

# Zeitschrift für Rheumatologie

Elektronischer Sonderdruck für  
V. Krenn

Ein Service von Springer Medizin

Z Rheumatol 2015 · 74:622–630 · DOI 10.1007/s00393-015-1571-8

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**B. Kölbl · S. Wienert · J. Dimitriadis · D. Kendoff · T. Gehrke · M. Huber · L. Frommelt · A. Tiemann ·  
K. Saeger · V. Krenn**

## CD15-Fokus-Score zur Diagnostik der periprothetischen Gelenkinfektion

Neutrophile-Granulozyten-Quantifizierungs-Modus und Entwicklung einer  
morphometrischen Software („CD15-Quantifier“)

Diese PDF-Datei darf ausschließlich für nichtkommerzielle  
Zwecke verwendet werden und ist nicht für die  
Einstellung in Repositorien vorgesehen – hierzu zählen  
auch soziale und wissenschaftliche Netzwerke und  
Austauschplattformen.

Z Rheumatol 2015 · 74:622–630  
 DOI 10.1007/s00393-015-1571-8  
 Online publiziert: 4. April 2015  
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Redaktion**

U. Müller-Ladner, Bad Nauheim  
 U. Lange, Bad Nauheim

B. Kölbl<sup>1</sup> · S. Wienert<sup>2</sup> · J. Dimitriadis<sup>3</sup> · D. Kendoff<sup>4</sup> · T. Gehrke<sup>4</sup> ·  
 M. Huber<sup>5</sup> · L. Frommelt<sup>6</sup> · A. Tiemann<sup>7</sup> · K. Saeger<sup>2</sup> · V. Krenn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zentrum für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik, Trier

<sup>2</sup> VMscope-Berlin

<sup>3</sup> Universität Trier

<sup>4</sup> HELIOS ENDO-Klinik, Hamburg

<sup>5</sup> Pathologisch-bakteriologisches Institut, Otto Wagner Spital, Wien

<sup>6</sup> Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie in Hamburg

<sup>7</sup> Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, SRH Zentralklinikum Suhl

## CD15-Fokus-Score zur Diagnostik der periprothetischen Gelenkinfektion

### Neutrophile-Granulozyten-Quantifizierungs-Modus und Entwicklung einer morphometrischen Software („CD15-Quantifier“)

#### Hintergrund und Fragestellung

In der Rheumapathologie und in der orthopädischen Pathologie, speziell in der Gelenkendoprothetik stellt die Differenzialdiagnostik von bakteriellen Infektionen eine große Herausforderung an die klinische Diagnostik und die Mikrobiologie dar. Die histopathologische Diagnostik, die sich nicht bzw. weniger am direkten Erregernachweis, sondern vielmehr an der Quantität und Qualität von neutrophilen Granulozyten (inflammatorische, immunologische Antwort des Gewebes, als infektionspathologisches Substrat) orientiert, spielt hier eine wesentliche Rolle [2, 3, 10, 18].

Dies gilt insbesondere bei bakteriellen Infektionen mit niedriger Quantität und Pathogenität, die durch einer geringfügige Infiltration durch neutrophile Granulozyten (NG) in der SLIM („synovial-like interface membrane“) gekennzeichnet sind. Insbesondere hier besteht die Differenzialdiagnose zu entzündlichen, nicht-infektiösen Erkrankungen der SLIM [2, 3, 10, 18]. Der diagnostischen Histopa-

thologie kommt eine wesentliche Bedeutung zu [2, 3, 10, 18]. Für die geringfügige Infiltration durch NG wird die Bezeichnung Low-grade-Infektion verwendet [18]. Gemäß aktuellen internationalen Kriterien ist die histopathologische Diagnostik ein Bestandteil der periprothetischen Infektion [18]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Quantität neutrophiler Granulozyten und einer bakteriellen Infektion besteht [1, 2, 3, 7, 10, 12]. Hierfür wurden diagnostische Kriterien definiert: In diesen Arbeiten wurden unterschiedliche Zählmodalitäten entwickelt, wobei sich das Zählen von neutrophilen Granulozyten unter verschiedenen Färbemethoden und in mehreren bzw. in vielen „High-Power-Fields“ (HPF) für die Infektionsdiagnostik durchgesetzt hat [1, 2, 3, 7, 10, 12]. Diese Modalitäten („viele HPF“) sind naturgemäß zeitaufwendig.

Ziel der vorliegenden Analyse war es, eine vergleichsweise vereinfachte Zählmodalität (einen Quantifizierungsmodus) für neutrophile Granulozyten in der SLIM zu entwickeln, der

- auf einem lokalisationsunabhängigen Zählmodus in einem einzigen Bildfeld beruht und somit die Lokalisation der neutrophilen Granulozyten (intravaskulär, extravaskulär) nicht berücksichtigt,
- sich an einer bzw. der spezifischen Eigenschaft von neutrophilen Granulozyten orientiert (CD15-Expression),
- dem Gesetz der Maximalausprägung folgt und
- eine hohe diagnostische Güte aufweist.

Auf Basis dieses vereinfachten und NG-spezifischen Quantifizierungsmodus sollte zusätzlich die Möglichkeit gegeben sein, eine automatische Software zu entwickeln, die den Konzentrations- und zeitaufwendigen Zählprozess reduziert.

## Material und Methode

### Untersuchungsmaterial und Patientenkollektiv

Die Entnahme der 3 bis 6 Gewebeproben erfolgte intraoperativ im Rahmen der histopathologischen Diagnostik von endoprothetischen Revisionsoperationen an Hüfte (n=59) oder Knie (n=32). Diese Studie entspricht einer konsekutiven Fallserie und beinhaltet keine Fallselektion und somit keine Stichprobenverzerrung. Die Gewebeproben stammen von 91 Patienten (42 weiblich und 49 männlich), das durchschnittliche Alter beträgt 67 Jahre (45 bis 88 Jahre).

