leucocitária para o diagnóstico de infecção de prótese obtendo as seguintes sensibilidades e especificidades, respectivamente: teste laboratorial da alfa-defensina 97% e 97%; teste do fluxo

lateral da alfa-defensina 80% e 89%; teste da esterase leucocitária com 79% e 92%; IL-6 sinovial 76% e 91% e o PCR sinovial 86% e 90%, concluindo que o teste ELISA (quantitativo) da alfa-defensina mostrou a maior precisão já relatada para o diagnóstico de infecção de prótese, enquanto que o teste do fluxo lateral da alfa-defensina obteve resultado semelhantes ao IL-6, PCR e esterase leucocitária sinoviais.

Plate et al.⁵² (2018) realizam um estudo prospectivo em 109 pacientes, sendo 20 pacientes com infecção, para avaliar a eficácia do teste de fluxo lateral obtendo uma sensibilidade de 90%, especificidade de 92,1% e valor preditivo negativo de 97,6%, com achados demonstrando que todos os casos falso-positivos eram em pacientes com doenças inflamatórias.

Abdo et al.⁵³ (2021) estudam 53 pacientes com ATJ, sendo 22 pacientes com infecção de prótese e comparam a acurácia da alfa-defensina laboratorial (ELISA) com o teste de fluxo lateral utilizando o líquido sinovial centrifugado em ambos os testes obtendo uma sensibilidade de 86,4%, especificidade de 100% e acurácia de 93,2% para o teste de fluxo lateral e sensibilidade de 95,5%, especificidade de 100% e uma acurácia de 98,1% para o ELISA, demonstrando que a centrifugação prévia pode aumentar a acurácia do teste de fluxo lateral.

3.2.3 Anatomia patológica

Muitas vezes, o diagnóstico de infecção de ATJ só é confirmado após a realização da análise anatomopatológica do tecido. Essa avaliação pode ser pré-operatória, intraoperatória, ou mais comumente, pós-operatória.

Pace et al.⁵⁴ (1997) fazem a análise anatomopatológica por congelação de 25 cortes sinoviais e de pacientes submetidos a revisão de artroplastia de quadril ou joelho (9 quadris e 9 joelhos), sendo definida como inflamação aguda a presença de cinco ou mais neutrófilos por campos de alta potência de 60x em múltiplas áreas. Encontram 11 culturas cirúrgicas positivas com 9 com seções congeladas para inflamação aguda, obtendo uma sensibilidade de 82%, e 14 culturas negativas com 13 seções congeladas cirúrgicas negativas, obtendo uma especificidade de 93%. Houve correlação exata entre o anatomopatológico por congelação e a cultura em 22 dos 25 casos (88%), concluindo que o anatomopatológico por congelação é um preditor razoavelmente sensível e específico de infecção profunda nas artroplastias de revisão de quadril e joelho.

Tsaras et al.⁵⁵ (2012) realizam uma revisão sistemática e metanálise de todos os estudos longitudinais que comparam os resultados histológicos da região congelada com a cultura microbiológica obtida simultaneamente no momento da revisão da artroplastia total de quadril ou joelho total, envolvendo um total de 3269 pacientes. Infecção de prótese com cultura positiva foi confirmada em 796 (24,3%) dos pacientes e não houve diferença significativa entre a acurácia diagnóstica da histopatologia da região congelada utilizando os limiares mais comuns de cinco ou dez PMNs por campo de alta potência.

Zhao et al.⁵⁶ (2013) publicam uma outra metanálise envolvendo 1011 pacientes avaliando as evidências do limiar para o número de leucócitos PMNs requeridos em testes de congelação usados para diagnosticar infecção de prótese. Embora não encontrem diferença na sensibilidade ou no diagnóstico, a especificidade é significativamente maior para dez do que para cinco leucócitos polimorfonucleares por campo de alta potência ($p = 0,007$).

Fink et al.⁵⁷ (2008) analisam 145 pacientes submetidos à cirurgia de revisão de prótese com 40 pacientes com infecção e comparam os resultados da punção articular, da biópsia e do PCR para o diagnóstico de infecção de prótese e concluem que a biópsia é superior à punção articular e ao PCR para o diagnóstico de infecção periprotética, apresentando uma sensibilidade de 100%, especificidade de 98,1% e uma acurácia de 98,6%.

Meermans et al.⁵⁸ (2010) compara os resultados da punção pré-operatória com a biópsia pré-operatória em 120 pacientes e avalia se a combinação dos dois testes melhoraria o diagnóstico de infecção periprotética chegando à conclusão que a biópsia isolada não oferece vantagens em relação à aspiração e que a combinação das duas melhora a sensibilidade e a acurácia no diagnóstico.

3.2.4 Cultura

Atkins et al.⁵⁹ (1998) realizam um estudo prospectivo com 297 pacientes para estabelecer critérios para o diagnóstico microbiológico de infecção periprotética em revisões eletivas, sendo coletadas múltiplas amostras de tecido periprotético e realizadas coloração de Gram e culturas cultivadas por métodos diretos e de enriquecimento, sendo encontradas positividade da cultura em apenas 65% e positividade do Gram em apenas 12% dos casos com infecção sugerindo baixo número de bactérias nas amostras coletadas. O trabalho recomenda o envio de 5 ou 6 amostras para a análise e o abandono da coloração de Gram como ferramenta diagnóstica em artroplastia de revisão eletiva.

Berbari et al.⁶⁰ (2007) publicam um estudo retrospectivo para definir as características demográficas e determinar a evolução dos pacientes com infecção periprotética com culturas negativas e obtém uma boa taxa de sucesso no tratamento desses casos quando realizada a revisão em 2 tempos, com taxas de desfecho favorável comparável àquela associada às infecções com patógenos conhecidos.

Trampuz et al.⁶¹ (2007) comparam prospectivamente a cultura de amostras obtidas pela sonicação com culturas convencionais, aspecto purulento intraoperatório ou a presença de fístula que utilizam como critério diagnóstico e concluem que com a utilização da sonicação, aumenta a sensibilidade do diagnóstico.

Malekzadeh et al.⁶² (2010) realizam um estudo caso-controle retrospectivo de 135 pacientes com cultura-negativa de pacientes com infecção de prótese emparelhados com 135 com culturas positivas (controle) para avaliar se o uso de antibioticoterapia prévia é um fator de risco para infecções periprotéticas cultura negativa e concluem que a terapia antimicrobiana prévia e a drenagem da ferida pós-operatória foram associadas a um risco aumentado de culturas negativas entre os pacientes com infecção, devendo ser avaliado criticamente a necessidade de terapia antimicrobiana antes de estabelecer um diagnóstico antimicrobiano.

Yoon et al.⁶³ (2017) publicam uma revisão de literatura para ajudar a prevenir o diagnóstico tardio e melhorar os resultados clínicos de infecção periprotética com cultura negativa e encontram uma prevalência que varia de 0% a 42,1%, sendo a utilização de antibioticoterapia prévia e a presença de drenagem da ferida operatória com principais causas de cultura negativa.

Bori et al.⁶⁴ (2009) hipotetizam que tipo de microrganismo poderia estar relacionado à eficácia da histologia na detecção de infecção e então avaliam 28 tecidos periprotéticos de artroplastias de revisão de pacientes com infecção. A cultura era considerada positiva quando o mesmo microrganismo era isolado em pelo menos duas amostras ou na presença de ao redor da prótese. Como resultados encontram *Staphylococcus coagulase-negativo* em 13 casos, o bacilo Gram-negativo em 8, o *Staphylococcus aureus* em 7, o *Candida sp* em 2, o *Peptococcus sp* em 2, o *Enterococcus sp* em 1 e o *S. pneumoniae* em 1. Quase todas as análises foram positivas, exceto em 2 das 13 que foram causadas pelo *Staphylococcus coagulase-negativo* e concluem que o anatomopatológico por congelação é um teste útil para confirmação intraoperatória de infecção de prótese.

Benito et al.⁶⁵ (2019) fazem um estudo multicêntrico em 2544 pacientes com infecção periprotética para determinar a etiologia dessas infecções em infecções nos diferentes tipos de infecção periprotética. Os principais agentes causadores de infecção periprotética hematogênicas agudas foram os *Staphylococcus aureus* (39,2%) e *estreptococos* (30,2%). Já nas infecções pós operatórias precoces foram caracterizadas por uma preponderância de microrganismos virulentos (*S. aureus*, bacilos Gram-negativos, *enterococos*), organismos multirresistentes (24%) e infecções polimicrobianas (27,4%). Por outro lado, nas infecções crônicas tardias foram observados o predomínio de *estafilococos coagulase-negativos* (54,1%) e espécies de *Cutibacterium* (6,1%). As diferenças observadas têm implicações importantes para o tratamento antimicrobiano empírico de PJs.

MÉTODOS

4 Métodos

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional transversal de acurácia diagnóstica com o escopo de descrever a técnica da análise da alfa-defensina quantitativa no líquido sinovial e avaliar a sua acurácia para o diagnóstico de infecção crônica de ATJ utilizando o critério MSIS 2013⁶ como "padrão ouro".

4.2 Aprovação na comissão de ética em pesquisa e termo de consentimento

O presente estudo foi aprovado pelo Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o protocolo número 1261 (**Anexo A**) e pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o parecer número 2288521 (**Anexo B**) e emenda (**Anexo C**). Esse estudo faz parte de um estudo temático de nome "Utilização de exame não invasivo com tecnologia híbrida usando o radiofármaco 18F-FDG como PET/RM associada às técnicas de supressão de artefatos metálicos e de suscetibilidade magnética (MAVRIC) para o diagnóstico de infecção de prótese total de joelho em pacientes com indicação de revisão de artroplastia total de joelho".

Todos os pacientes que participaram do estudo assinaram o TCLE (**Anexo D**).

O paciente ou seu responsável recebeu todas as orientações sobre o estudo, leu ou ouviu a leitura realizada pelo pesquisador do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) o que o permitiu consentir a sua participação nesse estudo. Esse documento foi assinado e arquivado.

4.3 População estudada

Foram estudados pacientes com ATJ atendidos no IOT-HCFMUSP.

4.4 Critérios de seleção

Foram selecionados pacientes que apresentavam alguma suspeita de infecção crônica de prótese e pacientes que iriam ser submetidos a algum procedimento cirúrgico no joelho com ATJ como revisão em tempo único ou colocação de espaçador.

4.4.1 Critérios de inclusão

- a) Pacientes portadores ATJ, e;
- b) Pacientes acima dos 18 anos, e;

-
- c) Pacientes com alguma suspeita de infecção de ATJ como:
- Dor persistente no joelho sem outra causa aparente, ou;
 - Soltura precoce (menos de 5 anos) da prótese, ou;
 - Imagem de suspeita de infecção na radiografia de joelho AP + P. (**Figura 1**), ou;
 - Calor local persistente, ou;
 - Derrame articular persistente, ou;
 - Presença de Fístula, ou;
- d) Pacientes com indicação de revisão de ATJ por qualquer causa, e;
- e) Presença de líquido intra-articular puncionável, e;
- f) Pacientes sem infecção ativa em outros sítios, e;
- g) Sintomas sugestivos de infecção por pelo menos 90 dias (crônica)⁶⁶.

Não existe definição para soltura precoce de prótese. No nosso trabalho, foi considerada soltura precoce antes de 5 anos após a ATJ⁶⁷⁻⁷⁰. A imagem na radiografia que foi considerada soltura foi a presença de linhas de radiolusência maior que 2 mm na interface cimento-osso⁷¹. As imagens suspeitas de infecção foram: presença de gás ou edema em partes moles, reação periosteal (formação de osso novo periosteal) e presença de radiolusência periprotética refletindo erosões na periferia da prótese (**Figura 2**)⁷¹.

Calor local e derrame articular são esperados no pós-operatório de ATJ. Foi considerado como persistente acima de 3 meses.

Pacientes foram questionados durante a avaliação inicial sobre a presença ou suspeita de infecções ativas em outros focos, como trato gênito urinário, vias aéreas, pele entre outras.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 1 – Imagem de radiolucência na interface do componente tibial da prótese com o planalto tibial medial, caracterizando uma área de lise (erosão)

4.4.2 Critérios de exclusão

- a) Paciente em uso de antibiótico ou até 30 dias anteriores à punção.
- b) Paciente em que por qualquer motivo não foi possível obter o líquido articular;
- c) Amostra extraviada;
- d) Amostra que tenha demorado mais que 2 horas para ser encaminhada para análise;
- e) Amostra coagulada ou com qualquer outra característica que não fosse possível a sua análise.

4.5 Período da seleção

Os pacientes foram selecionados e incluídos no estudo de outubro/2016 até outubro/2019.

4.6 Amostra selecionada

Foram selecionados inicialmente 56 pacientes portadores de ATJ que preencheram os critérios de inclusão. Desses pacientes, 3 foram excluídos do trabalho por falta de amostra do líquido sinovial suficiente para a análise, restando assim 53 pacientes no estudo.

4.7 Procedimentos realizados

Após a inclusão dos pacientes e assinatura do TCLE (**Anexo C**), a avaliação era realizada seguindo o fluxo abaixo.

4.7.1 Exames séricos realizados

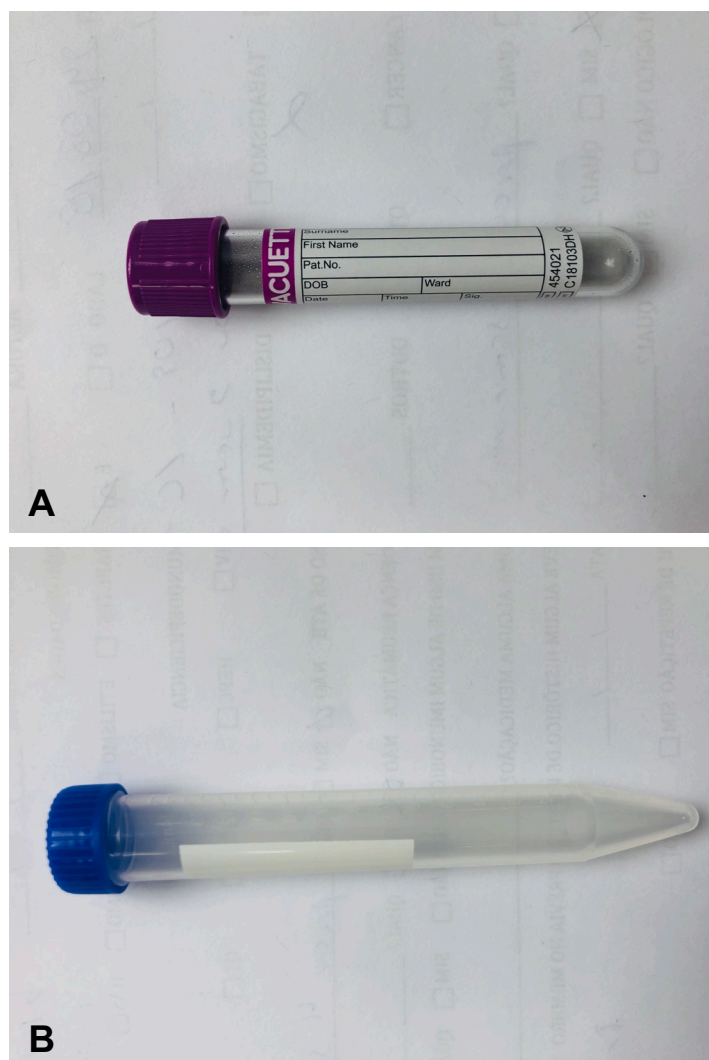
Foi realizada a coleta de sangue nesses pacientes para a análise do VHS e PCR no mesmo dia da punção articular.

4.7.2 Punção articular e análise do líquido sinovial

Os pacientes foram submetidos à punção articular do joelho com prótese para a obtenção do líquido sinovial. Nos pacientes ambulatoriais do IOT, as punções eram realizadas no centro cirúrgico do IOT- HCFMUSP ou em uma sala de procedimentos apropriada para realizar punção articular no Centro de Medicina Nuclear do HCFMUSP. Nos pacientes que seriam submetidos a cirurgia, a punção era feita no centro cirúrgico do IOT. Os pacientes que foram submetidos a procedimento cirúrgico, a profilaxia com antibiótico só foi realizada após a punção articular e a coleta de material para culturas. Para a realização da punção articular, os pacientes eram colocados em decúbito dorsal horizontal na maca. Foi utilizada paramentação padrão e ambiente estéril. Os joelhos eram lavados com clorexidine degermante por 3 minutos e em seguida era aplicado clorexidine alcoólico e colocado um campo fenestrado no local da punção. O local utilizado para a punção foi, em 49 casos, na borda súperolateral da patela e, em 4 casos, na borda súpero-medial da patela, com os joelhos em extensão. Era realizado um botão anestésico local com 1 ml de lidocaína sem vasoconstritor com agulha de insulina 26 G (0,45 x 13 mm) na pele até planos mais profundos, sem entrar no espaço articular. A punção do líquido era realizada com agulha 18 G (1,2 x 40 mm), retirando a maior quantidade de líquido possível, considerando o mínimo de 3 ml para a análise. Em 2 casos foi necessário a utilização de jelco 14 devido à quantidade de gordura no subcutâneo, o que impossibilitou a punção com a agulha 18 G. O líquido era dividido em 3 partes de 1 ml cada e colocados em 02 tubos com EDTA (**Figura**

2A) e 01 tubo seco estéril (**Figura 2B**). Os tubos eram encaminhados em menos de 1 hora para:

- a) 01 tubo com EDTA com o líquido sinovial aspirado do joelho era encaminhado para o Laboratório Central do HCFMUSP para a realização da contagem do número de leucócitos e a porcentagem de PMN;
- b) 01 tubo seco estéril com o líquido sinovial era encaminhado para o Laboratório de Microbiologia do HCFMUSP onde eram realizadas a bacterioscopia, cultura aeróbia, cultura anaeróbia e cultura pra fungos;
- c) 01 tubo com EDTA com líquido sinovial era encaminhado para o LIM-17 na Faculdade de Medicina da USP para a dosagem da alfa-defensina.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 2 – A. Tubo com tampa roxa com EDTA. **B.** Tubo seco estéril

4.7.3 Alfa-defensina

No LIM-17 foi realizada a análise da alfa-defensina. As amostras foram manuseadas por profissionais com larga experiência no laboratório. Inicialmente, o material do tubo com EDTA era centrifugado e congelado a -80°C . A análise

da alfa-defensina era realizada utilizando o Kit Elisa de alfa-defensina (HNP 1-3) da empresa Hycult Biotech® (Uden, Holanda) (**Figura 3**).



Fonte: Hycultbiotech, 2019.

