

滑液中PRTN3和MNDA诊断关节假体周围感染的效能:与 α -防御素的比较

刘铮^{1,2,3} 安浩铭^{1,2,4} 唐云皓^{1,2,3} 谷旺^{1,3} 高志森^{1,3} 李睿^{1,3} 柴伟^{1,3}

【摘要】 目的 检测关节滑液中标志物蛋白酶3(proteinase 3, PRTN3)和髓样细胞核分化抗原(myeloid nuclear differentiation antigen, MNDA)在关节假体周围感染(periprosthetic joint infection, PJI)诊断中的临床效能,并与传统标志物 α -defensin进行比较。方法 回顾性收集连续65例因怀疑PJI而进行髌膝关节诊断性穿刺病人的关节滑液标本。基于2014年肌肉骨骼感染协会(Musculoskeletal Infection Society, MSIS)标准,将29例纳入PJI组,36例纳入非PJI组。随后使用商用ELISA试剂盒检测关节滑液中的三种标志物水平。采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析评价所研究生物标志物的诊断效能,并计算各自的敏感度、特异度与截断值。结果 PJI组菌培养结果以葡萄球菌为主,占比31%,培养阴性病人占比34.5%。ROC分析结果显示,PRTN3的曲线下面积(area under the curve, AUC)最大,为0.984(95% CI, 0.961~1.000),其次是 α -defensin, AUC为0.944(95% CI, 0.888~1.000),最后为MNDA, AUC为0.849(95% CI, 0.755~0.943)。PRTN3的最佳截断值为318.000(ng/mL),敏感度为0.931,特异度为0.972。 α -defensin的最佳截断值为7.150(μ g/mL),敏感度为0.931,特异度为0.861。MNDA的最佳截断值为4.318(ng/mL),敏感度为0.862,特异度为0.722。结论 PRTN3和MNDA都是PJI的优秀生物标志物。PRTN3的诊断性能最好,甚至略优于 α -defensin。

【关键词】 关节假体周围感染;生物标志物;蛋白酶3;髓样细胞核分化抗原

Performance of Synovial Fluid PRTN3 and MNDA for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection: Comparison with the Use of α -defensin. Liu Zheng^{1,2,3}, An Haoming^{1,2,4}, Tang Yunhao^{1,2,3}, Gu Wang^{1,3}, Gao Zhisen^{1,3}, Li Rui^{1,3}, Chai Wei^{1,3}. ¹Senior Department of Orthopedics, the Fourth Medical Center of People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100048, China; ²Chinese People's Liberation Army Medical School, Beijing 100853, China; ³National Clinical Research Center for Orthopedics, Sports Medicine & Rehabilitation, Beijing 100853, China; ⁴School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

Corresponding authors: Li Rui, E-mail: ryanlee301@163.com;

Chai Wei, E-mail: chaiweiguanjie@sina.com

【Abstract】 Objective To verify the reliability of proteinase 3 (PRTN3) and myeloid nuclear differentiation antigen (MNDA) for diagnosing periprosthetic joint infection (PJI) via ELISA, and to compare with traditional biomarkers α -defensin. **Methods** A total of 65 consecutive specimens from patients with suspected PJI were included in this study. Based on the 2014 Musculoskeletal Infection Society (MSIS) criteria, 29 patients were included in the PJI group and 36 in the non-PJI group. Commercial ELISA kits were used to detect the biomarker levels in synovial fluid. The sensitivity and specificity of the biomarkers were analyzed, and receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the diagnostic performance of the investigated biomarkers. **Results** The PJI group was dominated by staphylococcus, accounting for 31%, and the negative culture patients accounted for 34.5%. PRTN3 had the highest area under the curve at 0.984 (95% CI, 0.961-1.000), followed by α -defensin and MNDA, with AUC of 0.944 (95% CI, 0.888-1.000) and 0.849 (95% CI, 0.755-0.943), respectively. The cutoff value of PRTN3 was 318.000 ng/mL, and its sensitivity and specificity were 0.931 and 0.972, respectively. The cutoff value of α -defensin was 7.150 μ g/mL, and its sensitivity and specificity were 0.931 and 0.861, respectively. The cutoff value of MNDA was 4.318 ng/mL, and

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2024.03.006

基金项目:国家自然科学基金(U22A20355)

作者单位:1. 解放军总医院第四医学中心骨科医学部,北京 100048;2. 解放军医学院,北京 100853;3. 国家骨科与运动康复临床医学研究中心,北京 100853;4. 南开大学,天津 300071

通信作者:李睿, E-mail: ryanlee301@163.com;柴伟, E-mail: chaiweiguanjie@sina.com

its sensitivity and specificity were 0.862 and 0.722, respectively. **Conclusion** Both PRTN3 and MNDA are excellent biomarkers for PJI. The PRTN3 has the best performance even slightly better than that of α -defensin.