### Histochemie

Die gesamten histochemischen und immunhistochemischen Methoden und Gewebeprozesse wurden in einem zertifizierten und akkreditierten Rahmen durchgeführt. Der Qualitätsstandard entsprach der DIN ISO/IEC 17020.

Nach Fixierung in Formalin (4%) wurden die Gewebeproben in Paraffin eingebettet. Die mikrotomierten Schnitte mit einer Schnittdicke von 1–3 µm wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Zusätzlich wurde eine Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Färbung vorgenommen.

### Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung erfolgt in einem vollautomatisierten Färbesystem (BenchmarkXT, IHC Slide Stainer der Marke Roche, Ventana Medical Solutions). Die Schnitte wurden zunächst mit Xylol und einer Ethanolreihe entparaffiniert. Dann wurde eine Zellkonditionierung unter Anwendung von Cell-Conditioning 1 (CC1) zunächst bei 95°C über 8 min durchgeführt, gefolgt von einer 30-minütigen milden Zellkonditionierung. Als primärer Antikörper wurde der Anti-CD15-Antikörper (Klon MMA, Roche, Basel, Schweiz) – ein monoklonaler Mausantikörper – verwendet (gebrauchsfertig, gemäß Roche unverdünnt). Der primäre Antikörper dient der spezifischen Identifikation von CD15NG. Die Schnitte wurden 32 min mit dem Antikörper inkubiert. DAB (3,3 Diaminobenzidin; DA-

KO Dänemark) wurde als Chromogen für die Reaktion mit der Peroxidase verwendet. Durch die vorherige Gabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde die endogene Peroxidase blockiert. Negativkontrollen wurden durch Auslassen des primären Antikörpers hergestellt.

### Auswertungsmodus der immunhistochemisch gefärbten Schnitte

Der quantifizierende Auswertungsmodus folgt dem Prinzip der fokalen Maximalinfiltration bei einer Lokalisationsunabhängigkeit der Zellen im Gewebe (Fokus). Initial erfolgt die diagnostische Bewertung gemäß der SLIM-Klassifikation im HE- und PAS-Schnittpräparat. Sodann wird das Areal gesucht, in dem die meisten CD15NG vorzufinden sind, in dem keine nodösen Finbrininsudationen nachweisbar sind. Der Fokus wird unter Verwendung des 20er-Objektivs eingestellt. Das Gesichtsfeld ist somit 200-fach vergrößert. Die Auszählung der Zellen in einem einzigen Gesichtsfeld erfolgt mittels digital gestützter interaktiver morphometrischer Analyse unter Verwendung eines Mikroskops der Marke Leica DM 2500 nach den Standards Microsystems Framework 2007. Das am Mikroskop eingestellte Gesichtsfeld wird auf den PC übertragen und auf dem Bildschirm ausgezählt. Die Zellen jeder Bildschirmfläche werden separat gezählt und anschließend addiert. Das Bildfeld am PC entspricht einem Präparatausschnitt von 0,6×0,5 mm (0,3 mm<sup>2</sup>). Das mikroskopische Bildfeld deckt komplett das Bildfeld des PC-Bildschirmes ab. Es werden sowohl intra- wie auch extravasculär lokalisierte neutrophile Granulozyten in die Auswertung mit einbezogen. Die definitive und richtige Abgrenzung der CD15NG, die eine farblich intensive, grobe granuläre Reaktivität mit einer Überdeckung von Zellkern und Zytoplasma aufweisen, von den CD15-positiven Makrophagen (farblich schwächere bräunliche, fein granuläre Reaktivität ohne vollkommene Überdeckung von Zellkern und Zytoplasma) ist zu berücksichtigen.

### Mikrobiologische Diagnostik

Vor der intraoperativen Entnahme von periprothetischen Gewebekulturen wur-

de eine mögliche Antibiotikagabe mindestens 1 Woche präoperativ gestoppt [13]. Die Inkubation der Proben erfolgte nach standardisierten Kriterien in einem mikrobiologischen Referenzlabor für einen Zeitraum von 14 Tagen und umfasste den Pilznachweis sowie anaerobe und aerobe Bakterien. Der mikrobiologische Befund gilt als positiv, wenn mindestens bei 2 Proben der gleiche Erreger nachgewiesen werden kann [18].

### Workflow der Bildanalyse

#### Softwareentwicklung des „CD15-Quantifiers“

Für die computergestützte Auswertung der Präparate wurde ein kürzlich publiziertes Verfahren auf Basis der Cognition Master-Plattform nach Wienert et al. 2012 [17] adaptiert. Der Workflow dieser Bildanalyse ist in **Abb. 1** dargestellt und basiert auf 2 sequenziell angewendeten Methoden

- der konturbasierten Objektsuche [17] und
- der CD15-Immun-Signal-Extraktion [14].