Figura 3 – Caixa do kit Elisa da alfa-defensina mostrando os reagentes e a placa com os poços de microtitulação

a) Teste de padronização da diluição da amostra - Não existe informação na literatura sobre a diluição ideal para se realizar a análise da alfa-defensina no líquido sinovial para o diagnóstico de IPP. Essa informação também não é disponibilizada no manual do kit do ELISA da alfa-defensina (**Anexo A**), onde são listadas as diluições ideais para se usar com diversos líquidos corporais como saliva, sangue, entre outros, porém não existe descrição sobre a diluição ideal a ser usada com o líquido sinovial. Por esse motivo, foi desenhada metodologia para definir a melhor diluição da alfa-defensina, analisando 10 casos iniciais, sendo 5 com o diagnóstico de IPP e 5 sem infecção,

de acordo com o MSIS 2013. Esses casos seriam analisados em duplicata em 5 diluições distintas (1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:5000) para selecionar as 2 diluições com melhor performance, isto é, que conseguissem diferenciar bem os casos positivos dos negativos e apresentassem uma melhor acurácia para depois analisar os outros casos do estudo. Foram realizados os seguintes procedimentos seguindo as orientações do manual do kit. Cada placa do kit apresentava 96 poços de microtitulação revestidos com anticorpos anti alfa-defensina. Esses poços foram preenchidos em duplicata com 100 µl de líquido sinovial diluído em 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:5000 das 10 amostras. Após 60 minutos em temperatura ambiente, foi realizada a lavagem com o tampão de lavagem por 4 vezes. Após a lavagem, foi introduzido 100 µl de anticorpo traçador biotinilado em cada poço e mantido em temperatura ambiente por 60 minutos. Após esse período, foram realizadas novamente 4 lavagens com o tampão de lavagem. Após essas lavagens, foi adicionado 100 µl de conjugado de estreptavidina-peroxidase e mantido em temperatura ambiente por mais 60 minutos. Depois disso foi lavado novamente por 4 vezes e adicionado 100 µl de solução de tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço (**Figura 4**) e mantido em temperatura ambiente por 30 minutos e, após esse período, foi colocada a solução de "Stop" (ácido oxálico) para a realização da medição da absorbância. (**Figura 5**)



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 4 – Colocação de TMB (tetrametilbenzindina) nos poços durante processo de dosagem da alfa-defensina

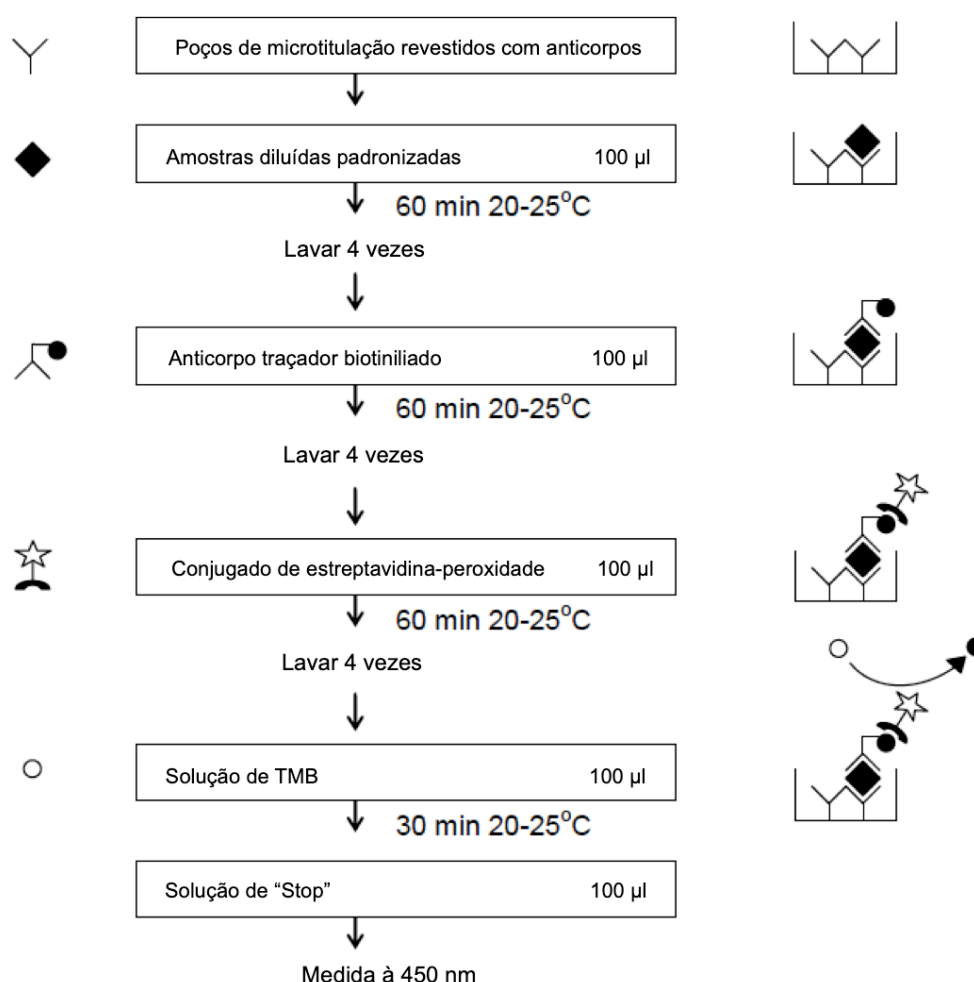


Figura 5 – Visão geral da sequência de etapas da análise da alfa-defensina em foto retirada e traduzida do manual do kit Elisa da alfa-defensina (HNP 1-3) da empresa Hycult Biotech® (Uden, Holanda)

A medição foi realizada em um leitor de Elisa Spectra Max 190® (espectrofotômetro) a 450 nm da marca Molecular-Devices (**Figura 6**), obtendo o resultado em densidade óptica (DO). Depois disso, os valores em DO foram plotados no eixo vertical, e as concentrações correspondentes foram plotadas no eixo horizontal (escala logarítmica). As concentrações foram multiplicadas pelo fator da diluição para se obter a concentração da alfa-defensina em mg/L.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 6 – Espectrofotômetro utilizado para medir a densitometria óptica da alfa-defensina

b) Análise completa da alfa-defensina - Após a escolha das 2 diluições com melhor performance, mais 30 casos seriam analisados nessas 2 diluições e os resultados seriam comparados. Seriam obtidos os valores de corte para infecção para cada diluição e também os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de cada diluição, para se obter assim a diluição ideal. E após a definição da diluição ideal, todos os outros casos subsequentes seriam analisados com essa diluição, para se obter a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de toda a amostra.

4.7.4 Cirurgia

A cirurgia de revisão de ATJ em tempo único foi realizada em pacientes que já tinham programada a cirurgia de revisão. A colocação de espaçador foi realizada em pacientes que tiveram o diagnóstico confirmado de IPP no pré-operatório ou pacientes que ainda tinham alguma dúvida do diagnóstico caso não fossem preenchidos os critérios para o diagnóstico com a investigação anterior. Durante a cirurgia eram coletados 5 fragmentos de tecido periprotético e osso para realização da análise histológica e culturas. Nenhum paciente fazia o uso de antibiótico no período do procedimento cirúrgico até pelo menos 30 dias anteriores ao procedimento. A utilização de antibiótico só era realizada após a retirada do líquido articular.

- a) Os fragmentos para cultura foram encaminhados para o Laboratório de Microbiologia do HCFMUSP onde eram realizadas a cultura aeróbia, cultura anaeróbia e antibiograma;
- b) Os fragmentos para a análise histológica foram encaminhados para o Laboratório de Anatomia Patológica do IOT-HCFMUSP e analisados de acordo com o critério MSIS 2013⁶, realizando a contagem de leucócitos por campo

4.8 Critérios diagnósticos

Foi utilizado como padrão ouro para o diagnóstico de infecção crônica de ATJ os critérios adotados pela MSIS em 2013⁶ onde é considerada infecção de prótese se: Presença de 1 critério maior ou presença de 3 critérios menores (Tabela 1).

Tabela 1 – Critérios maiores e menores da definição de infecção crônica periprotética - MSIS 2013⁶

Critérios maiores (1 ou mais)	a)	Presença de 2 culturas periprotética positivas com organismos fenotipicamente iguais
	b)	Presença de fístula comunicando com a articulação
Critérios menores (3 ou mais)	a)	PCR maior que 10 mg/L e VHS maior de 30 mm/hr
	b)	Aumento do número de leucócitos no LS acima de 3000 células/ μ l
	c)	Aumento do número de PMN no LS acima de 80%
	d)	Análise histológica positiva (presença de mais que 5 neutrófilos por campo em 5 campos, aumento de 400 vezes)
	e)	Presença de 1 cultura positiva

Durante a condução do trabalho, foi proposto na literatura um novo critério de definição de IPP durante o "International Consensus Meeting" em 2018 (ICM 2018)¹¹. Esse critério foi utilizado também como padrão diagnóstico para comparar os resultados obtidos com o critério anterior MSIS 2013. Nessa nova definição de infecção, os critérios menores receberam uma pontuação e, de acordo com a soma dessa pontuação, o diagnóstico pode ser de não infectado (menor que 3 pontos), inconclusivo (de 3 a 5 pontos) e infectado (maior ou igual a 6 pontos). Os critérios maiores continuaram sendo definidores de infecção. Então para definição de infecção de ATJ crônica de acordo com os critérios ICM 2018: Presença de 1 critério maior ou pontuação maior ou igual a 6 na soma dos critérios menores (**Tabela 2 e 3**):

Tabela 2 – Critérios maiores para definição de infecção crônica periprotética - ICM 2018¹¹

Critérios maiores	
a)	Presença de 2 culturas periprotéticas positivas com organismos fenotipicamente iguais
b)	Presença de fístula comunicando com a articulação

Tabela 3 – Critérios menores e as suas pontuações para definição de infecção crônica periprotética - ICM 2018¹¹

Critério menores e pontuação		
a) PCR sérico maior que 10 mg/L		Decisão Escore pré-operatório e pós-operatório combinado: Maior ou igual a 6 - infecção 3-5 - inconclusivo menor que 3: sem infecção
ou	2	
Dímero-D sérico maior que 860 µ/L		
b) VHS sérico maior que 30 mm/hr	1	
c) Aumento do número de leucócitos acima de 3000 células/µL no LS		
ou		
Esterase Leucocitária ++ no LS	3	
ou		
Alfa-defensina (ELISA) positiva no LS		
d) Aumento do número de PMN acima de 70% no LS	2	
e) 1 cultura positiva	2	
f) Histologia positiva	3	
g) Presença de pus intra-operatório	3	

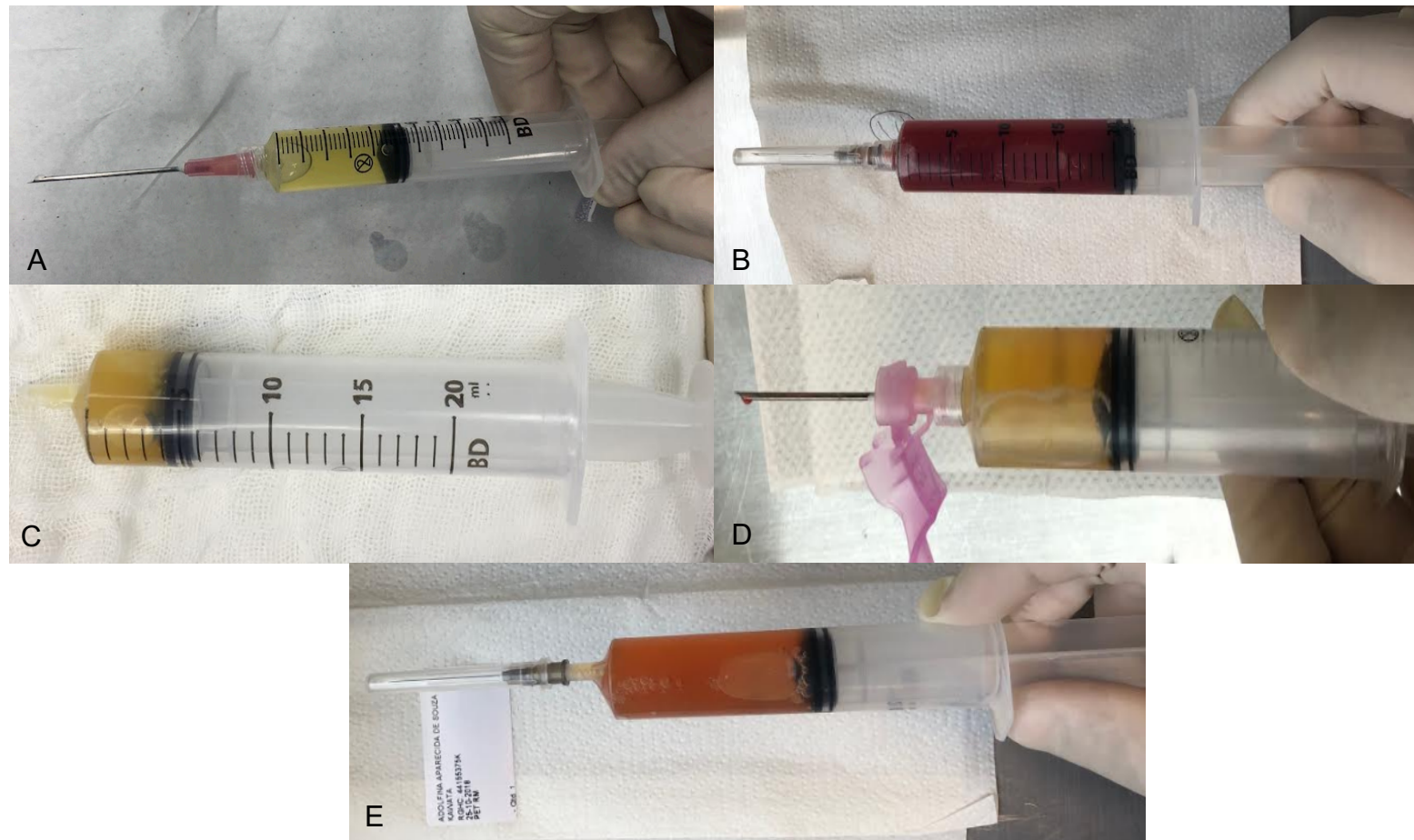
Nos casos que fossem obtidos uma pontuação que o diagnóstico fosse inconclusivo (entre 3 e 5), os pacientes seriam submetidos à investigação

confirmatória, com cirurgia, coleta tecidual e acompanhamento por pelo menos 18 meses.

4.9 Outros dados coletados

Foram também registrados a idade, sexo, lateralidade, presença de doença inflamatória, tempo de evolução entre a realização da prótese primária até o início dos sintomas e o tempo da prótese primária até o diagnóstico.

Além disso, foi analisado o aspecto macroscópico do líquido sinovial obtido com a punção. Essa análise foi realizada pelo autor do estudo e foi dividida em 4 aspectos: aspecto sinovial (normal), hemático, purulento e misto (indeterminado), quando um padrão não fosse bem definido (**Figura 7**).



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Figura 7 – A. Líquido sinovial aspecto normal. B. Líquido sinovial aspecto hemático. C. Líquido sinovial aspecto purulento. D. Líquido sinovial aspecto misto (indeterminado). E. Líquido sinovial aspecto misto (indeterminado)

4.10 Cálculo da Amostra

Não foi realizado cálculo amostral à priori. A amostra foi definida por conveniência, isto é, pelo número de casos disponíveis no IOT-HCFMUSP e também pela disponibilidade na quantidade dos exames. Foi prevista a realização da análise do tamanho da amostra após a obtenção dos resultados.

4.11 Análise estatística

Os dados coletados foram organizados em uma planilha do Excel® e posteriormente importados para o Software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, USA). Dados categóricos foram descritos pela sua frequência absoluta e respectiva proporção quando separados por subgrupos. Dados contínuos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e descritos como média e desvio padrão quando de distribuição paramétrica, ou como mediana e intervalo interquartil quando de distribuição não-paramétrica. Para comparação entre subgrupos, dados categóricos foram analisados pelo teste exato de Fisher. Teste t de student ou teste de Mann-Whitney foram utilizados para a análise de dados contínuos, de acordo com sua distribuição. O objetivo do trabalho foi demonstrar a eficiência de um novo método de análise do líquido sinovial. Desta forma, sensibilidade, especificidade, valores preditivos e seus respectivos intervalos de confiança de 95% foram calculados, assim como a geração da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic curve*) e a respectiva área sob a

curva (AUC – *area under the curve*). Valor de $P < 0.05$ foi aceito como estatisticamente significativo.

4.12 Custo e financiamento do estudo

Para a realização deste estudo foi necessária a obtenção de 02 Kits 2x96 ELISA Kit de alfa-defensina (HNP 1-3) da empresa Hycult Biotech (Uden, Holanda) com o custo total de R\$ 22.000,00. Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). O termo de Outorga e Aceitação de Auxílios corresponde ao Processo 2017/25540-9 (**Anexo E**). Esse estudo faz parte de um estudo temático de diagnóstico de infecção de prótese que é "Utilização de exame não invasivo com tecnologia híbrida usando o radiofármaco 18F-FDG como PET/RM associada às técnicas de supressão de artefatos metálicos e de suscetibilidade magnética (MAVRIC) para o diagnóstico de infecção de prótese total de joelho"

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Características da amostra

Dos 56 pacientes selecionados inicialmente, em 3 não foi possível a obtenção do líquido sinovial suficiente para a análise e os quais foram excluídos. Dos 53 pacientes que fizeram parte do estudo, 39 eram mulheres e 14 homens. Apresentavam média de idade de 68 anos, com desvio padrão de ± 10 e mediana de 67 anos. Em relação à lateralidade, o lado direito foi acometido em 27 casos, e o esquerdo, em 26. Sobre o tempo de evolução da prótese até o início dos sintomas obteve-se uma média de 32 (± 47) meses e sobre o tempo da realização da prótese até o diagnóstico uma média de 53 (± 56) meses (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Perfil demográfico da amostra

		Média(±DP)	Mín-Max
Idade		67 (±10)	47-84
Tempo da ATJ até início dos sintomas (meses)		32 (±47)	0-204
Tempo da ATJ até o diagnóstico (meses)		53 (±56)	4-216
Sexo	Homem	14 (26,4%)	
	Mulheres	39 (73,6%)	
	Total	53 (100%)	
Lateralidade	Direito	27 (50,9%)	
	Esquerdo	26 (49,1%)	
	Total	53 (100%)	

5.2 Diagnóstico de acordo com o MSIS 2013 e ICM 2018

De acordo com o diagnóstico proposto pelo MSIS 2013, foram diagnosticados 22 pacientes com infecção de ATJ e 31 pacientes sem infecção. De acordo com o critério ICM 2018, foram diagnosticados 22 pacientes com infecção, 28 assépticos e 3 obtiveram o diagnóstico de inconclusivo. Todos esses 3 pacientes foram submetidos a procedimento cirúrgico de revisão em

tempo único para confirmação diagnóstica pois eram considerados assépticos de acordo com o MSIS 2013. Nenhum desses casos foi considerado positivo após a análise de histopatológica e culturas de tecidos. Além disso, esses pacientes estão em acompanhamento há mais de 18 meses e, até agora, não apresentaram nenhum quadro clínico suspeito de infecção de prótese, sendo considerados assim como assépticos. Esses dados foram tabulados na **Tabela 5**, estratificando por idade, gênero, lateralidade, presença de doença inflamatória, tempo de colocação da prótese até o diagnóstico e tempo de colocação da prótese até o início dos sintomas.