【Key words】 Periprosthetic joint infection; Biomarkers; PRTN3; MNDA

关节假体周围感染(periprosthetic joint infection, PJI)是关节置换术后灾难性的并发症,在初次关节置换病人中发病率为1%~3%,在翻修病人中发病率为3%~5%^[1-3]。其多次四级手术联合大量抗生素使用的治疗模式常给病人带来严重的经济负担和健康影响。随着全球医疗卫生水平的进步以及人们对高品质生活需求的提高,近年来关节置换术的手术量不断增加^[4],然而,其感染率以每年近5%的速度增长^[5]。因此,PJI是当代关节外科医生必须面对的临床难题。准确的诊断是PJI治疗成功的先决条件,目前所有的诊断方法都存在一定的缺陷,临床医生必须结合多种实验室检验结果和临床体征来做出综合评估。也就是说,临床中没有任何一种方法可以独立准确地诊断PJI。因此,寻找新的PJI诊断标志物至关重要。

在课题组的一项临床研究中,利用质谱分析的方法对PJI病人和非PJI病人的关节滑液样本进行了蛋白质差异分析,结果表明蛋白酶3(proteinase 3, PRTN3)和髓样细胞核分化抗原(myeloid nuclear differentiation antigen, MNDA)是PJI诊断效能最佳的两种诊断标志物,对其诊断效能进行受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析,曲线下面积(area under the curve, AUC)分别为0.948 8和0.963 2;然而,当我们使用商用ELISA试剂盒重新检测这些关节滑液中标志物时,我们无法复刻相同的结果(PRTN3: AUC=0.690, 敏感度=88.6%, 特异度=45.0%; MNDA: AUC=0.932, 敏感度=77.1%, 特异度=97.5%)^[6]。在课题组的另一项研究中,基于反向平行监测法再次测试了这些标志物的PJI诊断能力,PRTN3和MNDA均表现出良好的诊断效能,MNDA和PRTN3的AUC分别为0.969(95% CI, 0.936~1.000)和0.900(95% CI, 0.844~0.956);合并MNDA和PRTN3作为PJI诊断模型时,AUC达到0.975(95% CI, 0.943~1.000)^[7]。这种差异引起了我们的注意,我们初步推测造成这种差异的可能原因如下:①采用的样本为非连续病例,与临床实际应用场景间存在差异;②在检测过程中,待测标本反复冻融,影响其中蛋白活性。因此,我们希望在获取于连续病例的新鲜关节滑液标本中再次测试这两种生物标志物的诊断能力。此外, α -defensin是被大多数关节

外科医生认可的优秀PJI诊断标志物^[8-10],并作为次要诊断标准被纳入了2018年国际共识会议(International Consensus Meeting, ICM)通过的ICM指南中^[11],但尚未有研究比较其与PRTN3、MNDA两种标志物诊断效能的优劣。因此,我们对这两种新的生物标志物的PJI诊断效能是否优于 α -defensin进行了探究。

综上所述,本研究的目的是:①基于ELISA检测方法,在新的连续病例关节滑液样本中测试PRTN3和MNDA的PJI诊断能力;②比较两种新的生物标志物与 α -defensin的PJI诊断能力差异。

资料与方法

一、纳入与排除标准

纳入标准:①年龄>18岁;②髌/膝关节置换术后病人;③因怀疑PJI而进行关节诊断性穿刺并成功获取关节滑液的病人。

排除标准:①穿刺前2周内接受过任何形式抗生素治疗的病人;②无法确诊PJI的病人;③基本信息不足的病人;④剩余关节滑液样本体积不足的病人;⑤诊断为全身性严重疾病的病人。