Der Workflow basiert auf folgendem Ablauf. Zunächst wird das Immuno-Signal (braun) mittels „Color Deconvolution“ aus dem Farbbild extrahiert. In diesem Intensitäts- (bzw. Graustufen-)Bild werden anschließend Objekte (d. h. Zellen) detektiert. Hier wird hauptsächlich der Intensitätsgradient verwendet, um die jeweils lokal prominenteste Zellkontur zu bestimmen, was in etwa der visuellen Wahrnehmung entspricht [14]. Dadurch ist eine definitive Abgrenzung der CD15NG (farblich intensive, grobe granuläre Reaktivität mit einer Überdeckung von Zellkern und Zytoplasma) von den CD15-positiven Makrophagen (farblich schwächere bräunliche Reaktivität ohne vollkommene Überdeckung von Zellkern und Zytoplasma) möglich. Hierdurch werden auf dieser bildverarbeitenden Ebene CD15NG von CD-positiven Makrophagen aussortiert. Die so spezifisch detektierten Zellen (CD15NG) werden mittels eines Schwellwerts in „Zelle“ und „Hintergrund“ klassifiziert und gezählt. Um die Ergebnisse des „CD15-Quantifiers“ vergleichbar zu machen, wird der Prozentsatz der Fläche,

B. Kölbl · S. Wienert · J. Dimitriadis · D. Kendoff · T. Gehrke · M. Huber · L. Frommelt · A. Tiemann · K. Saeger · V. Krenn  
**CD15-Fokus-Score zur Diagnostik der periprothetischen Gelenkinfektion. Neutrophile-Granulozyten-Quantifizierungs-Modus und Entwicklung einer morphometrischen Software („CD15-Quantifier“)**

**Zusammenfassung**

**Hintergrund.** Ziel der Arbeit war es, durch eine einfache Lokalisationsunabhängige mikroskopische Quantifizierung (extravaskulär vs. intravaskulär) von neutrophilen Granulozyten (NG) in einem Gesichtsfeld der SLIM („synovial-like interface membrane“) eine indirekte bakterielle Infektionsdiagnostik zu erarbeiten. Durch diesen vereinfachten Quantifizierungsmodus sollte die Möglichkeit gegeben sein, eine automatische Software zu entwickeln („CD15-Quantifier“), die den Arbeitsaufwand des konzentrations- und zeitaufwendigen Zählprozesses reduziert.

**Methoden.** Es wurden 91 intraoperativ im Rahmen einer Revisionsoperation entnommene SLIM (n=59 Hüfte, n=32 Knie) histopathologisch klassifiziert. Der quantifizierende Auswertungsmodus folgte dem Prinzip der fokalen Maximalinfiltration (Fokus) mit Bewertung eines Gesichtsfeldes (0,3 mm<sup>2</sup>).

Es wurde eine morphometrische Software („CD15-Quantifier“) entwickelt, die automatisch CD15NG quantifiziert.

**Ergebnisse.** Die SLIM-Fälle der Patienten mit positivem mikrobiologischem Befund (n=47) weisen signifikant ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test) mehr CD15NG/Fokus auf als die der Patienten mit einem negativen mikrobiologischen Befund (n=44). Als optimaler Schwellenwert bei der Diagnosestellung des periprothetischen Gelenkinfekts unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores wurden 50 CD15NG/Fokus ermittelt. Dient die mikrobiologische Diagnose als Goldstandard, beträgt die Sensitivität des Diagnostikums 0,83, die Spezifität 0,864 (positiv prädikativer Wert: 0,87; negativ prädikativer Wert: 0,83; Accuracy: 0,846; „area under the curve“: 0,878). Ab einer Zellzahl größer als 62 ist der „CD15-

Quantifier“ im Durchschnitt 32 s schneller als der Pathologe.

**Schlussfolgerung.** Der immunhistochemische CD15-Fokus-Score weist eine hohe diagnostische Güte auf und ermöglicht die Entwicklung einer Software „CD15-Quantifier“. Diese reduziert durch die Automatisierung den konzentrations- und zeitaufwendigen Prozess der mikroskopischen Zellauszählung und kann einen Beitrag zur standardisierten, histopathologischen Infektionsdiagnostik des periprothetischen Gelenkinfekts durch CD15NG-Quantifikation leisten.

**Schlüsselwörter**

Periprothetischer Gelenkinfekt · Konsensusklassifikation · Automatisierte Bildanalyse · Automatisierung · Quantifizierung

**CD15 focus score for diagnostics of periprosthetic joint infections. Neutrophilic granulocytes quantification mode and the development of morphometric software (CD15 quantifier)**

**Abstract**

**Background.** The aim of this project was to devise a quantification method for neutrophils within a single focal point through the development of a CD15 focus score which enables bacterial infections in synovial-like interface membranes (SLIM) to be diagnosed.

**Methods.** In this study a histopathological classification of 91 SLIM removed during revision surgery from the hips (n=59) and knees (n=32) was performed. Neutrophils were identified immunohistochemically by means of a CD15-specific monoclonal antibody. The quantitative evaluation of CD15-positive neutrophils (CD15Ne) used the principle of maximum focal infiltration (focus) together with an assessment of a single focal point (0.3 mm<sup>2</sup>). This immunohistochemical approach made it possible to develop the CD15 quantifier software, which automatically quantifies CD15Ne.

**Results.** The SLIM cases with positive microbiological findings (n=47) had significantly ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney U-test) more CD15Ne/focal point than cases with negative microbiological findings (n=44). A count of 50 CD15Ne/focal point was identified as the optimum threshold when diagnosing periprosthetic joint infections (PJI) using the CD15 focus score. If the microbiological findings are used as a gold standard, the diagnostic sensitivity is 0.83, and the specificity is 0.864 with a positive predictive value (PPV) of 0.87, a negative predictive value (NPV) of 0.83, an accuracy of 0.846 and an area under the curve (AUC) of 0.878. The evaluation of findings for the preparations using the CD15 quantifier software (n=31) deviated by an average of 12 cells from the histopathological evaluation findings (CD15 focus score). Above

a cell count of 62, the CD15-quantifier needs on average 32 s less than the pathologist.

**Conclusion.** The immunohistochemical CD15 focus score has a high diagnostic value and allowed the development of the CD15 quantifier software. This provides an automated procedure, which shortens the mentally tiring and time-consuming process of microscopic cell counting and thus makes a contribution towards the standardization of tools for diagnosing PJI.