Além dessas 3 cirurgias citadas, foram realizados mais 28 procedimentos cirúrgicos para diagnóstico e/ou tratamento do caso, sendo 22 para a colocação de espaçador e 6 revisões de prótese total de joelho em tempo único. Os outros 22 pacientes ainda estão aguardando a cirurgia de revisão de prótese. Nenhum dos pacientes que foi submetidos à punção articular apresentou complicação decorrente do procedimento.

Tabela 5 – Informações dos pacientes estudados de acordo com a classificação pelo critério de infecção MSIS 2013⁶

Informações	Infecção	Sem Infecção	Total	p
Casos (%)	22 (41,5%)	31 (58,5%)	53 (100%)	
Média idade (± DP) anos	69 (± 10)	66 (± 10)	68 (±10)	0,354
Gênero (No. (%))				0,213
Mulheres	14 (63,6%)	25 (80,6%)	39 (73,6%)	
Homens	8 (36,4%)	6 (19,4%)	14 (26,4%)	
Lateralidade (No. (%))				0,782
Direita	12 (54,5%)	15 (48,4%)	27 (50,9%)	
Esquerda	10 (45,5%)	16 (51,6%)	26 (49,1%)	
Doença Inflamatória (No. (%))				>0,999
Artrite Reumatoide	3 (13,6%)	7 (22,6%)	10 (18,9%)	
Gota	2 (9,1%)	-	2 (3,8%)	
Ausente	17 (77,3 %)	24 (77,4%)	41 (77,3%)	
Tempo ATJ - diagnóstico (± DP) meses	36 (± 41)	65 (± 63)	53 (± 56)	0,035
Tempo ATJ - Sintomas (± DP) meses	17 (± 28)	42 (±54)	32 (± 47)	0,040

5.3 Alfa-defensina

5.3.1 Análise do teste inicial de padronização da diluição da amostra

Em relação à avaliação inicial, 10 amostras sendo 5 com o diagnóstico de infecção e 5 assépticas de acordo com o MSIS 2013 foram testadas em duplicata nas diluições 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:5000. Considerando o grupo com infecção, um aumento gradual na diluição do líquido sinovial resultou em uma elevação dos níveis de alfa-defensina. Por outro lado, a mesma resposta não foi observada no grupo asséptico. Além disso, as diluições que apresentaram as melhores performances, que foi possível fazer uma boa diferenciação dos casos positivos dos negativos foram 1:1000 e 1:5000, conforme podemos observar na **Tabela 6 e Figura 8**.

Tabela 6 - Mediana e variação dos valores da alfa-defensina (em mg/L) dos 10 casos iniciais (5 do grupo infectado e 5 do grupo asséptico) em várias diluições.

	Dil. 1:10	Dil. 1:100	Dil. 1:500	Dil. 1:1000	Dil. 1:5000	Média
	Média (Min-Max)	Média (Min-Max)	Média (Min-Max)	Média (Min-Max)	(Min-Max)	
Infecção (N=5)	0,04 (0,03 – 0,05)	0,52 (0,40 – 0,76)	2,92 (1,68 – 4,45)	6,68 (3,62 – 9,62)	32,67 (12,65 – 50,18)	
Sem Infecção (N=5)	0,01 (0 - 0,03)	0,09 (0,02 – 0,30)	0,21 (0,12 – 0,55)	0,3 (0,24 – 0,48)	1,43 (1,4 – 1,49)	
P	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	

Teste de Mann-Whitney.

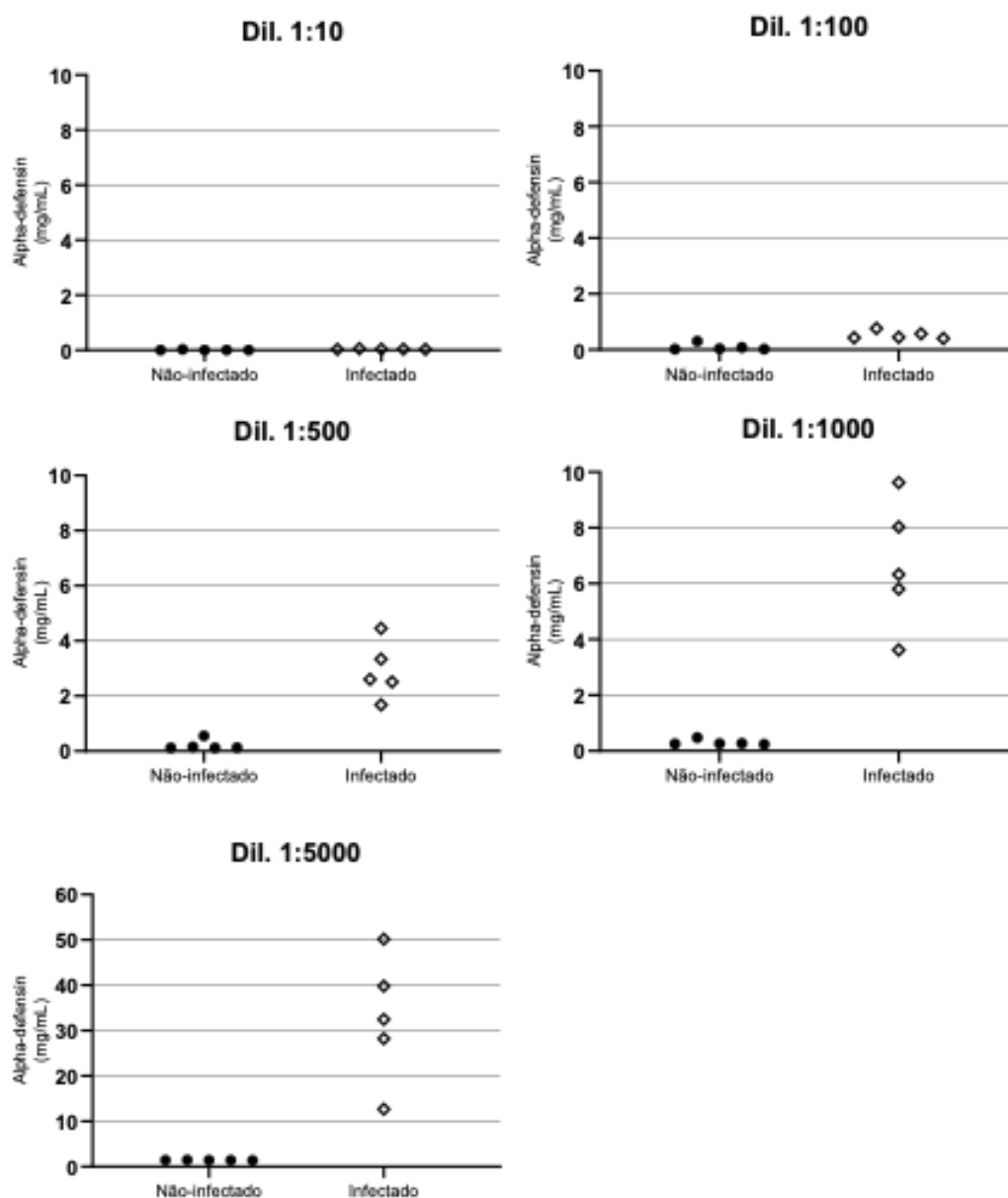


Figura 8 – Resultados da concentração de alfa-defensina (mg/L) de acordo com a diluição (1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:5000). As amostras 1 a 5 referem-se a casos com infecção e as amostras 6 a 10 referem-se a casos sem infecção (casos assépticos)

5.3.2 Análise completa da alfa-defensina

De acordo com os resultados neste teste inicial, de padronização da diluição, procedemos à avaliação de mais 30 amostras utilizando as diluições 1:1000 e 1:5000. Os resultados dos testes de alfa-defensina, incluindo esses 40 pacientes, são exibidos na **Tabela 7** e **Figura 9**.

Tabela 7 – Mediana e variação dos valores de alfa-defensina no líquido sinovial (em mg/L) dos 40 pacientes.

	Número de Casos	Diluição 1:1000	Diluição 1:5000
Infecção	17 (42,5%)	6,60 (0,26 - 9,62)	28,22 (1,25 - 50,18)
Sem infecção	23 (57,5%)	0,25 (0,24 - 8,54)	1,25 (1,22 - 4,66)
P		<0,01	<0,01

Teste Mann-Whitney

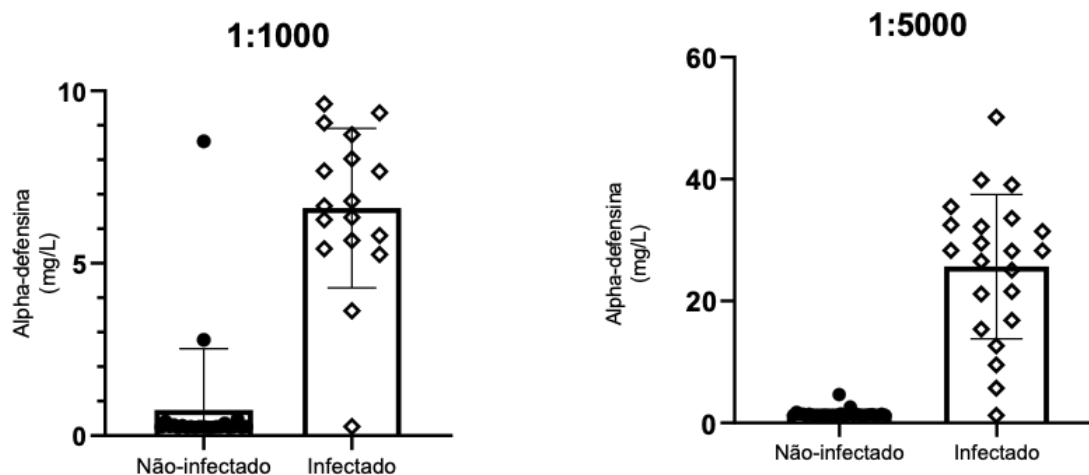


Figura 9 – Resultados dos valores de alfa-defensina do líquido sinovial dos 40 pacientes nas diluições 1:1000 e 1:5000

5.3.2.1 Curva ROC, AUC e definição do valor de corte (*cutoff*)

Obtivemos a curva ROC referente aos 40 pacientes na diluição 1:1000 e na diluição 1:5000, conforme podemos observar na **Figura 10**. Além disso, foram obtidas a "area under de curve" (AUC) de 95% (IC 95% - 87-100%) para a concentração de 1:1000 e uma AUC de 98% (IC 95% - 94-100%) para a concentração de 1:5000.

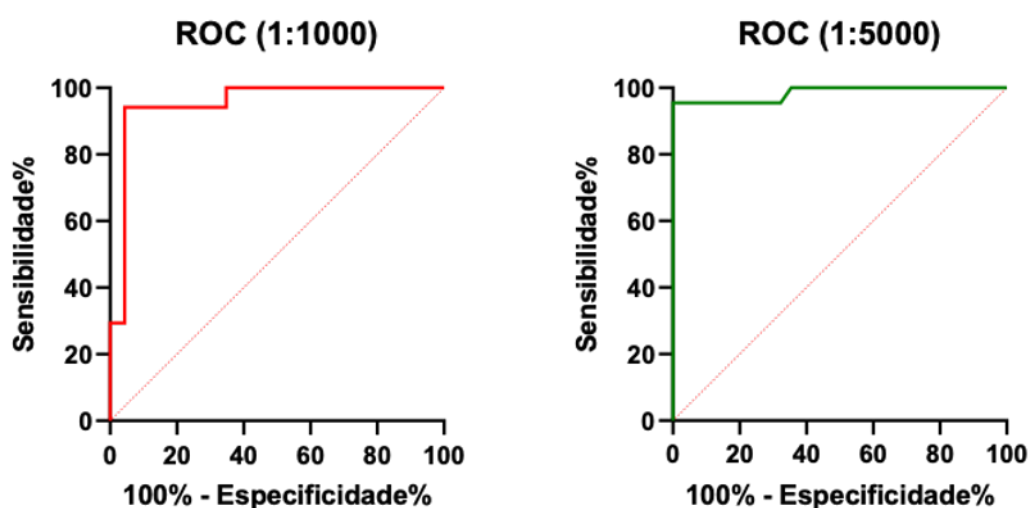


Figura 10 – Curva ROC dos 40 pacientes da diluição 1:1000 e 1:5000.

De acordo com os dados obtidos na curva ROC, obtivemos um valor de corte de 3,2 mg/L para a diluição 1:1000 e de 5,2 mg/L para a diluição de 1:5000.

5.3.2.2 Análise final

Utilizando a diluição de 1:1000 com o valor de corte 3,2 mg/L, a análise estatística indicou uma sensibilidade de 88,2% (IC 95% - 66-98%), uma especificidade de 95,7% (IC 95% - 79-99%), um valor preditivo positivo de 93,8% (IC 95% - 72-99%) e valor preditivo negativo de 91,7% (IC 95% - 74-99%). Nesta situação, foram encontrados um caso de falso positivo e dois casos de falso negativo.

Em relação à diluição 1:5000, foi obtida uma sensibilidade de 94,1% (IC 95% - 73-99%), uma especificidade de 100% (IC 95% - 86-100%), um valor preditivo positivo de 100% (IC 95% - 81-100%) e valor preditivo negativo de 95,8% (IC 95% - 80-99%). Apenas um resultado falso negativo foi identificado dentro do grupo infectado, que era um paciente que apresentava fístula ativa.

Como a diluição 1:5000 apresentou melhor performance, finalizamos a análise das últimas 13 amostras que obtivemos nessa diluição, apresentando uma sensibilidade final de 95,5% (IC 95% - 78-100%), especificidade de 100% (IC 95% - 89-100%), um valor preditivo positivo de 100% (IC 95% - 85-100%) e um valor preditivo negativo de 96,9% (IC 95% - 84-100%). Os resultados da concentração da alfa-defensina dos 53 pacientes são demonstrados na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Mediana e variação dos valores de alfa-defensina no líquido sinovial (em mg/L) de todos os pacientes

	Número de Casos	Diluição 1:5000
Infecção	22 (41,5%)	28,23 (1,25 - 50,18)
Sem infecção	31 (58,5%)	1,25 (1,22 - 4,66)
P		<0,01

Teste Mann-Whitney

5.4 Outros resultados

5.4.1 Aspecto macroscópico do líquido sinovial

O aspecto macroscópico do líquido sinovial também foi avaliado. Nos pacientes sem infecção, foram observados 14 líquidos de aspecto sinovial (normal), 7 hemáticos e 10 mistos (indeterminados), conforme observado no **Gráfico 1**. É possível observar que em nenhum paciente observou-se o aspecto purulento nos assépticos. Já nos pacientes com infecção, foram observados 12 líquidos purulentos, 4 hemáticos e 6 mistos (indeterminado). Nesses casos com infecção, nenhum líquido de aspecto sinovial (normal) foi observado, conforme observado no **Gráfico 2**.

Gráfico 1 – Distribuição do aspecto líquido sinovial em pacientes sem infecção (MSIS 2013)

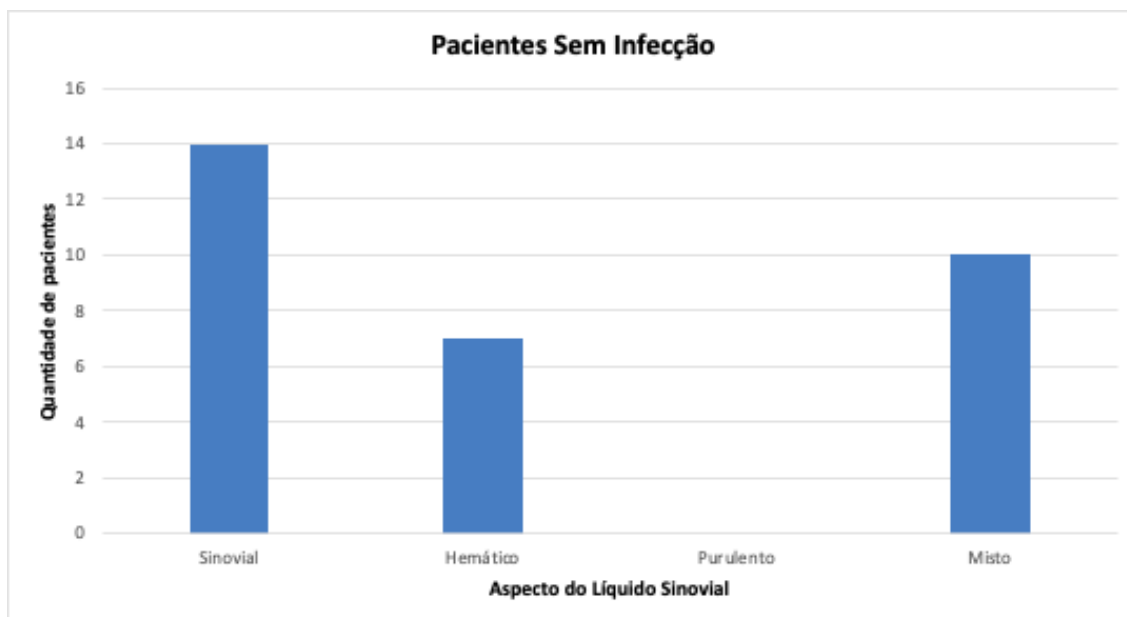
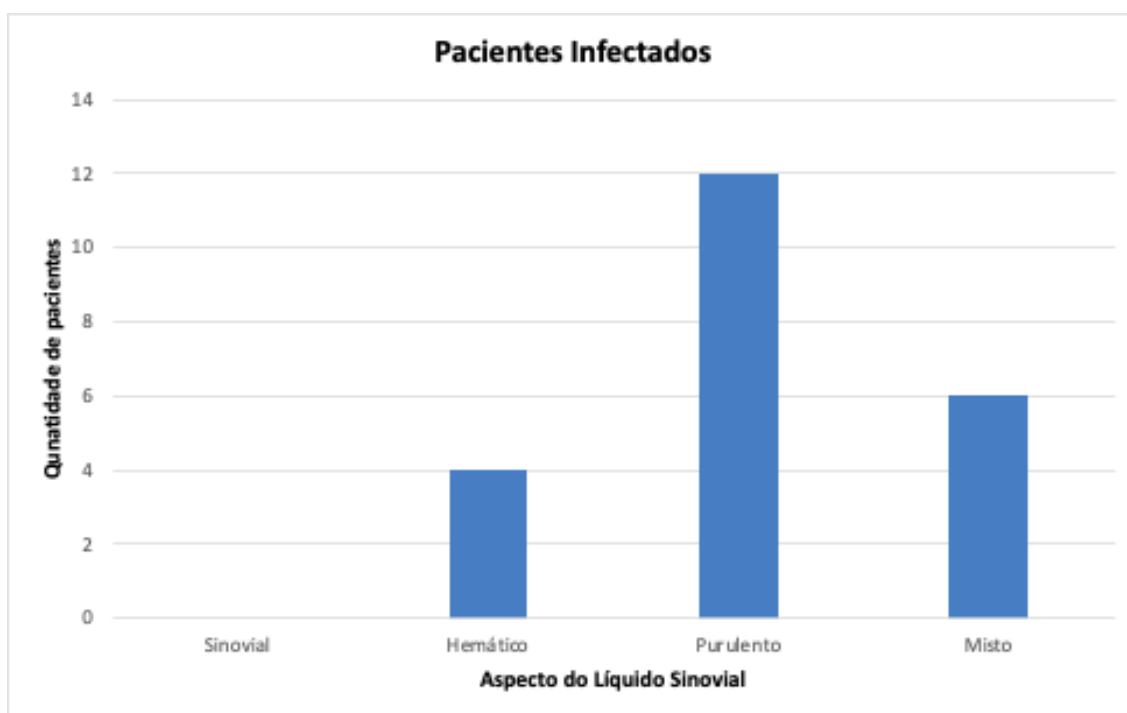


Gráfico 2 – Distribuição do aspecto líquido sinovial em pacientes com infecção (MSIS 2013)



5.4.2 Avaliação de outros testes isolados

Foi realizada também uma tabela comparativa dos testes laboratoriais séricos e sinoviais (PCR, VHS, contagem de leucócitos, % PMN do MSIS 2013⁶ e do ICM 2018¹¹ e alfa-defensina) com os resultados individuais de cada critério calculando a sua S, E, VPP e VPN (**Tabela 9**).