二、一般资料

本研究已获得解放军总医院第四医学中心伦理审查委员会批准(2023KY104-KS001)。在纳入的65例病人中,根据2014年肌肉骨骼感染协会(Musculoskeletal Infection Society, MSIS)标准诊断分为PJI组和非PJI组^[12],其中PJI组29人,非PJI组36人。PJI组与非PJI组在性别比例、年龄、身高、身体质量指数(body mass index, BMI)和手术部位方面差异无统计学意义;两组之间的红细胞沉降率(ESR)和C-反应蛋白(CRP)水平差异有统计学意义($P < 0.001$),详见表1。

三、关节滑液样本获取及处理

关节滑液样本由专业的关节外科医生在严格的无菌原则下,通过髌/膝关节诊断性穿刺术抽取,在抽出后立即于5 000 rpm条件下离心8 min,后取上清液于无菌冻存管内冻存在-80℃冰箱内。

四、关节滑液样本检测

通过第三方实验室(北京华大蛋白研发中心有限公司)的专业人员,按照商用ELISA试剂盒(Human α -Defensin 1 ELISA Kit, RD; Human Proteinase

变量	PJI组(29例)	非PJI组(36例)	$\chi^2(t)$ 值	P值
性别[例(%)]				
女	17(26.20)	27(41.50)	1.970	0.160
男	12(18.50)	9(13.80)		
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	66.31±10.09	65.64±10.84	0.256	0.799
BMI[$M(P_{25}, P_{75})$, kg/m ²]	25.30(23.46, 26.67)	25.655(23.51, 28.40)		0.460
手术部位[例(%)]				
膝	21(32.30)	24(36.90)	0.249	0.618
髌	8(12.30)	12(18.50)		
ESR[$M(P_{25}, P_{75})$, mm/h]	51.00(22.00, 74.00)	12.50(8.00, 23.00)		<0.001
CRP[$M(P_{25}, P_{75})$, mg/L]	17.22(7.34, 34.49)	2.71(1.00, 6.03)		<0.001

3/PRTN3 ELISA Kit, ABCAM; Human MNDA ELISA Kit, MYBIOSOURCE)说明书标明的详细步骤,进行关节滑液样本中 α -defensin, PRTN3 以及 MNDA 含量的测定。

五、统计学方法

采用 SPSS 13.0 (IBM 公司, 美国) 和 GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software 公司, 美国) 进行统计分析和作图。对于病人一般资料, 采用 Shapiro-Wilk 查验连续变量是否符合正态分布, 采用 Levene's test 查验方差齐性, 当数据满足正态分布和方差齐性检验, 两组比较采用独立样本 *t* 检验, 不满足正态分布, 两组比较采用 Wilcoxon。对于分类变量, 采用卡方检验进行组间比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。采用散点图和 ROC 曲线评估生物标志物的诊断能力, 计算其诊断敏感度、特异度并根据 Youden 指数判断最佳截断值。

结 果

PJI 组病人的细菌培养情况如图 1 所示, 其中以葡萄球菌属最为常见, 占比 31%, 细菌培养阴性病人占比 34.5%。

三种生物标志物的 ELISA 检测结果散点图见图 2。ROC 曲线结果显示, PRTN3 的 AUC 最高, 为 0.984 (95% CI, 0.961~1.000), 其次是 α -defensin 和 MNDA, AUC 分别为 0.944 (95% CI, 0.888~1.000) 和 0.849 (95% CI, 0.755~0.943), 见图 3。

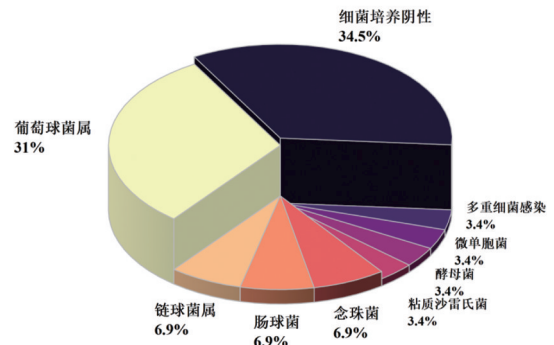


图1 PJI组病人细菌培养结果菌谱

根据 Youden 指数计算, PRTN3 的最佳截断值为 318.000 (ng/mL), 其敏感度和特异度分别为 0.931 (95% CI, 0.780~0.988) 和 0.972 (95% CI, 0.858~0.999)。 α -defensin 的最佳截断值为 7.150 (μ g/mL), 敏感度为 0.931 (95% CI, 0.780~0.988), 特异度为 0.861 (95% CI, 0.713~0.939)。MNDA 的最佳截断值为 4.318 (ng/mL), 其敏感度为 0.862 (95% CI, 0.694~0.945), 特异度为 0.722 (95% CI, 0.560~0.842), 见表 2。