**Keywords**

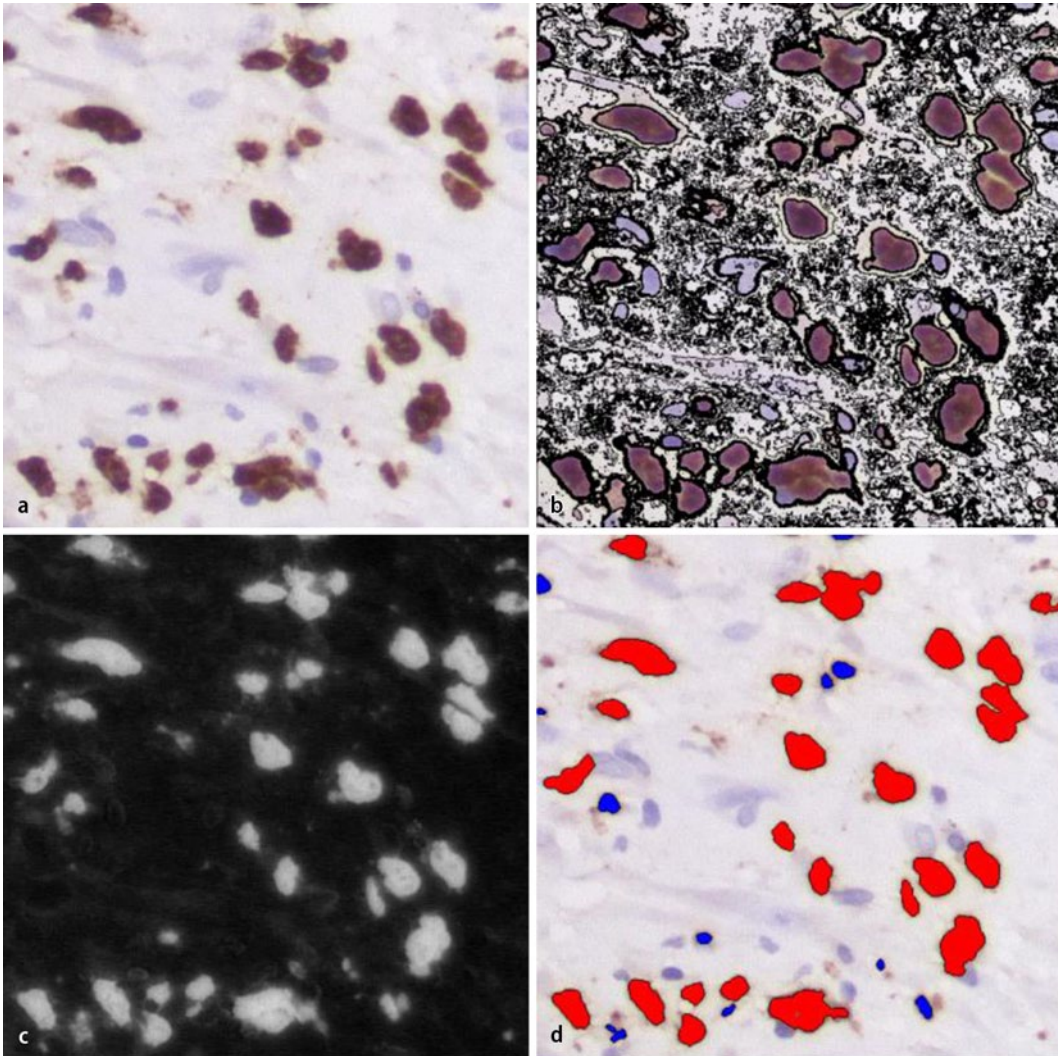
Periprosthetic joint infection · Automated image analysis · Automation · Consensus classification · Quantification

die durch CD15NG belegt ist, als Score verwendet. Ein CD15NG-Score von 100% liegt vor, wenn praktisch die gesamte Fläche mit neutrophilen Granulozyten ausgefüllt ist. Es wurde eine Auswahl an Präparaten getroffen, die zur Validierung des „CD15-Quantifiers“ verwendet wurden.

**Präparate mit niedrigem und hohem Schwierigkeitsgrad**

Dieses Kollektiv enthielt Präparate mit niedrigem und hohem Schwierigkeitsgrad. Der hohe Schwierigkeitsgrad wurde definiert durch Veränderungen wie Schnittdehiszenzen, Spaltraumbildun-

gen, Überlagerung von Schnittpräparatanteilen, unspezifischen Hintergrundreaktionen sowie hohem Makrophagenanteil. Die Präparatausschnitte für die Analyse durch die Software waren exakt die gleichen, die unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores ausgewertet wurden.



**Abb. 1** ◀ a–d Workflow der Bildanalyse in 4 Teilschritten. **a** Immunhistochemische CD15-Expression (neutrophile Granulozyten) in einem synovialen neutrophilen Granulozyteninfiltrat. **b** Ergebnis der konturbasierten Objektsuche gemäß der Methode nach Wienert et al. [17]. **c** CD15-Immun-Signal extrahiert gemäß der Methode nach Ruifrok et al. [14]. **d** Ergebnis der CD15<sup>+</sup>-Zelldetektion mit CD15<sup>+</sup>-Zellen (rot) und Zellfragmenten (blau), die aus der Analyse ausgeschlossen sind. Vergrößerung: Original 200:1

## Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit SPSS 17 (IBM, SPSS, Chicago, USA).

## Ergebnisse

### Patientenkollektiv

#### Mikrobiologische Befunde

##### Positiver mikrobiologischer Befund.

Durch die mikrobiologische Kultivierung der intraoperativ entnommenen Proben konnte bei 47 Patienten ein Keim nachgewiesen werden. Die Klassifizierung der Keime erfolgte in hoch und niedrig virulente bakterielle Erreger. Niedrig virulente bakterielle Erreger sind im Gegensatz zu hoch virulenten bakteriellen Erregern meistens Teil der physiologischen Flora.