Comparando com os resultados da alfa-defensina, todos os testes foram inferiores individualmente em todos os cálculos. O teste que apresentou a melhor sensibilidade foi a percentagem de PMN 70% (ICM 2018¹¹). Já os testes que apresentaram as melhores especificidades foram a contagem de leucócitos e a percentagem de PMN 80% (MSIS 2013⁶), todos inferiores aos resultados da alfa-defensina. Essa diferença é possível observar nas **Figura 11**, onde as linhas em vermelho indicam os valores de corte do VHS, PCR, contagem de leucócitos e da % de PMN de 80% (MSIS 2013⁶) e a linha verde indica os valores de corte da % de PMN de 70% (ICM 2018¹¹) de cada teste, e também na **Figura 12**, onde a linha em vermelho indica o valor de corte da alfa-defensina encontrado na nossa amostra (5,2 mg/L).

Tabela 9 – Testes laboratoriais analisados individualmente

Critérios Isolados	Ass. (31) (%)	IPP (22) (%)	S (IC 95%)	E (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)
VHS	3	14	63,6%	90,3%	82,3%	77,8%
(>30 mm/Hr)	(9,7%)	(63,6%)	(IC 95% - 43-80%)	(IC 95% - 75-97%)	(IC 95% - 59-94%)	(IC 95% - 62-88%)
PCR	2	18	81,9%	93,6%	90%	87,9%
(> 10mg/L)	(6,5%)	(81,8%)	(IC 95 - 61-93%)	(IC 95% - 79-99%)	(IC 95% - 70-98%)	(IC 95% - 73-95%)
Leucócitos	1	17	77,3%	96,8%	94,4%	85,7%
(>3000 céls/µl)	(3,2%)	(77,3%)	(IC 95% - 57-90%)	(IC 95% - 84-100%)	(IC 95% - 74-100%)	(IC 95% - 71-94%)
% PMN	1	18	81,8%	96,8%	94,7%	88,2%
(80%) *	(3,2%)	(81,8%)	(IC 95% - 61-93%)	(IC 95% - 84-100%)	(IC 95% - 75-100%)	(IC 95% - 73-95%)
% PMN	3	20	90,9%	93,6%	90,1%	93,6%
(70%)	(9,7%)	(90,9%)	(IC 95% - 72-98%)	(IC 95% - 79-99%)	(IC 95% - 72-98%)	(IC 95% - 79-99%)
AD positiva		21	95,5%	100%	100%	96,9%
(> 5,2mg/L)	0	(95,5%)	(IC 95% - 78-100%)	(IC 95% - 89-100%)	(IC 95% - 85-100%)	(IC 95% - 84-100%)

* MSIS 2013, ** ICM 2018

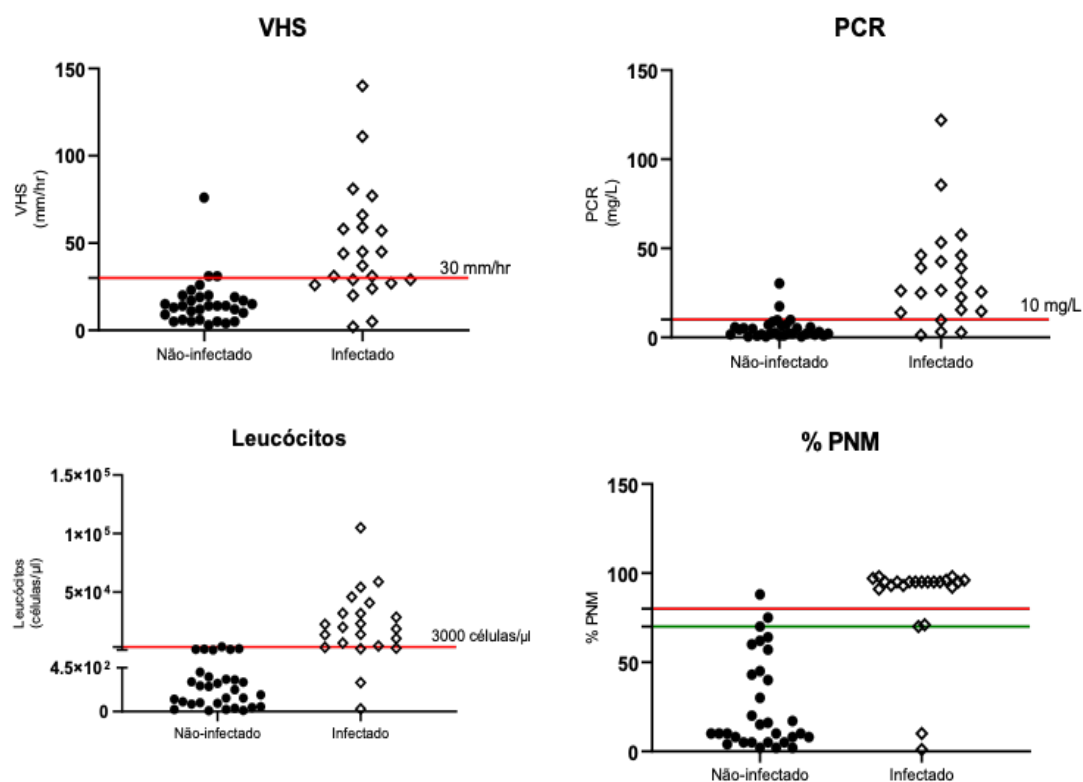


Figura 11 – Gráficos mostrando a distribuição dos valores observados nos pacientes sem infecção e com infecção de acordo com o MSIS 2013⁶ do VHS (mm/hr), do PCR (mg/L), da contagem de leucócitos (células/ μ l) e % de PMN. As linhas vermelhas indicam os valores de corte do VHS, PCR, contagem de leucócitos e da % de PMN de 80% (MSIS 2013⁶) e a linha verde indica os valores de corte da % de PMN de 70% (ICM 2018¹¹).

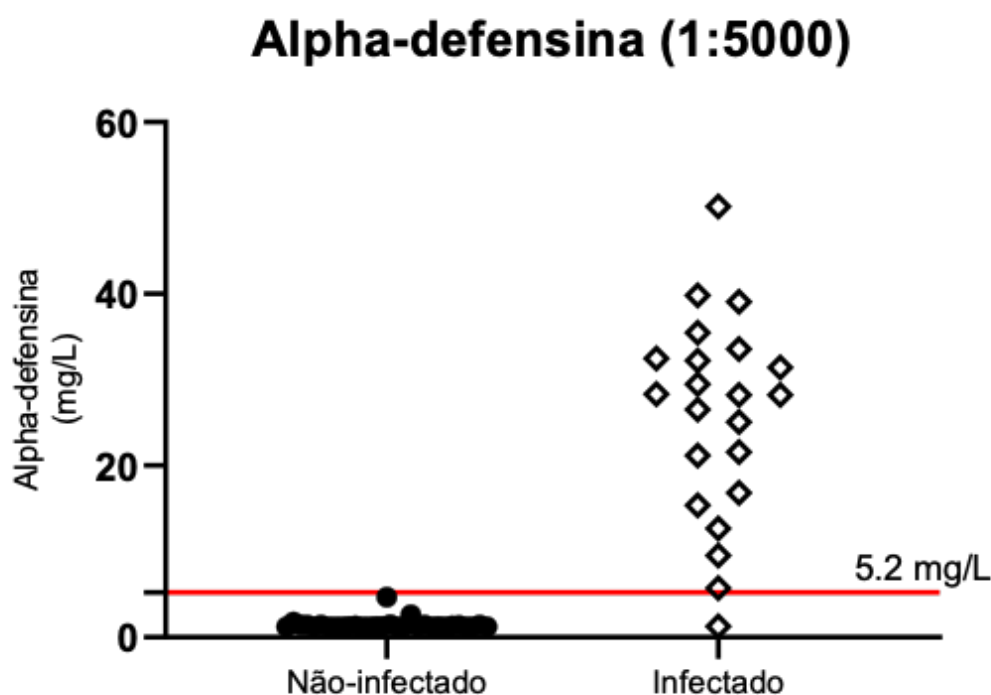


Figura 12 – Gráfico mostrando a distribuição das concentrações da alfa-defensina nos pacientes sem infecção e com infecção de acordo com o MSIS 2013⁶. A linha vermelha indica o valor de corte da amostra estudada de 5,2 mg/L

A análise anatomopatológica não foi utilizada para comparação pois nem todos os pacientes realizaram essa análise. A presença de fístula e 2 culturas também não foram adicionadas a essa análise pois esses 2 critérios já são patognomônicos de IPP isoladamente. Também não consideramos a uma cultura para a análise pois tiveram casos que a cultura foi obtida no pré-operatório (punção), e em outros, no pós-operatório em decorrência do ato cirúrgico.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nossos achados obtidos neste estudo pioneiro no Brasil referentes à acurácia diagnóstica da alfa-defensina no diagnóstico de IPP foram muito promissores, com uma excelente acurácia diagnóstica, sendo comparados à literatura^{7,47,72}, corroborando com a importância desse peptídeo nesse diagnóstico. Além disso, conseguimos completar um "gap" deixado por outros estudos na análise laboratorial da alfa-defensina, demonstrando a importância da diluição da amostra do líquido sinovial para a sua análise, indicando resultados positivos nas diluições de 1:1000 e 1:5000 e seus respectivos valores de corte (*cutoff*), sendo 1:5000 a diluição que apresentou os melhores resultados. Essas informações são muito relevantes e podem auxiliar outros centros pelo mundo na utilização da alfa-defensina laboratorial no diagnóstico de IPP. Também, pudemos observar que ao utilizarmos a nova definição de IPP proposta durante o *International Consensus Meeting* em 2018 (ICM 2018)¹¹, os resultados finais foram semelhantes aos critérios propostos pela Sociedade de Infecção Musculoesquelética em 2013 (MSIS 2013)⁶. Porém, só obtivemos essa semelhança nos resultados após o acompanhamento e diagnóstico final dos casos inconclusivos, indicando uma necessidade cada vez maior de um aprimoramento do diagnóstico de IPP.

O diagnóstico preciso de uma ATJ dolorosa é muito importante pois determinará qual o tipo de tratamento é o mais indicado para cada caso. No caso de uma IPP, é ainda mais importante, pois um diagnóstico inadequado pode levar a tratamentos inadequados, colocando em risco a saúde do paciente,

podendo em alguns casos levar à amputação de um membro, ou até mesmo à morte⁴.

As taxas de IPP são variadas na literaturas, variando entre 1 a 2% nas artroplastias primárias⁷³, podendo variar entre 3 e 5% nas revisões de ATJ³. Mesmo com os esforços para diminuir essas taxas de infecção, aparentemente parece que estão aumentando. Alguns fatores podem estar relacionados a esse aumento, como diminuição na taxa de revisões por outras causas, seja pela diminuição da osteólise e solturas pelo desgaste do polietileno, abrangência maior nos diagnósticos por limiares menores nos testes e novos critérios diagnósticos, e também, por uma melhor qualidade nos registros de infecção⁷⁴.

Historicamente, diferentes critérios diagnósticos têm sido utilizados para se diagnosticar um IPP. Vários autores utilizaram nesse período desde uma simples cultura, uma cintilografia óssea, uma análise do líquido sinovial, um exame histológico²¹, dentre outros isoladamente, até a utilização desses exames em conjunto. Várias sociedades de infecção como a MSIS em 2011²⁵ e 2013⁶, a IDSA também em 2013²⁶ e a EBJIS em 2017²⁸ propuseram critérios diagnósticos com o objetivo de melhorar a acurácia desse diagnóstico. Porém, Renz demonstrou em uma publicação em 2018 que os diagnósticos dos mesmos pacientes eram diferentes quando se utiliza critérios diferentes²⁸, demonstrando assim uma necessidade de unificar esses critérios para tentar melhorar a acurácia diagnóstica e padronizar esse diagnóstico. Foi em 2018, durante o ICM, evento que reuniu especialistas no assunto de todo o mundo, que foi proposto o novo critério de infecção¹¹, onde a alfa-defensina foi introduzida como parte dos critérios menores. E ainda mais recente, no início de 2021, a EBJIS apoiada pela MSIS sugeriu um novo critério diagnóstico, mais abrangente, como limiares

menores, dividido em 3 partes (infecção improvável, infecção provável e infecção confirmada), colocando a alfa-defensina, tanto a laboratorial quanto a qualitativa, como um critério definidor de infecção³⁰, comprovando a sua importância no diagnóstico.

Atualmente, dois métodos estão disponíveis para determinar a presença de alfa-defensina no líquido sinovial. O teste quantitativo, realizado em laboratório pelo método ELISA, descrito neste trabalho e não disponível no Brasil. E o teste qualitativo de fluxo lateral, utilizando o Synovasure®, dispositivo da empresa Zimmer-Biomet®, já disponível comercialmente no Brasil. É importante notar que ambos têm sido usados como ferramentas valiosas para o diagnóstico de IPP e fornecem informações importantes durante essa investigação^{66,75}. Embora cada teste apresente vantagens e desvantagens, em geral, o teste de fluxo lateral é mais fácil de ser realizado, até mesmo pelo médico no consultório, apresentando resultados rápidos e com custo mais barato, enquanto o ELISA, apesar de seu melhor desempenho, geralmente necessita de estrutura de laboratório com profissionais experientes e custos elevados, principalmente em locais onde o número de pacientes em investigação de IPP não é elevado, como é o caso do nosso estudo^{10,45,47,76}. Uma maneira para tentar melhorar a acurácia do teste de fluxo lateral, é realizar a centrifugação prévia do líquido sinovial, como observado em estudo realizado pelo nosso grupo e publicado recentemente em 2021⁵³.

Em um dos primeiros estudos sobre a alfa-defensina em IPP, Parvizi et al. descreveram um valor de corte de 5,2 mg/L na concentração da alfa defensina utilizado para o diagnóstico de IPP⁷. No entanto, as diluições aplicadas para a obtenção desse valor de corte não foram descritas, dificultando sua replicação,

mesmo utilizando o mesmo kit de teste ELISA de alfa-defensina. Em nosso estudo, pudemos observar que ao utilizarmos a diluição de 1:5000, obtivemos exatamente o mesmo valor de corte a, de 5,2 mg/L. Usando esta razão de diluição, apenas um resultado falso negativo foi observado no nosso estudo, que foi de um caso que apresentava fístula ativa, semelhante a outros estudos na literatura^{10,47}. No entanto, em nosso estudo, o caso apresentou cultura intra-operatória positiva, o que não foi verificado na outra série. Também mostramos evidências de que, embora a diluição de 1:1000 tenha apresentado resultados satisfatórios para detecção de casos infectados, obteve-se menor sensibilidade e especificidade, com um valor de corte de 3,2 mg/L. Na nossa série, não obtivemos nenhum caso falso positivo, como poderia ser encontrado na presença de metalose ou artrite gotosa, conforme descrito na literatura^{47,48}.

Uma consideração digna de nota diz respeito ao efeito prozona, também conhecido como efeito gancho, que é uma resposta falsa negativa que ocorre em testes imunológicos como consequência de um excesso de antígeno ou de anticorpos⁷⁷. Em relação ao teste de alfa-defensina, se a quantidade de antígeno (ou seja, alfa-defensina) for maior do que a quantidade de anticorpo, o anticorpo secundário (ou seja, peroxidase) não se ligará adequadamente e o teste apresentará um resultado falso. Esta pode ser a razão para alguns valores falsos negativos durante o ensaio da alfa-defensina em publicações anteriores. No presente estudo, não avaliamos diretamente a influência da diluição no efeito prozona. No entanto, uma vez que as amostras foram diluídas usando diluentes apropriados, e considerando que diluições mais baixas são mais propensas a exibir o efeito prozona, as diluições mais recentes podem ser úteis para superar

esse efeito⁷⁸, potencialmente permitindo uma diferenciação mais precisa entre IPP e os caso assépticos.

Outro dado observado na nossa amostra é que os grupos não eram diferentes entre si quanto à idade, gênero, lateralidade e presença de doença inflamatória, pois não houve diferença estatística. Só foi observada diferença estatística nos itens “Tempo de ATJ até o diagnóstico” e “Tempo de ATJ até o início dos sintomas” onde pudemos observar um tempo mais curto nesse dois itens nos pacientes com infecção, como era de se esperar, conforme podemos observar na **Tabela 5**.