讨 论

本研究首次将 PRTN3、MNDA 与 α -defensin 进行比较, 发现 PRTN3 的 PJI 诊断效能优于 α -defensin, 是极具前景的关节滑液中标志物。

在课题组的一项关节滑液标志物差异分析研究

标志物	AUC	95% CI 下限	95% CI 上限	最佳截断值	特异度	敏感度
α -defensin	0.944	0.888	1.000	7.150	0.861	0.931
PRTN3	0.984	0.961	1.000	318.000	0.972	0.931
MNDA	0.849	0.755	0.943	4.318	0.722	0.862

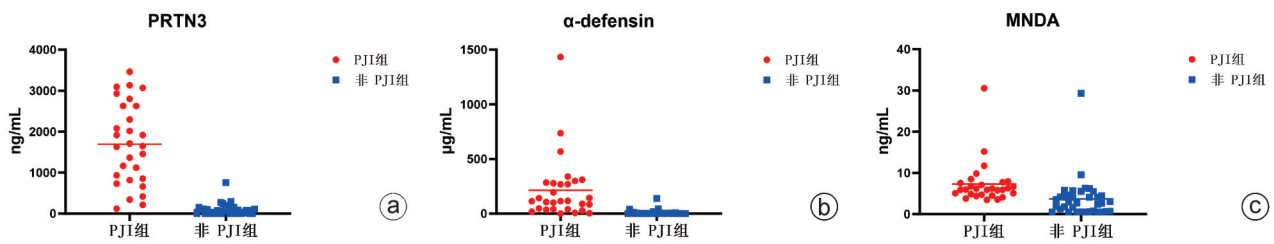


图2 关节滑液样本中三种标志物浓度 ELISA 检测结果散点图 a:PRTN3;b:α-defensin;c:MNDA

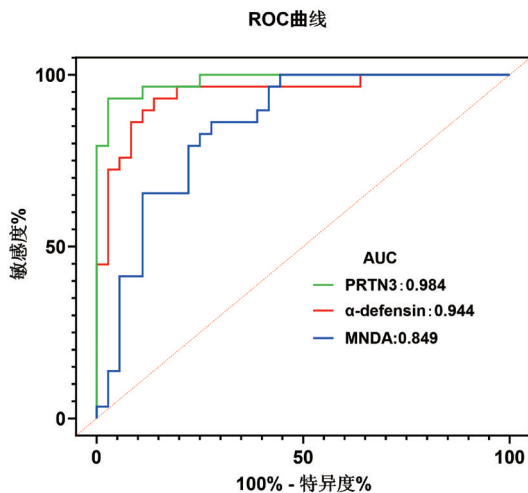


图3 三种标志物诊断PJI的ROC曲线

中,PRTN3和MNDA均表现出良好的PJI诊断能力,但ELISA验证结果却与之不符^[6]。然而,同样是ELISA检测方法,在本研究中PRTN3和MNDA对PJI表现出出色的诊断能力。我们认为造成这种差异的主要原因是使用了连续病例以及采用了新鲜的关节滑液标本没有经历重复冻融,同时我们更换了试验使用的ELISA商用试剂盒。此外,为了减少偏倚,ELISA操作是由第三方实验室完成的,他们没有任何关于样本诊断的信息。因此,相比于之前的研究,我们认为本次研究的结果更加可靠。

PRTN3具有较强的抗菌防御作用,它是三种造血红氨酸蛋白酶之一,大量储存在中性粒细胞的细胞质中,与细菌的防御有关^[13-14]。PRTN3对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌均有杀伤作用。其表面的正电荷使其能够牢固地与细菌的细胞膜结合。这种结合可以抑制细菌的蛋白质合成,并介导膜的去极化和解体。在中性粒细胞活化后,PRTN3可以将人抗菌肽(human cathelicidin antimicrobial peptide, Hcap)加工成其活化形式抗菌肽LL-37。该肽对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有广泛的抗菌活性,并与防御素具有协同抗菌作用^[15]。PRTN3可加工人中性粒细胞防御素-1(human neutrophil peptide-1,