Dieses Kollektiv umfasst 47 Patienten (23 weiblich, 24 männlich), das mittlere Alter beträgt 67 Jahre (45 bis 88 Jahre). Durch die Kultivierung der intraoperativ entnommenen Proben (n=28 aus der Hüfte, n=19 aus dem Knie) konnte ein Keim nachgewiesen werden. Bei 29 dieser Patienten wurde ein niedrig virulenter Erreger gefunden, und bei 14 Patienten wurde ein hoch virulenter Erreger für die Infektion verantwortlich gemacht. Bei den restlichen 4 Patienten wurden 2 Erreger nachgewiesen, es handelt sich um Mischinfektionen. Der Mittelwert der Endoprothesenstandzeit betrug etwa 2,3 Jahre, die Materialkombinationen umfassten Metall, Polyethylen und Keramik, Metall-Metall-Kombinationen lagen nicht vor.

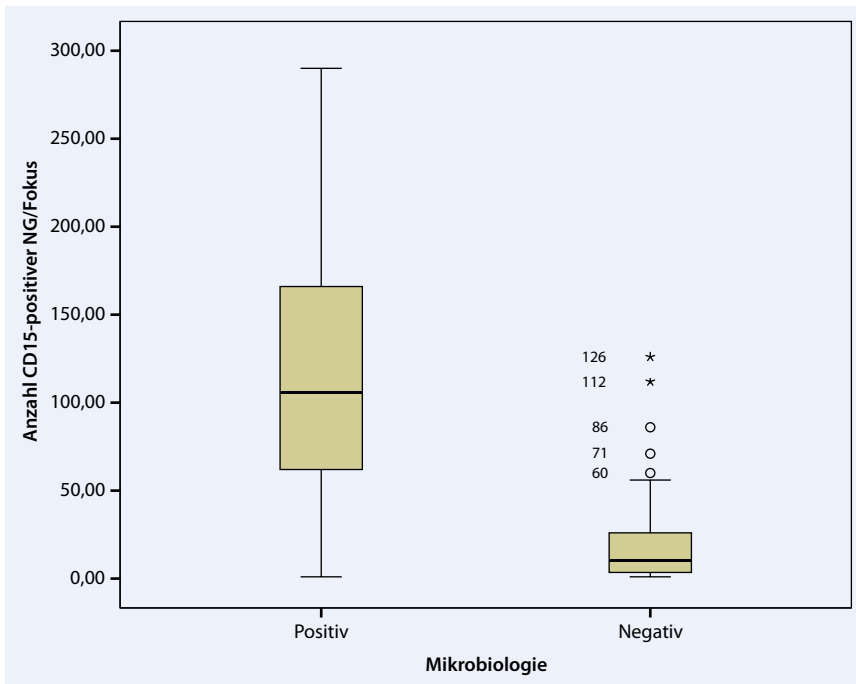
##### Negativer mikrobiologischer Befund.

Das Kollektiv setzt sich aus 44 Patienten (19 weiblich, 25 männlich) zusammen.

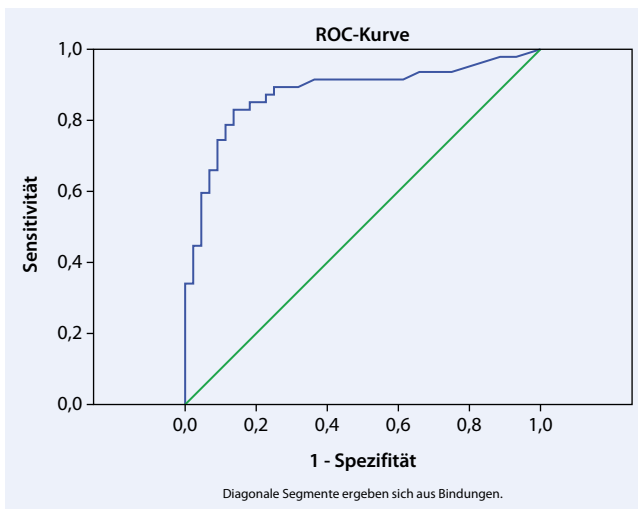
Das mittlere Alter beträgt 67 Jahre (47 bis 84 Jahre). Bei diesen Patienten konnte durch die Kultivierung der intraoperativ entnommenen Proben (n=31 Hüfte, n=13 Knie) kein Erreger nachgewiesen werden; der mikrobiologische Befund war negativ. Der Mittelwert der Endoprothesenstandzeit betrug etwa 10,3 Jahre die Materialkombinationen umfassten Metall, Polyethylen und Keramik, Metall-Metall-Kombinationen lagen nicht vor.

##### SLIM-Fälle, Typisierung gemäß der Konsensusklassifikation.

Die SLIM-Fälle wurden gemäß der Konsensusklassifikation diagnostisch bewertet. Die Diagnosen umfassten bei 30 Patienten Typ I (infektiöser Typ), bei 32 Typ II (Abriebtyp), bei 16 Typ III (kombinierter Typ), bei 13 Typ IV (indifferenter Typ).