Uma constatação adicional interessante do estudo foi quando comparamos o resultado da alfa-defensina para o diagnóstico de IPP com os outros testes realizados para o diagnóstico (PCR, VHS, contagem de leucócitos, PMN 70% e PMN 80%) **Tabela 9**. Pudemos observar que a melhor sensibilidade encontrada nesses testes foi a percentagem de PMN 70%, critério que faz parte do ICM 2018¹¹. As melhores especificidades foram observadas na contagem de leucócitos e na percentagem de PMN 80% (MSIS 2013⁶), porém todos os resultados inferiores ao obtido com a utilização da alfa-defensina (**Figura 11 e Figura 12**). Na literatura já estão descritos alguns fatores que podem alterar o resultado desses exames e prejudicar o diagnóstico de infecção de prótese^{79,80}. Em uma publicação de Shahi et al. em 2015⁷⁹, descreveram que os o resultado dos biomarcadores PCR, VHS e %PMN eram inferiores em pacientes que receberam antibióticos previamente, deixando os valores abaixo do limite determinado pela MSIS, dificultando o diagnóstico de IPP. Esse é mais um dado muito relevante do nosso estudo, pois nenhum paciente fazia o uso de antibióticos por pelo menos 4 semanas, o que aumentou a confiança nesses

outros testes no nosso estudo. Mesmo assim, a alfa-defensina, que não tem o seu efeito alterado pelo uso de antibióticos⁴⁶, se mostrou superior.

Além disso, o uso de antibiótico prévio pode acarretar em um risco aumentado de diagnósticos de IPP com cultura negativa, atrapalhando não só o diagnóstico quanto o tratamento antimicrobiano⁸⁰. Outras causas descritas para esse resultado negativo das culturas são a coleta e manuseio inadequado da amostra, presença de microrganismos raros em causar infecção e a presença do biofilme^{62,80}.

Uma técnica que vem sendo utilizada para tentar melhorar esses resultados de culturas negativas é a sonicação do implante, que consiste na utilização do ultrassom com ondas de baixa frequência passando pelo líquido ao redor da prótese e criando áreas de baixa e alta pressão, fazendo com que ocorra a liberação das bactérias. Esse líquido ao redor da prótese é encaminhado para a realização de culturas. A utilização da sonicação de implantes melhora a sensibilidade do diagnóstico de infecção de prótese por aumentar a detecção de bactérias e não altera a especificidade⁸¹. Além disso, observou-se uma melhora importante no resultado de culturas de pacientes em uso de antibioticoterapia prévia⁸². Apesar dos bons resultados, a sonicação ainda é um procedimento muito pouco realizado devido ao seu alto custo e poucos centros têm a capacidade de realizar, principalmente no Brasil.

Uma outra ferramenta com boas perspectivas que vem sendo estudada com resultados animadores é a Reação em Cadeia da Polimerase, ou RCP (PCR- *Polymerase Chain Reaction*), uma técnica de biologia molecular que amplifica uma única cópia de um pedaço de DNA e cria milhões de cópias para fácil identificação⁸³. Tanto o DNA e o RNA da bactéria são alvos para

amplificação e detecção. Uma metanálise realizada por Xinhua Qu et al.⁸⁴ para avaliar o uso de ensaios de RCP para o diagnóstico de infecção articular protética apresentou uma sensibilidade de 86% e especificidade de 91%, mostrando que o RCP é um método confiável para o diagnóstico de infecção de prótese. Apesar da realização de alguns estudos sobre o RCP mostrando resultados animadores, o seu uso ainda é muito restrito pelo seu altíssimo custo.

E a última análise que fizemos no nosso estudo foi referente ao aspecto macroscópico do líquido sinovial. Apesar do viés de ter sido realizada por apenas um dos autores (pesquisador principal), trouxe algumas informações que podem nos orientar durante uma punção articular. Nos casos assépticos, a maioria dos líquidos tinha o aspecto normal (14 casos), porém foi possível observar que em nenhum paciente foi observado líquido com aspecto purulento (**Gráfico 1**), tendo uma bom "valor preditivo positivo" o líquido purulento para infecção de prótese. Já nos pacientes com infecção, a maioria dos líquidos tinha o aspecto purulento (12 casos), e foi possível observar que nenhum líquido de aspecto normal foi observado nos pacientes com IPP (**Gráfico 2**).

Algumas limitações devem ser consideradas, sendo a principal o pequeno tamanho da amostra. No entanto, os achados consistentes de diferentes diluições e os excelentes resultados usando uma diluição de 1:5000 reduzem a necessidade de aumentar o tamanho da amostra. Além disso, apesar dos resultados em relação às melhorias progressivas no desempenho do teste após diluições em série, não demonstramos a verdadeira razão pela qual isso ocorre. Mais estudos são necessários para resolver esta consideração. O presente estudo é uma avaliação piloto e necessita de mais testes de desempenho técnico antes de sua validação e uso rotineiro em laboratório. Mesmo assim, aqui

descrevemos em detalhes a análise da alfa-defensina do líquido sinovial por meio de ELISA, incluindo as melhores diluições para o diagnóstico mais preciso de IPP do joelho. Além disso, embora existam vários kits de ELISA disponíveis, optamos por aplicar o kit que era usado anteriormente quando este estudo foi realizado e, portanto, poderíamos comparar os resultados com a literatura atual. O desenvolvimento de um imunoensaio interno pode ser de grande interesse para laboratórios de rotina em todo o mundo, e as informações fornecidas aqui podem garantir a reprodutibilidade do teste com dados mais precisos. Acreditamos que este trabalho agrega conhecimentos importantes na interpretação dos resultados dos testes, os quais são relevantes para os cirurgiões ortopédicos que serão os usuários mais frequentes desses testes.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que a alfa-defensina laboratorial foi um excelente biomarcador sinovial para o diagnóstico de infecção periprotética no joelho, apresentando uma sensibilidade de 95,5% (IC 95% - 77-100%), uma especificidade de 100% (IC 95% - 89-100%), um valor preditivo positivo de 100% (IC 95% - 85-100%) e um valor preditivo negativo de 96,9% (IC 95% - 84-100%) quando utilizamos como referência o MSIS 2013 e o ICM 2018. Além disso, observamos que a diluição mais adequada para o teste laboratorial foi a 1:5000, onde obtivemos um valor de corte de 5,2 mg/L.

ANEXO

ANEXOS

Anexo A – Aprovação pela Comissão Científica

DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

COMISSÃO CIENTÍFICA

IDENTIFICAÇÃO

Protocolo IOT nº 1261

Pesquisador Responsável: Dr. Marco Kawamura Demange
Pesquisador Executante: Dr. Riccardo Gomes Gobbi
Título: Utilização de exame não invasivo com tecnologia híbrida usando o radiofármaco 18F-FDG como PET/RM associada às técnicas de supressão de artefatos metálicos de suscetibilidade magnética (MAVRIC) para o diagnóstico de infecção de prótese total do joelho em pacientes com indicação de revisão de artroplastia total de joelho.
Grau de Pesquisa: Projeto Regular (Interinstitucional)

APRECIÇÃO GERAL DA PROPOSTA

1º PARECER

Estudo com desenho adequado e descrição clara na área de interesse dos autores.

Termos e documentos sem pendências.

Recomendo Aprovação.

Relator
Comissão Científica
05.05.2017

=====

DECISÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA EM 05.05.2017: Projeto aprovado.

Para enviarmos o projeto para submissão da CAPPesq, os pesquisadores deverão:

- 1) Anexar todos os documentos relativos ao projeto de pesquisa, inclusive este parecer e o projeto de pesquisa, no cadastro on-line através dos links:

Para acesso dentro do HC:

<http://192.168.10.40/DiretoriaClinica/Pesquisador/login.php>

Para acesso fora do HC:

<http://143.107.176.78/DiretoriaClinica/Pesquisador/login.php>

- 2) Preencher a Folha de Rosto da Plataforma Brasil que deverá ser impressa, assinada pelo pesquisador responsável e encaminhada a esta secretaria (**anexa instrução do preenchimento**)

Anexo B – Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Utilização de exame não invasivo com tecnologia híbrida usando o radiofármaco 18F-FDG como PET/RM associada às técnicas de supressão de artefatos metálicos e de suscetibilidade magnética (MAVRIC) para o diagnóstico de infecção de prótese total de joelho em pacientes com indicação de revisão de artroplastia total de joelho

Pesquisador: Marco Kawamura Demange

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 71039317.3.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.179.456

Apresentação do Projeto:

Utilização de exame não invasivo com tecnologia híbrida usando o radiofármaco 18F-FDG como PET/RM associada às técnicas de supressão de artefatos metálicos e de suscetibilidade magnética (MAVRIC) para o diagnóstico de infecção de prótese total de joelho em pacientes com indicação de revisão de artroplastia total de joelho.

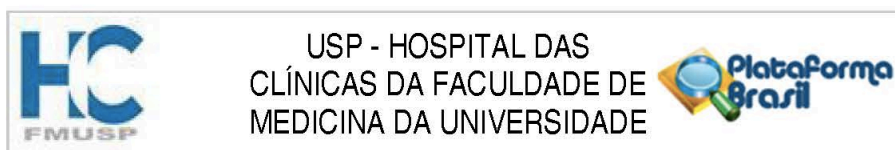
Objetivo da Pesquisa:

O propósito do presente trabalho é correlacionar os resultados de exames que já são utilizados para o diagnóstico de infecção de prótese segundo a Sociedade Internacional de Infecção de Prótese e o valor intra-articular da alfa-defensina no diagnóstico de infecção de prótese de joelho com o método de imagem híbrido usando o radiofármaco 18F-FDG: PET/RM e utilizando as técnicas de supressão de artefatos metálicos e suscetibilidade magnética (MAVRIC), naqueles pacientes aguardando revisão de artroplastia total do joelho com suspeita de infecção.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco proveniente da punção articular seria o risco de contaminação da articulação pós-punção. A punção articular será realizada em ambiente adequado para esse procedimento, seguindo as

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.179.456

normas da CCIH do IOT-HCFMUSP, diminuindo assim ao máximo o risco para o paciente. Esse procedimento faz parte da abordagem para o diagnóstico de infecção de prótese e não deve ser considerado como risco adicional do estudo. Riscos do exame de PET/RM em casos de pacientes com alguma contraindicação para a realização do PET ou RM seriam excluídos do estudo (critério de exclusão).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo bem desenhado, com objetivos claro e metodologia adequadamente descrita.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados e sem pendências.

Recomendações:

Aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

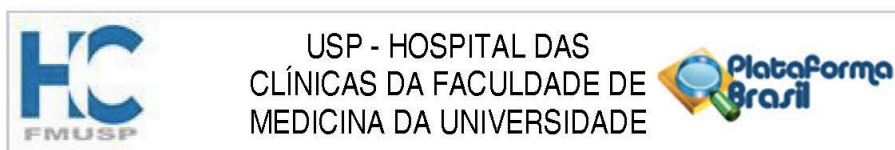
Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_922689.pdf	10/07/2017 10:15:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPETRM.doc	10/07/2017 10:14:53	Marco Kawamura Demange	Aceito
Outros	CadastroDaPesquisa16444.pdf	27/06/2017 15:52:15	Marco Kawamura Demange	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto16444.pdf	27/06/2017 15:51:37	Marco Kawamura Demange	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Página 02 de 03



Continuação do Parecer: 2.179.456

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	versaocomissaocientifica.docx	25/05/2017 15:13:48	Marco Kawamura Demange	Aceito
---	-------------------------------	------------------------	---------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 20 de Julho de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C – Emenda da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Utilização de exame não invasivo com tecnologia híbrida usando o radiofármaco 18F-FDG como PET/RM associada às técnicas de supressão de artefatos metálicos e de suscetibilidade magnética (MAVRIC) para o diagnóstico de infecção de prótese total de joelho em pacientes com indicação de revisão de artroplastia total de joelho

Pesquisador: Marco Kawamura Demange

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71039317.3.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.288.521

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda na qual o pesquisador informa a inclusão do aluno de mestrado Rodrigo Calil Teles Abdo que irá desenvolver o sub-projeto intitulado "ANÁLISE DA ALFA-DEFENSINA NO LÍQUIDO SINOVIAL COMO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO DE PRÓTESE DE JOELHO EM PACIENTES COM INDICAÇÃO DE REVISÃO DE ARTROPLASTIA TOTAL DE JOELHO"

Objetivo da Pesquisa:

Inclusão de aluno de mestrado e sub-projeto

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem modificações com relação a emenda apresentada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão adequados.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.288.521

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_989414 E1.pdf	31/08/2017 14:42:31		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetoalphasefensinmestrado.docx	31/08/2017 14:39:47	Marco Kawamura Demange	Aceito
Declaração de Pesquisadores	propostamestrado.pdf	31/08/2017 14:39:06	Marco Kawamura Demange	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPETRM.doc	10/07/2017 10:14:53	Marco Kawamura Demange	Aceito
Outros	CadastroDaPesquisa16444.pdf	27/06/2017 15:52:15	Marco Kawamura Demange	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto16444.pdf	27/06/2017 15:51:37	Marco Kawamura Demange	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	versaocomissaoacientifica.docx	25/05/2017 15:13:48	Marco Kawamura Demange	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.288.521

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



SAO PAULO, 21 de Setembro de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar**Bairro:** Cerqueira Cesar**CEP:** 05.403-010**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)2661-7585**Fax:** (11)2661-7585**E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Página 03 de 03

Anexo D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa: **Utilização de exame não invasivo com tecnologia híbrida usando o radiofármaco 18F-FDG como PET/RM associadas às técnicas de supressão de artefatos metálicos e de suscetibilidade magnética (MAVRIC) para o diagnóstico de infecção de prótese total de joelho em pacientes com indicação de revisão de artroplastia total de joelho**

Pesquisador principal – Dr Rodrigo Calil Teles Abdo – Médico

Departamento/Instituto - IOT –HCFMUSP

**II – EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL
SOBRE A PESQUISA:**

O senhor (a) está sendo convidado para participar deste estudo que tem como objetivo melhorar o diagnóstico de infecção de prótese de joelho, com o auxílio de uma nova técnica de ressonância magnética. Você será submetido(a) a uma ressonância magnética por emissão de pósitrons (PET-RM) que é um exame em que se utiliza um campo magnético para fazer com cada tipo de substância do corpo emita um tipo de onda de rádio diferente, que é captado para formar a imagem em alta definição. Vamos avaliar na PET-RM o grau de captação do medicamento (radiofármaco) na região da prótese pois acreditamos que uma alta captação na região da prótese e em volta dela, aumentam as chances de ser infecção. Além disso vamos avaliar a presença de coleções perto da prótese que também pode ser indicativo de processo infeccioso.

Atualmente não temos um método ouro para o diagnóstico de infecção de prótese e geralmente não se chega a um diagnóstico definitivo e na grande maioria das vezes é necessária a realização da punção articular para auxílio no diagnóstico. O objetivo desse novo exame é encontrar um método não invasivo para auxiliar no diagnóstico.

Os incômodos que você terá participando desse trabalho são: os exames são um pouco demorados e você terá de ficar deitado sem se mexer por 30 a 45 minutos durante o exame; você não pode ter problemas em ficar em espaços fechados; você receberá uma picada na veia para a injeção do medicamento (radiofármaco) da PET-RM; e, terá que ficar em jejum antes da realização do PET-RM.

Dessa forma, queremos avaliar esse novo método de exame não invasivo para auxiliar no diagnóstico de infecção de prótese. O benefício que você pode vir a ter ao optar por participar dessa pesquisa ocorrerá pelo diagnóstico correto da suspeita de infecção de prótese.

Para a confirmação do diagnóstico será realizada também a punção articular e análise do líquido retirado do joelho, conforme literatura atual, após a realização da PET-RM. A punção articular faz parte da pesquisa do diagnóstico de infecção de prótese. Além das substâncias normalmente analisadas, o material que sobrar será armazenado e, no final do projeto, será também realizada a análise de uma substância chamada de alfa-defensina e depois iremos comparar os resultados encontrados nos pacientes que concordaram em participar deste estudo.

O senhor (a) tem plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma. O senhor (a) receberá uma via desse termo de consentimento.

Riscos para o paciente

A ressonância magnética não apresenta risco para o paciente. Os pacientes que apresentarem contra-indicação da realização do exame, serão excluídos na fase inicial,

O radiofármaco utilizado será o 18F-FDG e não traz risco para o paciente.

A punção articular faz parte da pesquisa de suspeita de infecção de prótese.

Benefícios esperados

A pesquisa traz como benefício, a tentativa da utilização da ressonância magnética no diagnóstico de infecção de prótese, um método não invasivo e sem riscos para o paciente.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Dr Rodrigo Calil Teles Abdo, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 44 Telefone(s) 11 - 2661-6655 e 11 - 994926939, e-mail. rctabdo@hotmail.com. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661- 6442 ramais 16, 17, 18, ou (11) 2661-7585; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo **“Utilização de exame não invasivo com tecnologia híbrida usando o radiofármaco 18F-FDG como PET/RM associadas às técnicas de supressão de artefatos metálicos e de suscetibilidade magnética (MAVRIC) para o diagnóstico de infecção de prótese total de joelho em pacientes com indicação de revisão de artroplastia total de joelho”**.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Dr Rodrigo Calil Teles Abdo) ou pessoa (s) por ele delegada (s) (Dr Riccardo Gomes Gobbi) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

Assinatura do participante ou representante legal

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Data ____/____/____

Anexo E – Aprovação FAPESP



Processo

Identificação do Processo

Número do Processo	2017/25540-9 - Projeto de Pesquisa - Regular
Situação	Em Execução
Grupo de Financiamento	Auxílio à Pesquisa
Linha de Fomento	Programas Regulares / Auxílios à Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular - Fluxo Contínuo
Beneficiário	Marco Kawamura Demange
Responsável	Marco Kawamura Demange
Data Início	01.05.2018
Duração	24 mês(es)

Instituição de Pesquisa/Empresa	Faculdade de Medicina/FM/USP
Departamento	ortopedia e traumatologia
Data de Abertura	07/12/2017

Projeto - Identificação

Título em Português

Utilização de exame não invasivo com tecnologia híbrida usando o radiofármaco 18F-FDG como PET/RM associada às técnicas de supressão de artefatos metálicos e de suscetibilidade magnética (MAVRIC) para o diagnóstico de infecção de prótese total de joelho

Título em Inglês

Use of non-invasive test with hybrid technology using the 18F-FDG as PET / MRI associated with metal artifact suppression and magnetic susceptibility (MAVRIC) techniques for the diagnosis of total knee prosthesis infection

Classificação

Grande Área	Ciências da Saúde
Área	Medicina
Sub-área	Outra Subárea Medicina
Especialidade	Ortopedia e Traumatologia

Palavras-chave	alfa defensiva, artroplastia total de joelho, infecção de artroplastia total de joelho, MAVRIC, PET/RM
-----------------------	--

Projeto - Instituições

Instituição de Pesquisa/Empresa Principal

Nome	Faculdade de Medicina/FM/USP
-------------	------------------------------

Projeto - Pessoas Envolvidas

Equipe

Nome	Função	Horas Sem anais Dedicadas ao Projeto	Vigência	Vínculo Principal
Marco Kawamura Demange	Pesquisador Responsável *	15	01.05.2018 a 30.04.2020	Faculdade de Medicina/FM/USP

Ana Lucia Lei Munhoz Lima	Pesquisador Associado	10	01/05/2018 a 30/04/2020	Hospital das Clínicas de São Paulo/HC/SSSP
Carlos Alberto Buchpiguel	Pesquisador Associado	10	01/05/2018 a 30/04/2020	Faculdade de Medicina/FM/USP
Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá	Pesquisador Associado	10	01/05/2018 a 30/04/2020	Faculdade de Medicina/FM/USP
Gilberto Luís Camanho	Pesquisador Associado	10	01/05/2018 a 30/04/2020	Faculdade de Medicina/FM/USP
RODRIGO CALIL TELES ABDO	Pesquisador Associado	20	01/05/2018 a 30/04/2020	Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas de São Paulo/IOT/SSSP
jose ricardo pecora	Apoio Técnico	5	01/05/2018 a 30/04/2020	

* Com Benefício Complementar

Projeto - Descrição

Resumo em Português

A Artroplastia Total de Joelho (ATJ) é um procedimento bem sucedido na ortopedia e com o envelhecimento da população e a crescente demanda por qualidade de vida têm aumentado a sua indicação. Algumas vezes, podem ocorrer complicações desse procedimento e a infecção de prótese é um dos mais difíceis de se conduzir. O diagnóstico de infecção de artroplastia total de joelho ainda permanece um desafio para os ortopedistas no mundo inteiro. Um diagnóstico errado pode levar a um tratamento inadequado podendo causar grandes complicações para o paciente. Atualmente, o método utilizado para o diagnóstico de infecção de prótese depende da punção articular e eventualmente, só se tem o diagnóstico após procedimento cirúrgico. Esse método, no entanto, é invasivo e pode acarretar em outras complicações para o paciente. A FDG-PET, um método não invasivo, fornece resultados promissores para a avaliação de infecção pós artroplastia. Entretanto, falta padronização na interpretação dos achados dos métodos de imagem. Além disso, uma nova sequência de imagens de RM com o MAVRIC (multiaquisition variable ressonance image combination) vem sendo utilizada em pacientes com implantes metálicos nas articulações com ótimos resultados. Este trabalho tem o propósito de comparar resultados de exames que já são utilizados para o diagnóstico de infecção de prótese segundo a Sociedade Internacional de Infecção de Prótese, com o valor da alfa defensina articular que tem demonstrado resultados bem animadores e com resultados dos exames de imagem não invasivos com tecnologia híbrida usando o radiofármaco 18F-FDG como PET/RM associadas às técnicas de supressão de artefatos metálicos e de suscetibilidade magnética (MAVRIC) para o diagnóstico de infecção de prótese total de joelho em pacientes com indicação de revisão de artroplastia.