HNP1)前体形成HNP1,参与嗜中性粒细胞的胞内吞噬,与活性氧结合,并帮助降解吞噬的微生物^[16]。此外,PRTN3还可以增强机体自身抗原的表达,参与多种疾病的生理调节^[17-18]。

MNDA是一种含有406个氨基酸的蛋白,在粒细胞、单核细胞谱系特异性表达^[19]。它与细胞分化有关,并受α干扰素特异性调节。已有研究表明,MNDA可能参与蛋白质之间的相互作用,并可与DNA结合以执行转录因子功能^[20]。此外,MNDA可在细胞质中积累,促进细胞凋亡。因此,它可能参与脓毒症等炎症反应的生理调节^[21]。

α-defensin是一种由中性粒细胞释放的抗菌肽,已被证明可以直接和间接地参与杀灭致病微生物^[22]。因其优异的诊断准确性^[23-24],被纳入2018年ICM国际共识。在该共识中,关节滑液中中性粒细胞相关检测结果,包括中性粒细胞计数、白细胞酯酶试纸检测和α-defensin检测三种指标,任意指标阳性即可计3分,当综合评分≥6分时,即可诊断感染^[25]。根据我们的研究结果显示,PRTN3的曲线下面积(AUC)最高,为0.984(95% CI,0.961~1.000),高于α-defensin的0.944(95% CI,0.888~1.000)。当PRTN3的截断值为318.000(ng/mL)时,其敏感度和特异度分别为0.931(95% CI,0.780~0.988)和0.972(95% CI,0.858~0.999);当α-defensin的截断值为7.150(μg/mL)时,敏感度为0.931(95% CI,0.780~0.988),特异度为0.861(95% CI,0.713~0.939)。相比经典感染诊断指标α-defensin,PRTN3的敏感度相似,而特异度提高,同时其诊断不受到致病菌种类的影响,同时在细菌培养阴性的样本中,亦体现了良好的诊断稳定性。因此,PRTN3或有被纳入下一诊断指南的潜力。

在本研究中,MNDA未能表现出预期的诊断价值,其AUC仅为0.849(95% CI,0.755~0.943),不及PRTN3与α-defensin。为何在ELISA中,MNDA的诊断效能不及质谱结果,其原因有待进一步明确。

我们的研究亦存有局限性。首先,我们的样品离心后冻存于-80℃冰箱,如直接使用新鲜关节滑液进行测试,结果是否适用还有待进一步明确。其次,本研究样本量不足,未来需要进行更大样本量的多中心研究以进一步证明其诊断能力。

综上所述,PRTN3和MND A都是PJI的优秀生物标志物,尤其是PRTN3的诊断效果甚至略优于 α -defensin,在进一步的临床试验探究其诊断价值后,或存在被纳入下一个诊断指南的潜力。