**Abb. 2** ▲ CD15-Fokus-Score: CD15-positive neutrophile Granulozyten bei positivem und negativem mikrobiologischem Befund



**Abb. 3** ◀ ROC-Kurve: Mikrobiologie als Goldstandard

### CD15NG/Fokus bei mikrobiologisch positivem und negativem Befund

Der Mittelwert der Zellanzahl an CD15-positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus (CD15NG/Fokus) war bei den SLIM-Fällen des Kollektivs mit einem positiven mikrobiologischen Befund ( $n=47$ ) mit 112,5 Zellen größer als der Mittelwert der SLIM-Fälle des Kontrollkollektivs ( $n=44$ ) mit 21,9 Zellen (Boxplots zu diesen Kollektiven, **Abb. 2**). Die Differenz der Zellanzahl pro Fokus zwischen den beiden Kollektiven beträgt 91. Die

SLIM-Fälle des Kollektivs mit einem positiven mikrobiologischen Befund ( $n=47$ ) weisen signifikant ( $p < 0,0001$  Mann-Whitney-U-Test) mehr CD15NG/Fokus auf als die des Kontrollkollektivs ( $n=44$ ).

### Grenzwertermittlung: Anzahl an CD15NG/Fokus, um einen periprothetischen Gelenkinfekt zu diagnostizieren

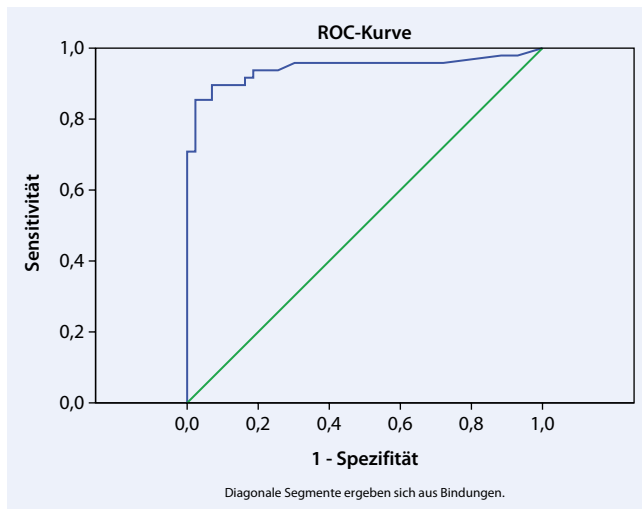
Zur Ermittlung der diagnostischen Wertigkeit des CD15-Fokus-Scores unter Verwendung eines Schwellenwerts bei der

Diagnosestellung des periprothetischen Gelenkinfekts wurde eine ROC-Kurve erstellt und zum einen die Mikrobiologie (**Abb. 3**), zum anderen die Kriterien der Konsensusklassifikation ([9, 10]; **Abb. 4**) als Goldstandard herangezogen. Die maximale Summe aus Sensitivität und Spezifität ergibt sich bei einem Schwellenwert von 50 CD15NG/Fokus. Fungiert der mikrobiologische Befund als Goldstandard, beträgt die Sensitivität 0,83, die Spezifität 0,864, die Summe aus beiden 1,694 [positiv prädikativer Wert (PPV): 0,87; negativ prädikativer Wert (NPV): 0,83; Accuracy: 0,846; „area under the curve“ (AUC): 0,878)]. Werden die Kriterien der Konsensusklassifikation als Goldstandard herangezogen, beträgt die Sensitivität 0,875, die Spezifität 0,93, die Summe aus beiden 1,805 (PPV: 0,93; NPV: 0,87; Accuracy: 0,901; AUC: 0,944).

### Vergleich der Auswertungszeiten: CD15NG/Fokus-Score und automatisierte Quantifikation „CD15-Quantifier“

Der Datensatz dieser Untersuchung stammt aus dem oben aufgeführten Kollektiv. In **Tab. 1** ist die Quantität der CD15NG, die mittels digital gestützter Morphometrie unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores sowie mithilfe des „CD15-Quantifiers“ (**Abb. 5, 6**) detektiert wurden, dargestellt. Der CD15-Fokus-Score wurde von einem erfahrenen Pathologen bestimmt, der die ermittelte Zellanzahl des „CD15-Quantifiers“ bis zum Ende der Untersuchung nicht kannte.

Bei einem Schwellenwert von 50 CD15NG/Fokus besteht bei keinem Präparat eine Unstimmigkeit der ermittelten Zellanzahl zwischen den beiden diagnostischen Methoden, die einen ausschlaggebenden Einfluss auf die Diagnosestellung (nichtinfektiös/infektiös) hat. Die mithilfe des CD15-Fokus-Scores ermittelte Zellanzahl weicht im Durchschnitt um 12 von dem ermittelten Wert des „CD15-Quantifiers“ ab. In **Tab. 1** ist auch die Zeit (pro Sekunden) aufgeführt, die beide Zählmodi benötigen, um das Präparat auszuwerten. Der „CD15-Quantifier“ braucht bei dem Kollektiv dieser Untersuchung maximal 32,7 s (Fallnum-



**Abb. 4** ◀ ROC-Kurve: Histopathologie (quantitative Kriterien,  $\geq 23/10$  "High-Power-Fields" gemäß Morawietz et al. [10]) als Goldstandard

mer 9), wohingegen der Pathologe 88 s benötigt (Fallnummer 16).

Ab einer Zellzahl größer als 62 ist bei diesem Kollektiv der „CD15-Quantifier“ immer schneller als der Pathologe. Bei einer Zellzahl unter 62 benötigt der Pathologe (mit Ausnahme von Fallnummer 29 und 31) weniger Zeit als der „CD15-Quantifier“. Bei dem vorliegenden Kollektiv würde somit der Pathologe unter Verwendung des automatisierten „CD15-Quantifiers“ für alle Präparate, die mehr als 62 CD15NG/Fokus aufweisen, pro Präparat 32 s Zeit sparen.

## Diskussion

### Anzahl an CD15NG/Fokus in der immunhistochemischen Auswertung

Die quantitative Auswertung der CD15NG/Fokus ergibt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test) zwischen den SLIM-Fällen, bei denen der mikrobiologische Befund positiv ( $n=47$ ) bzw. negativ ( $n=44$ ) ist.