Resumo em Inglês

Total Knee Arthroplasty (TKA) is a highly successful procedure in orthopedics and with the aging population and increasing demand for quality of life have increased its indication. Sometimes complications of this procedure can occur and Periprosthetic Joint Infection (PJI) is one of the most complicated to manage. The diagnosis of total knee arthroplasty infection remains a challenge for orthopedists worldwide. A misdiagnosis can lead to inadequate treatment and can cause major complications for the patient. Currently, the method used for the diagnosis of PJI depends on the joint aspiration and sometimes the diagnosis is made after a surgical procedure. However, this an invasive method and can lead to other complications for the patient. FDG-PET, a non-invasive method, provides promising results for PJI evaluation. However, there is a lack of standardization in the interpretation of imaging findings. In addition, a new sequence of MRI images with MAVRIC (multiaquisition variable ressonance image combination) has been used in patients with metal implants in the joints with optimal results. The purpose of this study is to compare the results of tests that are already used for the diagnosis of PJI according to the International Society of Prosthesis Infection, with the measurement of alpha defensin in synovial fluid that has shown very encouraging results and the non-invasive test with hybrid technology using the 18F-FDG radiopharmaceutical as PET / MRI associated with metal artifact suppression and magnetic susceptibility (MAVRIC) techniques for the diagnosis of PJI in patients with indication for revision of knee arthroplasty.

Objetivos

Objetivo primário: O propósito do presente trabalho é correlacionar os resultados de exames que já são utilizados para o diagnóstico de infecção de prótese segundo a Sociedade Internacional de Infecção de Prótese e o valor intra-articular da alfa-defensina no diagnóstico de infecção de prótese de joelho com o método de imagem híbrido usando o radiofármaco 18F-FDG: PET/RM e utilizando as técnicas de supressão de artefatos metálicos e suscetibilidade magnética (MAVRIC), naqueles pacientes com indicação de revisão de artroplastia total do joelho com suspeita de infecção. Objetivos secundários: Avaliar a adequação dos parâmetros técnicos de aquisição do exame de RM com técnicas de redução dos artefatos metálicos e suscetibilidade magnética em comparação com as técnicas tradicionais; Explorar as várias técnicas de redução de artefatos com os vários tipos de próteses totais de joelho utilizadas na instituição quanto ao material de sua constituição e capacidade diagnóstica do método híbrido PET/RM; Definir um padrão de imagem na modalidade híbrida da PET/RM de maneira a se diagnosticar de forma não invasiva infecção de prótese total de joelho.

Resultados Previstos

Atualmente o diagnóstico de infecção de artroplastia total de joelho depende da punção articular, que é um procedimento que pode trazer riscos ao paciente. É esperado que a PET-RM com a técnica de supressão de artefatos metálicos (MAVRIC) tenha um importante papel no diagnóstico de infecção de artroplastia total de joelho, diminuindo assim os riscos ao paciente. Além disso, pode ser utilizado como importante ferramenta em um eventual procedimento cirúrgico que o paciente necessite, direcionando melhor o tratamento. A alfa-defensina é um biomarcador que vem sendo estudado com ótimos resultados no diagnóstico de infecção de artroplastia total de joelho. É esperado que obtenhamos resultados excelentes de acordo com a

literatura e tome a alfa-defensina um importante marcador para infecção no nosso meio.

O produto objeto do projeto é patenteável?

Não

RS / US\$ - Orçamento

Orçamento		
Benefícios	Valor (R\$)	Valor (US\$)
Capital		
Material Permanente	0,00	0,00
Custeio		
Despesas de Transporte	0,00	0,00
Diárias	0,00	0,00
Material de Consumo	0,00	3.839,00
Serviços de Terceiros	102.400,00	0,00
Reserva Técnica - Benefícios Complementares	16.000,00	0,00
Reserva Técnica - Custo de Infraestrutura Direta do Projeto	17.375,47	0,00
Provisão para Importação	0,00	575,85
TOTAL	135.775,47	4.414,85

Quotas de Bolsa

Modalidade / Categoria	Carga Horária	Duração (Meses)	Quantidade
Nenhuma quota solicitada.			

RS / US\$ - Orçamento - Detalhamento

Material de Consumo - Importado

Origem	Exterior
Classificação	Material de Consumo
Descrição	3 kits de 3x96 ELISA Kit para a dosagem de alfa defensina (HNP 1-3)
Moeda de Origem	US\$
Valor	3.839,00
Taxa de Câmbio (US\$)	1,0000000
Valor Total	3.839,00
Justificativa	Dosar alfa defensina e comparar aos exames atualmente utilizados para diagnóstico de infecção de prótese.

Serviços de Terceiros - Nacional

Origem	Brasil
Quantidade	80
Classificação	Serviço de Terceiros
Descrição	PET/RESSONÂNCIA DE JOELHO SEM CONTRASTE
Valor Unitário	1.280,00
Valor Total	102.400,00
Justificativa	Utilização de método não invasivo para auxílio no diagnóstico de infecção de prótese.

Reserva Técnica - Benefícios Complementares

	Nome	Papel	Valor	Vigência
Beneficiados	Marco Kawamura Demange	Pesquisador Responsável	16.000,00	01/05/2018 a 30/04/2020
Moeda	R\$			
Valor Unitário (anual)	8.000,00			

Data de Referência 27/03/2018
 Valor do Benefício Complementar 16.000,00

Reserva Técnica - Custo de Infraestrutura Direta do Projeto

Percentual para Reserva Técnica (País) 15,00 %
 Percentual para Reserva Técnica (Exterior) 15,00 %
 Dólar FAPESP 3,50
 Valor Aumentado 0,00
 Valor Diminuído 0,00
 Valor da Reserva Técnica (R\$) 17.375,47
 Valor da Reserva Técnica (US\$) 0,00

Provisão para Importação

Percentual para Provisão para Importação 15,00 %
 Valor da Provisão para Importação (US\$) 575,85

R\$ / US\$ - Outras Fontes

Outras Fontes

Nenhuma outra fonte encontrada.

Documentos

Download de Todos os Documentos

1.1 Documentos Anexados na Proposta Atual (Proposta Inicial submetida em 07/12/2017)

Tipo de Documento	Etapa Exigida	Arquivo	Data de Anexação	Arquivo Convertido
Anexo II - Informação sobre infraestrutura institucional necessária	Análise	ANEXO II termo de outorga.pdf	30/11/2017	
Manifestação do dirigente da instituição	Análise	manifesto dirigente.pdf	25/09/2017	
Orçamentos dos fornecedores/representantes autorizados	Análise	kit alfa defensina e PETRM.zip	19/09/2017	
Parque de equipamentos	Análise	infraestrutura3.pdf	31/10/2017	
Planos de atividades individuais para cada bolsa de treinamento técnico e/ou participação	Análise	Não se Aplica		
Projeto de pesquisa (auxílio)	Análise	protocoloPETFAPESP.pdf	20/09/2017	
Resultados de auxílios anteriores	Análise	finalização projeto Demange.pdf	19/09/2017	
Súmula curricular de cada um dos pesquisadores associados	Análise	sumulas.zip	20/09/2017	
Súmula curricular do beneficiário	Análise	Su_mula Curricular Demange.pdf	20/09/2017	

1.2 Outros Documentos Anexados na Proposta Atual (Proposta Inicial submetida em 07/12/2017)

Nenhum documento associado.

1.3 Documentos Anexados pela FAPESP na Proposta Atual (Proposta Inicial submetida em 07/12/2017)

Nenhum documento associado.

Observações / Manifestações**Observações****Histórico de Eventos****Histórico de Eventos**

Descrição	Data
Assinatura da FAPESP Registrada - Contrato Inicial	09/05/2018
Assinatura do Outorgado Registrada - Contrato Inicial	09/05/2018
Análise da Minuta Concluída - Contrato Inicial	26/04/2018
Preparação da Minuta Concluída - Contrato Inicial	09/04/2018
Análise da habilitação concluída com resultado "Habilitado" - Contrato Inicial	09/04/2018
Pendências de Contratação Respondidas	06/04/2018
Análise da habilitação concluída com resultado "Com Pendência(s)" - Contrato Inicial	05/04/2018
Aceite da Concessão com resultado "Aprovado"	27/03/2018
Resultado de Despacho Científico Divulgado - Proposta Inicial	27/03/2018
Emissão de Despacho Científico Concluída - Proposta Inicial	27/03/2018
Preparação de Despacho Científico Concluída - Proposta Inicial	26/03/2018
Pré-Preparação de Despacho Científico Concluída - Proposta Inicial	22/03/2018
Despacho Científico Iniciado - Proposta Inicial	22/03/2018
Recomendação da Coordenação Adjunta Concluída - Proposta Inicial	22/03/2018
Recomendação da Coordenação de Área/Programa Concluída - Proposta Inicial	12/03/2018
Parecer de Assessor ad-hoc Emitido - Proposta Inicial	21/02/2018
Solicitação enviada a Assessor ad-hoc para emissão de parecer - Proposta Inicial	22/01/2018
Indicação de Assessor ad-hoc Concluída - Proposta Inicial	22/01/2018
Habilitação Iniciada - Proposta Inicial	13/12/2017
Submissão da Solicitação - Proposta Inicial	07/12/2017

Anexo F – Ficha do Aluno

19/11/2021 18:26

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
FICHA DO ALUNO

5140 - 2930738/1 - Rodrigo Calil Teles Abdo

Email: rodrigoabdo@usp.br
Data de Nascimento: 26/02/1978
Cédula de Identidade: RG - 21.334.616-3 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Médico - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2003

Curso: Doutorado Direto
Programa: Ciências do Sistema Musculoesquelético
Data de Matrícula: 14/09/2017
Início da Contagem de Prazo: 14/09/2017
Data Limite para o Depósito: 09/09/2022
Orientador: Prof(a). Dr(a). Marco Kawamura Demange - 14/09/2017 até 07/02/2018. Email: demange@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). José Ricardo Pécora - 08/02/2018 até o presente. Email:
Proficiência em Línguas: Inglês, 14/09/2017
Trancamento(s): 360 dias
Período de 08/01/2020 até 05/07/2020
Período de 11/07/2019 até 06/01/2020
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 15/10/2020
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 14/09/2017
Trancado em 11/07/2019
Trancado em 08/01/2020
Mudança de Nível/Curso em 13/08/2020

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 12/07/2021

Impresso em: 19/11/2021 18:26:07

19/11/2021 18:26

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina

FICHA DO ALUNO

5140 - 2930738/1 - Rodrigo Calil Teles Abdo

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MPT5795-2/2	Bases Éticas, Metodológicas e Gerenciais em Pesquisa	02/03/2018	14/06/2018	225	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
MPT5776-3/3	Introdução a Inteligência Artificial em Biomedicina I	14/03/2018	26/06/2018	75	5	100	A	N	Concluída
MPT5740-5/5	Telemedicina	13/04/2018	07/06/2018	120	8	95	A	N	Concluída
MOT5742-2/1	Aplicação da Metodologia Científica na Pesquisa do Aparelho Locomotor	03/08/2018	15/11/2018	120	8	92	A	N	Concluída
MOT5744-1/2	Ciência do Sistema Músculo-Esquelético Baseada em Evidências	29/03/2021	20/06/2021	120	8	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	15	24	29
Estágios:			
Total:	15	24	29

Créditos Atribuídos à Tese: 176

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 12/07/2021

Impresso em: 19/11/2021 18:26:07

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Sadigursky D, Pires HS, Rios SAC, Rodrigues Filho FLB, Queiroz GC de, Azi ML. Profilaxia com descolonização nasal em pacientes submetidos a artroplastia total de joelho e quadril: revisão sistemática com metanálise. *Revista Brasileira de Ortopedia* 2017;52(6):631–637.
2. Inacio MCS, Paxton EW, Graves SE, Namba RS, Nemes S. Projected increase in total knee arthroplasty in the United States - an alternative projection model. *Osteoarthritis Cartilage* 2017;25(11):1797–1803.
3. Blom AW, Brown J, Taylor AH, Pattison G, Whitehouse S, Bannister GC. Infection after total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br* 2004;86(5):688–691.
4. Son M-S, Lau E, Parvizi J, Mont MA, Bozic KJ, Kurtz S. What Are the Frequency, Associated Factors, and Mortality of Amputation and Arthrodesis After a Failed Infected TKA? *Clin Orthop Relat Res* 2017;475(12):2905–2913.
5. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *J Arthroplasty* 2012;27(8 Suppl):61–5.e1.
6. Parvizi J, Gehrke T. Definition of Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty* 2014;29(7):1331.
7. Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Parvizi J. Diagnosing periprosthetic joint infection: has the era of the biomarker arrived? *Clin Orthop Relat Res* 2014;472(11):3254–3262.

8. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985;76(4):1427–1435.
9. Chalifour A, Jeannin P, Gauchat J-F, Blaecke A, Malissard M, N’Guyen T, et al. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 2004;104(6):1778–1783.
10. Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Parvizi J. 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):1439–1445.
11. Shohat N, Bauer T, Buttaro M, Budhiparama N, Cashman J, Della Valle CJ, et al. What is the Definition of a Periprosthetic Joint Infection (PJI) of the Knee and the Hip? Can the Same Criteria be Used for Both Joints?: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. *J Arthroplasty* [Epub ahead of print].
12. Mariani BD, Tuan RS. Advances in the diagnosis of infection in prosthetic joint implants. *Mol Med Today* 1998;4(5):207–213.
13. Kurtz SM, Ong KL, Lau E, Widmer M, Maravic M, Gómez-Barrena E, et al. International survey of primary and revision total knee replacement. *Int Orthop* 2011;35(12):1783–1789.
14. Maradit Kremers H, Larson DR, Crowson CS, Kremers WK, Washington RE, Steiner CA, et al. Prevalence of Total Hip and Knee Replacement in the United States. *J Bone Joint Surg Am* 2015;97(17):1386–1397.

-
15. Ferreira M de C, Oliveira JCP, Zidan FF, Franciozi CE da S, Luzo MVM, Abdalla RJ. Artroplastia total de joelho e quadril: a preocupante realidade assistencial do Sistema Único de Saúde brasileiro. *Revista Brasileira de Ortopedia* 2018;53(4):432–440.
 16. Pulido L, Ghanem E, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466(7):1710–1715.
 17. Cochran AR, Ong KL, Lau E, Mont MA, Malkani AL. Risk of Reinfection After Treatment of Infected Total Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty* 2016;31(9 Suppl):156–161.
 18. Mortazavi SMJ, Schwartzenger J, Austin MS, Purtill JJ, Parvizi J. Revision total knee arthroplasty infection: incidence and predictors. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468(8):2052–2059.
 19. Cuckler JM, Star AM, Alavi A, Noto RB. Diagnosis and management of the infected total joint arthroplasty. *Orthop Clin North Am* 1991;22(3):523–530.
 20. Spangehl MJ, Masri BA, O’Connell JX, Duncan CP. 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):672–683.
 21. Parvizi J, Ghanem E, Menashe S, Barrack RL, Bauer TW. Periprosthetic infection: what are the diagnostic challenges? *J Bone Joint Surg Am* 2006;88 Suppl 4:138–147.
 22. Schinsky MF, Della Valle CJ, Sporer SM, Paprosky WG. Perioperative testing for joint infection in patients undergoing revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90(9):1869–1875.
-

23. Parvizi J, Ghanem E, Sharkey P, Aggarwal A, Burnett RSJ, Barrack RL. Diagnosis of infected total knee: findings of a multicenter database. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466(11):2628–2633.
24. Parvizi J, Jacovides C, Zmistowski B, Jung KA. Definition of Periprosthetic Joint Infection: Is There a Consensus? *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 2011;469(11):3022–3030.
25. Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, Bauer TW, Springer BD, Della Valle CJ, et al. New Definition for Periprosthetic Joint Infection: From the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin Orthop Relat Res* 2011;469(11):2992–2994.
26. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, Rao N, et al. Infectious Diseases Society of America. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2013;56(1):e1–e25.
27. Ochsner PE, Borens O, Bodler P-M, Schweizerische Gesellschaft für Orthopädie und Traumatologie. Infections of the musculoskeletal system : basic principles, prevention, diagnosis and treatment. 2014.
28. Renz N, Yermak K, Perka C, Trampuz A. Alpha Defensin Lateral Flow Test for Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: Not a Screening but a Confirmatory Test. *J Bone Joint Surg Am* 2018;100(9):742–750.
29. Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, Chen AF, et al. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty* 2018;33(5):1309–1314.e2.