参 考 文 献

- [1] Delanois RE, Mistry JB, Gwam CU, et al. Current epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States [J]. *J Arthroplasty*, 2017, 32(9): 2663-2668.
- [2] Kurtz SM, Lau E, Watson H, et al. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States [J]. *J Arthroplasty*, 2012, 27(8 Suppl): 61-65.e1.
- [3] Phillips JE, Crane TP, Noy M, et al. The incidence of deep prosthetic infections in a specialist orthopaedic hospital: a 15-year prospective survey [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2006, 88(7): 943-948.
- [4] Huotari K, Peltola M, Jansen E. The incidence of late prosthetic joint infections: a registry-based study of 112,708 primary hip and knee replacements [J]. *Acta Orthop*, 2015, 86(3): 321-325.
- [5] Kurtz SM, Lau E, Schmier J, et al. Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States [J]. *J Arthroplasty*, 2008, 23(7): 984-991.
- [6] Wang C, Wang Q, Li R, et al. LTF, PRTN3, and MND A in synovial fluid as promising biomarkers for periprosthetic joint infection: identification by quadrupole orbital-trap mass spectrometry [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2019, 101(24): 2226-2234.
- [7] Li R, Song L, Quan Q, et al. Detecting periprosthetic joint infection by using mass spectrometry [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2021, 103(20): 1917-1926.
- [8] Deirmengian C, Kardos K, Kilmartin P, et al. The alpha-defensin test for periprosthetic joint infection outperforms the leukocyte esterase test strip [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2015, 473(1): 198-203.
- [9] Iorio R, Viglietta E, Mazza D, et al. Accuracy and cost-effectiveness of a novel method for alpha defensins measurement in the diagnosis of periprosthetic joint infections [J]. *J Arthroplasty*, 2021, 36(9): 3275-3281.
- [10] Ivy MI, Sharma K, Greenwood-quaintance KE, et al. Synovial fluid alpha defensin has comparable accuracy to synovial fluid white blood cell count and polymorphonuclear percentage for periprosthetic joint infection diagnosis [J]. *Bone Joint J*, 2021, 103-B(6): 1119-1126.
- [11] Parvizi J, Tan TL, Goswami K, et al. The 2018 definition of periprosthetic hip and knee infection: an evidence-based and validated criteria [J]. *J Arthroplasty*, 2018, 33(5): 1309-1314.e2.
- [12] Parvizi J, Gehrke T, International consensus group on periprosthetic joint I. Definition of periprosthetic joint infection [J]. *J Arthroplasty*, 2014, 29(7): 1331.
- [13] Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, et al. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases [J]. *Pharmacol Rev*, 2010, 62(4): 726-759.
- [14] Kessenbrock K, Frohlich L, Sixt M, et al. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating anti-inflammatory progranulin [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(7): 2438-2447.
- [15] Gollwitzer H, Dombrowski Y, Prodinger PM, et al. Antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines in periprosthetic joint infection [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2013, 95(7): 644-651.
- [16] Tongaonkar P, Golji AE, Tran P, et al. High fidelity processing and activation of the human alpha-defensin HNP1 precursor by neutrophil elastase and proteinase 3 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32469.
- [17] Chen DP, Aiello CP, McCoy DA, et al. PRTN3 variant correlates with higher autoantigen expression and increased relapse risk in PR3-ANCA versus MPO-ANCA disease [J]. *JCI Insight*, 2023, 8(4): e166107.
- [18] Saheb sharif-askari N, Saheb sharif-askari F, Ahmed SBM, et al. Enhanced expression of autoantigens during sars-cov-2 viral infection [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 686462.
- [19] Briggs JA, Burrus GR, Stickney BD, et al. Cloning and expression of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen: regulation by interferon alpha [J]. *J Cell Biochem*, 1992, 49(1): 82-92.
- [20] Xie J, Briggs JA, Olson MO, et al. Human myeloid cell nuclear differentiation antigen binds specifically to nucleolin [J]. *J Cell Biochem*, 1995, 59(4): 529-536.
- [21] Fotouhi-ardakani N, Kebir DE, Pierre-charles N, et al. Role for myeloid nuclear differentiation antigen in the regulation of neutrophil apoptosis during sepsis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182(3): 341-350.
- [22] Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils [J]. *J Clin Invest*, 1985, 76(4): 1427-1435.
- [23] Xie K, Qu X, Yan M. Procalcitonin and α -defensin for diagnosis of periprosthetic joint infections [J]. *J Arthroplasty*, 2017, 32(4): 1387-1394.
- [24] Ahmad SS, Hirschmann MT, Becker R, et al. A Meta-analysis of synovial biomarkers in periprosthetic joint infection: Synovasure™ is less effective than the ELISA-based alpha-defensin test [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2018, 26(10): 3039-3047.
- [25] Amanatullah D, Dennis D, Oltra EG, et al. Hip and knee section, diagnosis, definitions: proceedings of international consensus on orthopedic infections [J]. *J Arthroplasty*, 2019, 34(2S): S329-S337.

(收稿日期: 2024-03-11)

(本文编辑: 龚哲妮)

引用格式

刘铮, 安浩铭, 唐云皓, 等. 滑液中PRTN3和MND A诊断关节假体周围感染的效能: 与 α -防御素的比较 [J]. *骨科*, 2024, 15(3): 224-228. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2024.03.006.