-
30. McNally M, Sousa R, Wouthuyzen-Bakker M, Chen AF, Soriano A, Vogely HC, et al. The EBJIS definition of periprosthetic joint infection. *Bone Joint* 2021;103-B(1):18–25.
 31. Bilgen O, Atici T, Durak K, Karaeminoğullari, Bilgen MS. C-reactive protein values and erythrocyte sedimentation rates after total hip and total knee arthroplasty. *J Int Med Res* 2001;29(1):7–12.
 32. Shahi A, Parvizi J. The role of biomarkers in the diagnosis of periprosthetic joint infection. *EFORT Open Rev* 2016;1(7):275–278.
 33. Alijanipour P, Bakhshi H, Parvizi J. Diagnosis of periprosthetic joint infection: the threshold for serological markers. *Clin Orthop Relat Res* 2013;471(10):3186–3195.
 34. Berbari E, Mabry T, Tsaras G, Spangehl M, Erwin PJ, Murad MH, et al. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92(11):2102–2109.
 35. Greidanus NV, Masri BA, Garbuz DS, Wilson SD, McAlinden MG, Xu M, 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):1409–1416.
 36. Bottner F, Wegner A, Winkelmann W, Becker K, Erren M, Götze C. Interleukin-6, procalcitonin and TNF-alpha: markers of peri-prosthetic infection following total joint replacement. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89(1):94–99.
 37. Del Pozo JL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med* 2009;361(8):787–794.
-

-
38. Trampuz A, Hanssen AD, Osmon DR, Mandrekar J, Steckelberg JM, Patel R. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. *Am J Med* 2004;117(8):556–562.
 39. Ghanem E, Parvizi J, Burnett RSJ, Sharkey PF, Keshavarzi N, Aggarwal A, 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):1637–1643.
 40. Christensen CP, Bedair H, Della Valle CJ, Parvizi J, Schurko B, Jacobs CA. The natural progression of synovial fluid white blood-cell counts and the percentage of polymorphonuclear cells after primary total knee arthroplasty: a multicenter study. *J Bone Joint Surg Am* 2013;95(23):2081–2087.
 41. Dinneen A, Guyot A, Clements J, Bradley N. Synovial fluid white cell and differential count in the diagnosis or exclusion of prosthetic joint infection. *Bone Joint J* 2013;95-B(4):554–557.
 42. Parvizi J, Jacovides C, Antoci V, Ghanem E. Diagnosis of periprosthetic joint infection: the utility of a simple yet unappreciated enzyme. *J Bone Joint Surg Am* 2011;93(24):2242–2248.
 43. Mizukawa N, Sawaki K, Nagatsuka H, Kamio M, Yamachika E, Fukunaga J, et al. Human alpha-and beta-defensin immunoreactivity in oral mucoepidermoid carcinomas. *Anticancer Res* 2001;21(3C):2171–2174.
 44. Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y, Kono T. The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol* 2004;12(8):394–398.

-
45. Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Booth RE Jr, et al. The alpha-defensin test for periprosthetic joint infection outperforms the leukocyte esterase test strip. *Clin Orthop Relat Res* 2015;473(1):198–203.
 46. Shahi A, Parvizi J, Kazarian GS, Higuera C, Frangiamore S, Bingham J, et al. The Alpha-defensin Test for Periprosthetic Joint Infections Is Not Affected by Prior Antibiotic Administration. *Clin Orthop Relat Res* 2016;474(7):1610–1615.
 47. Bonanzinga T, Zahar A, Dütsch M, Lausmann C, Kendoff D, Gehrke T. How Reliable Is the Alpha-defensin Immunoassay Test for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection? A Prospective Study. *Clin Orthop Relat Res* 2017;475(2):408–415.
 48. Partridge DG, Gordon A, Townsend R. False-positive synovial fluid alpha-defensin test in a patient with acute gout affecting a prosthetic knee. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 2017;27(4):549–551.
 49. Berger P, Van Cauter M, Driesen R, Neyt J, Cornu O, Bellemans J. Diagnosis of prosthetic joint infection with alpha-defensin using a lateral flow device: a multicentre study. *Bone Joint J* 2017;99-B(9):1176–1182.
 50. Suen K, Keeka M, Ailabouni R, Tran P. Synovasure “quick test” is not as accurate as the laboratory-based α -defensin immunoassay: a systematic review and meta-analysis. *Bone Joint J* 2018;100-B(1):66–72.
 51. Ahmad SS, Hirschmann MT, Becker R, Shaker A, Ateschrang A, Keel MJB, et al. A meta-analysis of synovial biomarkers in periprosthetic joint infection: Synovasure™ is less effective than the ELISA-based alpha-

-
- defensin test. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2018;26(10):3039–3047.
52. Plate A, Stadler L, Sutter R, Anagnostopoulos A, Frustaci D, Zbinden R, et al. Inflammatory disorders mimicking periprosthetic joint infections may result in false-positive α -defensin. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(11):1212.e1–1212.e6.
53. Abdo RCT, Gobbi RG, Leite CBG, Pasoto SG, Leon EP, Lima ALLM, et al. Performance of alpha-defensin lateral flow test after synovial fluid centrifugation for diagnosis of periprosthetic knee infection. *World J Orthop* 2021;12(8):565–574.
54. Pace TB, Jeray KJ, Latham JT Jr. Synovial tissue examination by frozen section as an indicator of infection in hip and knee arthroplasty in community hospitals. *J Arthroplasty* 1997;12(1):64–69.
55. Tsaras G, Maduka-Ezeh A, Inwards CY, Mabry T, Erwin PJ, Murad MH, et al. Utility of intraoperative frozen section histopathology in the diagnosis of periprosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am* 2012;94(18):1700–1711.
56. Zhao X, Guo C, Zhao G-S, Lin T, Shi Z-L, Yan S-G. Ten versus five polymorphonuclear leukocytes as threshold in frozen section tests for periprosthetic infection: a meta-analysis. *J Arthroplasty* 2013;28(6):913–917.
57. Fink B, Makowiak C, Fuerst M, Berger I, Schäfer P, Frommelt L. The value of synovial biopsy, joint aspiration and C-reactive protein in the diagnosis of late peri-prosthetic infection of total knee replacements. *J Bone Joint Surg Br* 2008;90(7):874–878.
-

-
58. Meermans G, Haddad FS. Is there a role for tissue biopsy in the diagnosis of periprosthetic infection? *Clin Orthop Relat Res* 2010;468(5):1410–1417.
 59. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DWM, Simpson H, Peto TEA, et al. The Osiris Collaborative Study Group. Prospective Evaluation of Criteria for Microbiological Diagnosis of Prosthetic-Joint Infection at Revision Arthroplasty. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36(10):2932–2939.
 60. Berbari EF, Marculescu C, Sia I, Lahr BD, Hanssen AD, Steckelberg JM, et al. Culture-negative prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis* 2007;45(9):1113–1119.
 61. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 2007;357(7):654–663.
 62. Malekzadeh D, Osmon DR, Lahr BD, Hanssen AD, Berbari EF. Prior use of antimicrobial therapy is a risk factor for culture-negative prosthetic joint infection. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468(8):2039–2045.
 63. Yoon H-K, Cho S-H, Lee D-Y, Kang B-H, Lee S-H, Moon D-G, et al. A Review of the Literature on Culture-Negative Periprosthetic Joint Infection: Epidemiology, Diagnosis and Treatment. *Knee Surg Relat Res* 2017;29(3):155–164.
 64. Bori G, Soriano A, García S, Gallart X, Mallofre C, Mensa J. Neutrophils in frozen section and type of microorganism isolated at the time of resection arthroplasty for the treatment of infection. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009;129(5):591–595.
-

65. Benito N, Mur I, Ribera A, Soriano A, Rodríguez-Pardo D, Sorlí L, et al. REIPI (Spanish Network for Research in Infectious Disease) Group for the Study of Prosthetic Joint Infections / GEIO (Group for the Study of Osteoarticular Infections), SEIMC (Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiolo. The Different Microbial Etiology of Prosthetic Joint Infections according to Route of Acquisition and Time after Prosthesis Implantation, Including the Role of Multidrug-Resistant Organisms. *J Clin Med Res*;8(5.):
66. Goswami K, Parvizi J, Maxwell Courtney P. Current Recommendations for the Diagnosis of Acute and Chronic PJI for Hip and Knee-Cell Counts, Alpha-Defensin, Leukocyte Esterase, Next-generation Sequencing. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2018;11(3):428–438.
67. Keating EM, Meding JB, Faris PM, Ritter MA. Long-term followup of nonmodular total knee replacements. *Clin Orthop Relat Res* 2002;(404):34–39.
68. Ma H-M, Lu Y-C, Ho F-Y, Huang C-H. Long-Term Results of Total Condylar Knee Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty* 2005;20(5):580–584.
69. Kelly MA, Clarke HD. Long-term results of posterior cruciate-substituting total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2002;(404):51–57.
70. Sando T, McCalden RW, Bourne RB, MacDonald SJ, Somerville LE. Ten-year results comparing posterior cruciate-retaining versus posterior cruciate-substituting total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 2015;30(2):210–215.

-
71. Math KR, Scheider R. Imaging of the Painful TKR. In: Scuderi GR, Tria AJ, Eds. *Surgical Techniques in Total Knee Arthroplasty*. New York, NY: Springer New York; 2002. p 351–367.
 72. Bonanzinga T, Ferrari MC, Tanzi G, Vandebulcke F, Zahar A, Marcacci M. The role of alpha defensin in prosthetic joint infection (PJI) diagnosis: a literature review. *EFORT Open Rev* 2019;4(1):10–13.
 73. Springer BD, Cahue S, Etkin CD, Lewallen DG, McGrory BJ. Infection burden in total hip and knee arthroplasties: an international registry-based perspective. *Arthroplast Today* 2017;3(2):137–140.
 74. Ahmed SS, Haddad FS. Prosthetic joint infection. *Bone Joint Res* 2019;8(11):570–572.
 75. Kuiper JWP, Verberne SJ, Vos SJ, van Egmond PW. Does the Alpha Defensin ELISA Test Perform Better Than the Alpha Defensin Lateral Flow Test for PJI Diagnosis? A Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Studies. *Clin Orthop Relat Res* 2020;478(6):1333–1344.
 76. Bingham J, Clarke H, Spangehl M, Schwartz A, Beauchamp C, Goldberg B. The alpha defensin-1 biomarker assay can be used to evaluate the potentially infected total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2014;472(12):4006–4009.
 77. Hoofnagle AN, Wener MH. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *J Immunol Methods* 2009;347(1-2):3–11.
 78. Kim HS, Choi AR, Yang M, Oh EJ. EDTA Treatment for Overcoming the Prozone Effect and for Predicting C1q Binding in HLA Antibody Testing. *Ann Lab Med* 2019;39(6):572–576.
-

-
79. Shahi A, Deirmengian C, Higuera C, Chen A, Restrepo C, Zmistowski B, et al. Premature Therapeutic Antimicrobial Treatments Can Compromise the Diagnosis of Late Periprosthetic Joint Infection. *Clin Orthop Relat Res* 2015;473(7):2244–2249.
 80. Goh GS, Parvizi J. Think Twice before Prescribing Antibiotics for That Swollen Knee: The Influence of Antibiotics on the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *Antibiotics (Basel)*;10(2.).
 81. Rothenberg AC, Wilson AE, Hayes JP, O'Malley MJ, Klatt BA. Sonication of Arthroplasty Implants Improves Accuracy of Periprosthetic Joint Infection Cultures. *Clin Orthop Relat Res* 2017;475(7):1827–1836.
 82. Scorzolini L, Lichtner M, Iannetta M, Mengoni F, Russo G, Panni AS, et al. Sonication technique improves microbiological diagnosis in patients treated with antibiotics before surgery for prosthetic joint infections. *New Microbiol* 2014;37(3):321–328.
 83. Barberán J. Management of infections of osteoarticular prosthesis. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:93–101.
 84. Qu X, Zhai Z, Li H, Li H, Liu X, Zhu Z, et al. PCR-based diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol* 2013;51(8):2742–2746.

APÊNDICES

APÊNDICES

Apêndice A – Manual do kit ELISA da alfa-defensina (HNP 1-3) da empresa Hycult Biotech® (Uden, Holanda)



HK317

HUMAN HNP1-3

ELISA KIT

PRODUCT INFORMATION & MANUAL

Read carefully prior to starting procedures!

ATTENTION

For use in laboratory research only
Not for clinical or diagnostic use

www.hycultbiotech.com
info@hycultbiotech.com

Edition 08-14
HK317

Note that this user protocol is not lot-specific and is representative for the current specifications of this product. Please consult the vial label and the Certificate of Analysis for information on specific lots. Also note that shipping conditions may differ from storage conditions.

For research use only. Not for use in or on humans or animals or for diagnostics. It is the responsibility of the user to comply with all local/state and federal rules in the use of this product. Hycult Biotech is not responsible for any patent infringements that might result from the use or derivation of this product.

TABLE OF CONTENTS

	Page
1. Intended use.....	2
2. Introduction.....	2
3. Kit features	2
4. Protocol overview	3
5. Kit components and storage instructions	4
Materials required but not provided	4
6. Warnings and precautions	5
7. Sample preparation	6
Collection and handling	6
Dilution procedures	6
8. Reagent preparation	7
9. ELISA protocol.....	9
10. Interpretation of results	10
11. Technical hints.....	10
12. Quality control.....	11
13. Troubleshooting.....	11
14. References	12

1. INTENDED USE

The human HNP1-3 (Neutrophil Defensins) ELISA kit is to be used for the *in vitro* quantitative determination of human HNP1-3 in plasma and cell culture supernatant samples. This kit is intended for laboratory research use only and is not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

The analysis should be performed by trained laboratory professionals.

2. INTRODUCTION

Human neutrophil defensins (alpha-defensins, HNP1-3) belong to the family of cationic trisulfide-containing microbicidal peptides. Besides microbicidal, the peptides exert chemotactic, immunomodulating and cytotoxic activity and participate in host defense and inflammation. Azurophilic granules of neutrophils contain human Neutrophil Peptide (HNP)-1-4 which are highly homologous. The three principal human defensins, HNP1-3, are unique to neutrophils and account for about 99 percent of the total defensin content of these cells. Measured amount of defensins is 3-5 mg per million human neutrophils.

Activation of neutrophils leads to rapid release of defensins. Thus, only one cell type, neutrophils, may be the source of HNP1-3 measured in plasma and other body fluids during infection and inflammation. In normal plasma low levels of HNP1-3 are present ranging from undetectable level to 50-100 ng/ml, while in septic conditions the levels of HNP1-3 might be elevated to 10 mg/ml and even more. Activation of neutrophils in blood as occurs during clotting, as well as long storage of anticoagulated blood leads to a release of HNP, thus careful plasma sampling is important for possible detection of HNP. Defensins are relatively resistant to proteolysis, low pH and boiling, but have a tendency to bind to a variety of materials, including plastic and proteins.

3. KIT FEATURES

- Working time of 3½ hours.
- Minimum concentration which can be measured is 156 pg/ml.
- Measurable concentration range of 156 to 10,000 pg/ml.
- Working volume of 100 µl/well.

Cross-reactivity

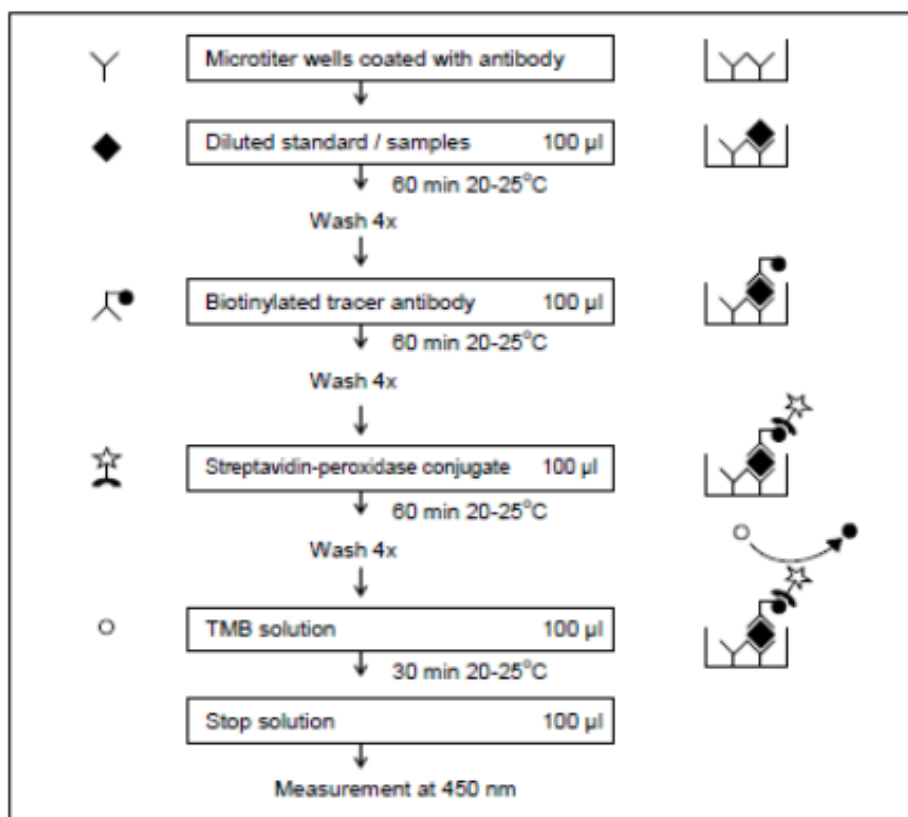
Potential cross-reacting proteins detected in the human HNP1-3 ELISA:

Cross reactant	Reactivity
Bovine	No
Dog	No
Goat	No
Horse	No
Mouse	No
Rabbit	No
Rat	No
Rhesus monkey	Strong
Plq	No
Sheep	No

Table 1

Cross-reactivity for other species or proteins/peptides has not been tested.

4. PROTOCOL OVERVIEW



- The human HNP1-3 ELISA is a ready-to-use solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay based on the sandwich principle with a working time of 3½ hours.
- The efficient format of a plate with twelve disposable 8-well strips allows free choice of batch size for the assay.
- Samples and standards are incubated in micro titer wells coated with antibodies recognizing human HNP1-3.
- Biotinylated tracer antibody will bind to captured human HNP1-3.
- Streptavidin-peroxidase conjugate will bind to the biotinylated tracer antibody.
- Streptavidin-peroxidase conjugate will react with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB).
- The enzyme reaction is stopped by the addition of oxalic acid.
- The absorbance at 450 nm is measured with a spectrophotometer. A standard curve is obtained by plotting the absorbance (linear) versus the corresponding concentrations of the human HNP1-3 standards (log).
- The human HNP1-3 concentration of samples, which are run concurrently with the standards, can be determined from the standard curve.

5. KIT COMPONENTS AND STORAGE INSTRUCTIONS

Kit component	Cat. #	Quantity HK317-01	Quantity HK317-02	Color code
Wash buffer 40x	WB01	1 vial (30 ml)	1 vial (30 ml)	Colorless
Dilution buffer 10x	DB90	1 vial (20 ml)	1 vial (20 ml)	Green
Sample dilution buffer 10x	PD55	1 vial (15 ml)	1 vial (15 ml)	Green
Standard		2 vials, lyophilized	4 vials, lyophilized	White
Tracer, biotinylated		1 vial, 1 ml lyophilized	2 vials, 1 ml lyophilized	White
Streptavidin-peroxidase 100x	CON03	1 tube, 0.25 ml in solution	1 tube, 0.25 ml in solution	Brown
TMB substrate	TMB050 / TMB100	1 vial (11 ml)	1 vial (22 ml)	Brown
Stop solution	STOP110	1 vial (22 ml)	1 vial (22 ml)	Red
12 Microtiter strips, pre-coated		1 plate	2 plates	
Certificate of Analysis		1	1	
Manual		1	1	
Data collection sheet		2	2	

Table 2

- Upon receipt, store individual components at 2 - 8°C. Do not freeze.
- Do not use components beyond the expiration date printed on the kit label.
- The standard and tracer in lyophilized form and the streptavidin-peroxidase in concentrated solution are stable until the expiration date indicated on the kit label, if stored at 2 - 8°C.
- The exact amount of the standard is indicated on the label of the vial and the Certificate of Analysis.
- The standard is single use. After reconstitution the standard cannot be stored.
- Once reconstituted the tracer is stable for 1 month if stored at 2 - 8°C.
- The streptavidin-peroxidase can only be stored in concentrated solution and is not stable when stored diluted.
- Upon receipt, foil pouch around the plate should be vacuum-sealed and unpunctured. Any irregularities to aforementioned conditions may influence plate performance in the assay.
- Return unused strips immediately to the foil pouch containing the desiccant pack and reseal along the entire edge of the zip-seal. Quality guaranteed for 1 month if stored at 2 - 8°C.

Materials required but not provided

- Calibrated micropipettes and disposable tips.
- Distilled or de-ionized water.
- Plate washer: automatic or manual.
- Polypropylene tubes.
- Calibrated ELISA plate reader capable of measuring absorbance at 450 nm.
- Adhesive covers can be ordered separately. Please contact your local distributor.
- Centrifuge for 1 ml tubes.

6. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For research use only, not for diagnostic or therapeutic use.
- This kit should only be used by qualified laboratory staff.
- Do not add under any circumstances sodium azide as preservative to any of the components.
- Do not use kit components beyond the expiration date.
- Do not mix reagents from different kits and lots. The reagents have been standardized as a unit for a given lot. Use only the reagents supplied by manufacturer.
- The assay has been optimized for the indicated standard range. Do not change the standard range.
- Open vials carefully: vials are under vacuum.
- It is advised to spin down streptavidin-peroxidase tubes before use.
- Do not ingest any of the kit components.
- Kit reagents contain 2-chloroacetamide as a preservative. 2-Chloroacetamide is harmful in contact with skin and toxic if swallowed. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.
- The TMB substrate is light sensitive, keep away from bright light. The solution should be colorless until use.
- The stop solution contains 2% oxalic acid and can cause irritation or burns to respiratory system, skin and eyes. Direct contact with skin and eyes should be strictly avoided. If contact occurs, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
- Incubation times, incubation temperature and pipetting volumes other than those specified may give erroneous results.
- Do not reuse micro wells or pour reagents back into their bottles once dispensed.
- Handle all biological samples as potentially hazardous and capable of transmitting diseases.
- Hemolyzed, hyperlipemic, heat-treated or contaminated samples may give erroneous results.
- Use polypropylene tubes for preparation of standard and samples. Do not use polystyrene tubes or sample plates.

7. SAMPLE PREPARATION

Collection and handling

Plasma

Please be aware that human HNP1-3 is released from neutrophils into serum in the process of blood coagulation. This will lead to false positive results. It is therefore advised to use 'careful plasma', which can be obtained as follows.

Keep freshly collected blood on ice. Within 20 minutes after blood sampling, separate plasma by centrifugation: 1500xg at 4°C for 15 min. Remove plasma and transfer to fresh polypropylene tube. Be careful to not disturb white cells in the buffy coat. Recentrifuge the transferred plasma in order to avoid every contamination with white blood cells (1500xg at 4°C for 15 min).

Note that most reliable results are obtained with heparin or EDTA plasma.

Storage

Store samples below -20°C, preferably at -70°C in polypropylene tubes. Storage at -20°C can affect recovery of human HNP1-3. Use samples within 24 hours after thawing. Avoid multiple freeze-thaw cycles which may cause loss of human HNP1-3 activity and give erroneous results.

Do not use hemolyzed, hyperlipemic, heat-treated or contaminated samples.

Before performing the assay, samples should be brought to room temperature (18 – 25°C) and mixed gently. Prepare all samples (controls and test samples) prior to starting the assay procedure. Avoid foaming.

Dilution procedures

HNP1-3 are highly absorbing to Ig, other proteins and plastics. Samples can only be measured accurately if diluted with supplied sample dilution buffer.

Plasma samples

Human HNP1-3 can be measured accurately if plasma samples are diluted at least 20x with supplied sample dilution buffer in polypropylene tubes.

Rhesus monkey plasma samples need to be diluted at least 4x for accurate measurement.

Note that most reliable results are obtained with heparin or EDTA plasma.

Remark regarding recommended sample dilution

The mentioned dilution for samples is a minimum dilution and should be used as a guideline. The recovery of human HNP1-3 from an undiluted sample is not 100% and may vary from sample to sample. When testing less diluted samples it is advisable to run recovery experiments to determine the influence of the matrix on the detection of human HNP1-3.

Do not use polystyrene tubes or sample plates for preparation or dilution of the samples.

Guideline for dilution of samples

Please see the table on the next page for recommended sample dilutions. Volumes are based on a total volume of at least 230 µl of diluted sample, which is sufficient for one sample in duplicate in the ELISA. For dilution of samples we recommend to use at least 10 µl of sample.

	Dilution	Pre-dilution	Amount of sample or pre-dilution required	Amount of Sample Dilution buffer required
1.	10x	Not necessary	25 µl (sample)	225 µl
2.	20x	Not necessary	15 µl (sample)	285 µl
3.	50x	Not necessary	10 µl (sample)	490 µl
4.	100x	Not necessary	10 µl (sample)	990 µl
5.	500x	Recommended: 10x (see nr.1)	10 µl (pre-dilution)	490 µl
6.	1000x	Recommended: 10x (see nr.1)	10 µl (pre-dilution)	990 µl
7.	2000x	Recommended: 20x (see nr.2)	10 µl (pre-dilution)	990 µl
8.	5000x	Recommended: 50x (see nr.3)	10 µl (pre-dilution)	990 µl

Table 3

8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to equilibrate to room temperature (20 – 25°C) prior to use. Return to proper storage conditions immediately after use.

Wash buffer

Prepare wash buffer by mixing 30 ml of 40x wash buffer with 1170 ml of distilled or de-ionized water, which is sufficient for 2 x 96 tests. In case less volume is required, prepare the desired volume of wash buffer by diluting 1 part of the 40x wash buffer with 39 parts of distilled or de-ionized water.

Dilution buffer

Prepare dilution buffer by mixing 20 ml of the 10x dilution buffer with 180 ml of distilled or de-ionized water, which is sufficient for 2 x 96 tests. In case less volume is required, prepare the desired volume of dilution buffer by diluting 1 part of the 10x dilution buffer with 9 parts of distilled or de-ionized water. Concentrated dilution buffer may contain crystals. In case the crystals do not disappear at room temperature within 1 hour, concentrated dilution buffer can be warmed up to 37°C. Do not shake the solution.

Sample dilution buffer

Prepare sample dilution buffer by mixing 15 ml of the 10x sample dilution buffer with 135 ml of prepared dilution buffer, which is sufficient for 2 x 96 tests. In case less volume is required, prepare the desired volume of sample dilution buffer by diluting 1 part of the 10x plasma dilution buffer with 9 parts of dilution buffer.

Standard solution

The standard is reconstituted by pipetting the amount of sample dilution buffer mentioned on the CoA in the standard vial. Use the standard vial as Tube 1 in Figure 1. Prepare each HNP1-3 standard in polypropylene tubes by serial dilution of the reconstituted standard with Sample dilution buffer as shown in Figure 1*. After reconstitution the standard cannot be stored for repeated use.

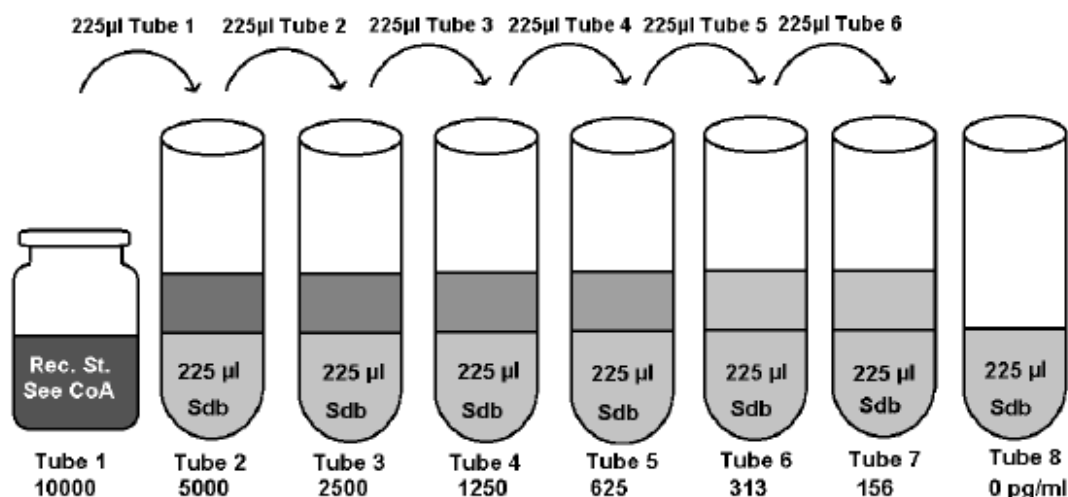


Figure 1

*) CoA: Certificate of Analysis, Rec. St: Reconstituted Standard, Sdb: Sample Dilution buffer

Tracer solution

The tracer is reconstituted by pipetting 1 ml distilled or de-ionized water. Dilute the reconstituted 1 ml tracer with 11 ml dilution buffer, which is sufficient for 1 x 96 tests. In case less volume is required, prepare the desired volume of tracer by diluting 1 part of the reconstituted tracer with 11 parts of dilution buffer.

Streptavidin-peroxidase solution

It is advised to spin down streptavidin-peroxidase tubes before use. Prepare the streptavidin-peroxidase solution by mixing 0.25 ml of the 100x streptavidin-peroxidase solution with 24.75 ml dilution buffer, which is sufficient for 2 x 96 tests. In case less volume is required, prepare the desired volume of streptavidin-peroxidase solution by diluting 1 part of the 100x streptavidin-peroxidase solution with 99 parts of dilution buffer.

9. ELISA PROTOCOL

Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use.

1. Determine the number of test wells required, put the necessary micro well strips into the supplied frame, and fill out the data collection sheet. Return the unused strips to the storage bag with desiccant, seal and store at 2 - 8°C.
2. Transfer 100 µl in duplicate of standard, samples, or controls into appropriate wells. Do not touch the side or bottom of the wells.
3. Cover the tray and tap the tray to eliminate any air bubbles. Be careful not to splash liquid onto the cover.
4. Incubate the strips or plate for 1 hour at room temperature.
5. Wash the plates 4 times with wash buffer using a plate washer or as follows*:
 - a. Carefully remove the plate sealer, avoid splashing.
 - b. Empty the plate by inverting plate and shaking contents out over the sink, keep inverted and tap dry on a thick layer of tissues.
 - c. Add 200 µl of wash buffer to each well, wait 20 seconds, empty the plate as described in 5b.
 - d. Repeat the washing procedure 5b/5c three times.
 - e. Empty the plate and gently tap on thick layer of tissues.
6. Add 100 µl of diluted tracer to each well using the same pipetting order as applied in step 2. Do not touch the side or bottom of the wells.
7. Cover the tray and incubate the tray for 1 hour at room temperature.
8. Repeat the wash procedure described in step 5.
9. Add 100 µl of diluted streptavidin-peroxidase to each well, using the same pipetting order as applied in step 2. Do not touch the side or bottom of the wells.
10. Cover the tray and incubate the tray for 1 hour at room temperature.
11. Repeat the wash procedure described in step 5.
12. Add 100 µl of TMB substrate to each well, using the same pipetting order as applied in step 2. Do not touch the side or bottom of the wells.
13. Cover the tray and incubate the tray for 30 minutes at room temperature. It is advised to control the reaction on the plate regularly. In case of strong development the TMB reaction can be stopped sooner. Avoid exposing the micro well strips to direct sunlight. Covering the plate with aluminium foil is recommended.
14. Stop the reaction by adding 100 µl of stop solution with the same sequence and timing as used in step 12. Mix solutions in the wells thoroughly by gently swirling the plate. Gently tap the tray to eliminate any air bubbles trapped in the wells.
15. Read the plate within 30 minutes after addition of stop solution at 450 nm using a plate reader, following the instructions provided by the instrument's manufacturer.

*) In case plate washer is used, please note: use of a plate washer can result in higher background and decrease in sensitivity. We advise validation of the plate washer with the manual procedure. Make sure the plate washer is used as specified for the manual method.

10. INTERPRETATION OF RESULTS

- Calculate the mean absorbance for each set of duplicate standards, control and samples.
- If individual absorbance values differ by more than 15% from the corresponding mean value, the result is considered suspect and the sample should be retested.
- The mean absorbance of the zero standard should be less than 0.3.
- Create a standard curve using computer software capable of generating a good curve fit. The mean absorbance for each standard concentration is plotted on the vertical (Y) axis versus the corresponding concentration on the horizontal (X) axis (logarithmic scale).
- If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.
- Samples that give a mean absorbance above the absorbance for the highest standard concentration are out of range of the assay. These samples should be retested at a higher dilution.

11. TECHNICAL HINTS

- User should be trained and familiar with ELISA assays and test procedure.
- If you are not familiar with the ELISA technique it is recommended to perform a pilot assay prior to evaluation of your samples. Perform the assay with a standard curve only following the instructions.
- Improper or insufficient washing at any stage of the procedure will result in either false positive or false negative results. Completely empty wells before dispensing wash buffer, fill with wash buffer as indicated for each cycle and do not allow wells to sit uncovered or dry for extended periods.
- Since exact conditions may vary from assay to assay, a standard curve must be established for every run. Samples should be referred to the standard curve prepared on the same plate.
- Do not mix reagents from different batches, or other reagents and strips. Remainders should not be mixed with contents of freshly opened vials.
- Each time the kit is used, fresh dilutions of standard, sample, tracer, streptavidin-peroxidase and buffers should be made.
- Caps and vials are not interchangeable. Caps should be replaced on the corresponding vials.
- To avoid cross-contaminations, change pipette tips between reagent additions of each standard, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
- The waste disposal should be performed according to your laboratory regulations.

Technical support

Do not hesitate to contact our technical support team at support@hycultbiotech.com for inquiries and technical support regarding the human HNP1-3 ELISA.

Hycult Biotech, Frontstraat 2a, 5405 PB Uden, the Netherlands

T: +31 (0)413 251 335, F: +31 (0)413 248 353

12. QUALITY CONTROL

The Certificate of Analysis included in this kit is lot specific and is to be used to verify results obtained by your laboratory. The absorption values provided on the Certificate of Analysis are to be used as a guideline only. The results obtained by your laboratory may differ.

This assay is designed to eliminate interference by soluble receptors, binding proteins, and other factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the Hycult Biotech immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.

For optimal performance of this kit, it is advised to work according to good laboratory practice.

13. TROUBLESHOOTING

Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged before expiry date of the product. A written complaint containing lot number of the product and experimental data shall be sent to support@hycultbiotech.com.

Suggestions summarized below in Table 3 can be used as guideline in case of unexpected assay results.

Low absorbance	High absorbance	Poor duplicates	All wells positive	All wells negative	Possible cause
•	•		•	•	Kit materials or reagents are contaminated or expired
•					Incorrect reagents used
•		•	•		Lyophilized reagents are not properly reconstituted
•	•	•	•	•	Incorrect dilutions or pipetting errors
•		•			Improper plastics used for preparation of standard and/or samples
•	•				Improper incubation times or temperature
		•			Especially in case of 37°C incubation: plates are not incubated uniformly
•					Assay performed before reagents were adapted to room temperature
•	•	•	•	•	Procedure not followed correctly
				•	Omission of a reagent or a step
		•			Poor mixing of samples
	•		•		Low purity of water
	•	•			Strips were kept dry for too long during/after washing
	•	•	•		Inefficient washing
	•	•			Cross-contamination from other samples or positive control
		•	•		TMB solution is not clear or colorless
•	•				Wrong filter in the micro titer reader
	•	•			Air bubbles
		•			Imprecise sealing of the plate after use
•					Wrong storage conditions
•					Lamp in microplate reader is not functioning optimally

Table 4

14. REFERENCES

1. Zhang, L et al; Contribution of human alpha-defensin-1, -2 and -3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* 2002, 298: 995
2. Chang, T et al; CAF-mediated human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transcriptional inhibition is distinct from alpha-defensin-1 HIV inhibition. *J Virol* 2003, 77: 6777
3. Espinoza, J et al; Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003, 13: 2
4. Nelsestuen, G et al; Proteomic identification of human neutrophil alpha-defensins in chronic lung allograft rejection. *Proteomics* 2005, 5: 1705
5. Baroncelli, S et al; Characterization of α -defensins plasma levels in *Macaca fascicularis* and correlations with virological parameters during SHIV89.6Pcy11 experimental infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007, 23: 287
6. Agratti, C et al; Activated V γ 9V δ 2 T cells trigger granulocyte functions via MCP-2 release. *J Immunol.* 2009, 182: 522
7. Keller, M et al; Phase I Randomized Safety Study of Twice Daily Dosing of Acidform Vaginal Gel: Candidate Antimicrobial Contraceptive. *PlosOne* 2012, 7:e46901
8. Levinson, P et al; HIV-Neutralizing Activity of Cationic Polypeptides in Cervicovaginal Secretions of Women in HIV Serodiscordant Relationships. *PlosOne* 2012, 7:e31996
9. Ramma, W et al; The elevation in circulating anti-angiogenic factors is independent of markers of neutrophil activation in preeclampsia. *Angiogenesis* 2012
10. Savilahti, E et al; Intestinal defensin secretion in infancy is associated with the emergence of sensitization and atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Allergy* 2012 42: 405