Die beiden Patientenkollektive weisen weder bei Alter, Geschlecht, Größe des Kollektivs noch der Lokalisation der Probenentnahme nennenswerte Unterschiede auf. Der ermittelte CD15-Fokus-Score wurde bei jedem Präparat vom gleichen erfahrenen Pathologen überprüft. Daraus ist zu schließen, dass bei einer histopathologischen Untersuchung unter Verwendung des CD15-Fokus-Scores signifikant mehr neutrophile Granulozyten detektiert werden, wenn eine bakteriell-infektiöse Ätiologie des Prothesen-

versagens vorliegt, als wenn eine nichtinfektiöse Ursache zum Prothesenversagen führt. Diese Ergebnisse passen gut zu den Daten, die unter ähnlichen Bedingungen erhoben wurden [2, 10, 12].

### Grenzwertermittlung: Diagnose des periprotetischen Gelenkinfekts

Um die diagnostische Wertigkeit des CD15-Fokus-Scores unter Verwendung des oben genannten Schwellenwertes von 50 CD15NG/Fokus beurteilen zu können, wurden die Ergebnisse mit den Resultaten von Morawietz et al. [10] verglichen, da deren Resultate in der histopathologischen Diagnostik einen hohen Stellenwert besitzen. Um histologisch zwischen einem nichtinfektiösen und einem infektiösen Prothesenversagen unterscheiden zu können, wurde ein Schwellenwert von 23 neutrophilen Granulozyten pro 10 HPF festgelegt. Zur Untersuchung wurden dafür 147 SLIM-Fälle herangezogen. Das Patientenkollektiv der vorliegenden Untersuchung beträgt mit 91 Patienten etwas weniger als zwei Drittel des Patientenkollektivs von Morawietz et al. In unserer Untersuchung wurde der komplette Datensatz nach einer immunhistochemischen Färbung mit Anti-CD15-Antikörpern (Klon MMA, Roche, Basel, Schweiz) begutachtet, sodass die Ergebnisinterpretation auf der Auswertung von immunhistochemisch einheitlich angefärbten Präparaten beruht.

In der Studie von Morawietz et al. [10] wurde nur ein Teil der Präparate nach einer immunhistochemischen Färbung

begutachtet, in den restlichen Präparaten erfolgte die NG-Detektion nach durchgeführter PAS-Reaktion. Zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität des Diagnostikums von Morawietz et al. wurde als Goldstandard zum einen die klinische und zum anderen die mikrobiologische Diagnose herangezogen. Bei unserer Untersuchung diente neben dem mikrobiologischen Befund noch die Einteilung nach den Kriterien der Konsensusklassifikation als Goldstandard.

Da bei dieser wie auch bei der Arbeit von Morawietz et al. [10] unter anderem die Mikrobiologie als Goldstandard verwendet wurde, ist es sinnvoll, die Resultate miteinander zu vergleichen. Die Spezifität des diagnostischen Tests, der in dieser Arbeit vorgestellt wird (CD15-Fokus-Score), ist mit 86,4% zwar niedriger, die Sensitivität ist mit 83% jedoch höher als die von Morawietz et al. ermittelte (Spezifität: 95%, Sensitivität: 73%). Die Summe aus Sensitivität und Spezifität ist unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores mit 1,694 geringfügig höher als bei Morawietz et al. mit 1,68. Die Accuracy des diagnostischen Tests dieser Untersuchung ist mit 84,6% geringfügig niedriger als die von Morawietz et al. mit 86%, Gleiches gilt für die AUC, die mit 0,878 etwas niedriger ist als bei Morawietz et al. mit 0,881. Als zweiter Goldstandard wurde bei dieser Arbeit die Einteilung nach der Konsensusklassifikation verwendet. Da die diagnostischen Kriterien dabei grundlegend auf der Methode (23 NG pro 10 HPF) von Morawietz et al. basieren, wurde damit unser Diagnostikum mit dem von Morawietz et al. verglichen. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores ähnlich gute Werte bei Testverfahren, die etwas über die Güte des Diagnostikums aussagen, erzielt wurden wie bei Morawietz et al., wobei die Summe aus Sensitivität und Spezifität des CD15-Fokus-Scores höher ist.

### Bedeutung des CD15-Fokus-Scores

Da entzündliche Veränderungen heterogen ausgeprägt sind, wird bei der pathologischen Auswertung das Prinzip des „worst area grading“ verfolgt, das als Standardverfahren zur Diagnose neoplastischer und entzündlicher Erkrankungen

**Tab. 1** Auswertungszeiten: Vergleich und Gegenüberstellung von Auswertungszeit bei manueller Auszählung von CD15NG (CD15-Fokus-Score) und mithilfe der automatischen Software „CD15-Quantifier“

Fallnummer	Zellzahl CD15-Fokus-Score	Zellzahl „CD15-Quantifier“	Auswertungszeit CD15-Fokus-Score (in s)	Auswertungszeit „CD15-Quantifier“ (in s)	Schwierigkeitsgrad
1	1	1	1	18,2	1
2	62	67	21	22,5	1
3	9	8	4	18,6	1
4	92	100	34,5	23,4	1
5	181	167	67	27,0	2
6	1	1	1	17,8	1
7	140	115	52,1	20,1	1
8	50	52	16,2	21,3	2
9	238	275	86	32,7	2
10	138	156	46,1	25,7	1
11	107	107	43,1	24,2	2
12	8	43	5	20,1	2
13	84	85	34	24,5	1
14	206	171	72	29,2	1
15	23	17	7,3	18,3	2
16	231	202	88	28,0	1
17	95	98	38,2	24,0	1
18	219	160	81	28,7	2
19	256	227	82	31,9	1
20	141	176	43,3	9,8	2
21	96	96	34,1	8,6	1
22	109	116	39,5	7,9	1
23	83	63	28	7,8	1
24	4	4	1	5,5	1
25	8	20	7	8,7	2
26	6	9	5	7,4	2
27	2	2	2	7,1	1
28	1	2	3	5,8	1
29	44	36	14	7,8	1
30	15	13	7,5	7,9	1
31	16	13	8,2	8,0	1

gilt [5, 15]. Der CD15-Fokus-Score basiert auf diesem bereits erprobten diagnostischen Prinzip. Neben der hohen diagnostischen Güte sprechen weitere Vorzüge für die Anwendung des CD15-Fokus-Scores:

- Der CD15-Fokus-Score ist zeitsparend, da nur ein einziges Gesichtsfeld ausgezählt werden muss.
- Es handelt sich im Gegensatz zu anderen NG-Quantifikationen [10, 12] um einen lokalisationsunabhängigen Zählmodus. Die zeitaufwendige Lokalisation der neutrophilen Granulozyten (intravaskulär vs. extravaskulär) kann vernachlässigt werden.
- Im Gegensatz zu der bisher angewendeten Diagnostik wird nur ein Fokus gezählt. Im Gegensatz zu den HPF-basierten Zählmodi wird ein größeres Gesichtsfeld (0,6×0,5 mm/0,3 mm<sup>2</sup>) verwendet; somit wird ein repräsentatives Areal erfasst.
- Ein Vorzug des immunhistochemischen CD15-Fokus-Scores besteht in der Möglichkeit einer hierauf basierenden automatischen Quantifizierung.

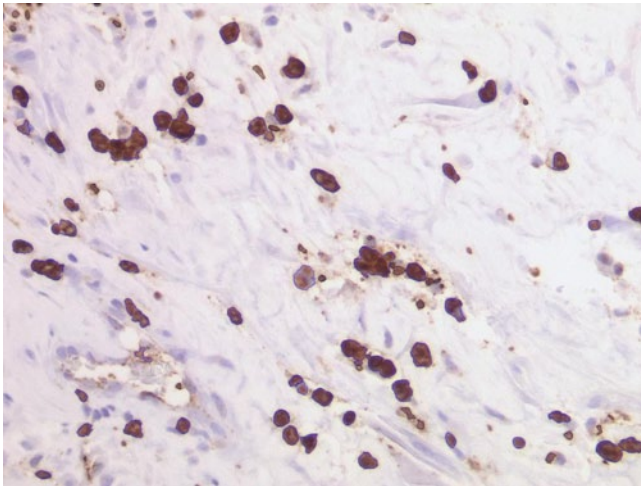
## Bedeutung von computergestützten Verfahren für die Quantifizierung von Zellen mit Fokus auf den „CD15-Quantifier“

Der Quantifizierung von Zellen kommt generell in der diagnostischen Histopathologie ein zunehmend hoher Stellenwert zu [16, 17]. Die Problematik bei der zellulären Quantifizierung besteht zum einen in der heterogenen Veränderung von Gewebe und zum anderen im Zeitaufwand des Zählens. Hier versprechen computergestützte Verfahren eine höhere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit [16]. Sie stellen ein korrigierbares, lernfähiges Diagnostikum dar [16, 17]. Die Entwicklung dieses computergestützten Verfahrens war nur durch das vereinfachte Konzept des CD15-Fokus-Scores möglich, der eine

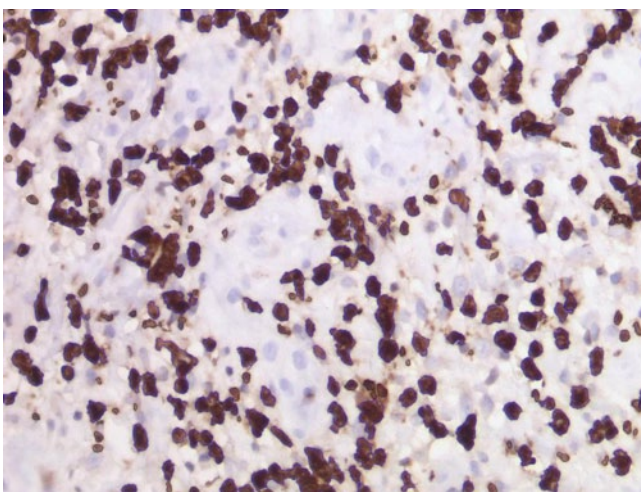
- hohe diagnostische Güte aufweist,
- auf einem lokalisationsunabhängigen Zählmodus in einem einzigen Bildfeld mit Maximalausprägung beruht und
- auf einer definierenden Eigenschaft von neutrophilen Granulozyten basiert.

Der „CD15-Quantifier“ könnte einen Beitrag zur standardisierten histopathologischen Auswertung leisten. Da die Anzahl an neutrophilen Granulozyten ein entscheidendes diagnostisches Kriterium bei der Unterscheidung zwischen nichtinfektiösem und infektiösem Prothesenversagen ist, kann eine falsch ermittelte Quantität von Entzündungszellen zu einer falschen Diagnose führen. Die Begutachtung der immunhistochemischen Präparate stellt einen konzentrations- und arbeitsaufwendigen Prozess dar, der Erfahrung benötigt. Die Unterscheidung zwischen CD15-positiven neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ist bei manchen Präparaten anspruchsvoll und kann für weniger erfahrene Pathologen schwierig und somit zeitaufwendig sein. Man kann davon ausgehen, dass die histopathologische Diagnose unter Einsatz des „CD15-Quantifiers“ einer geringeren Interobservervariabilität unterliegt.





**Abb. 5** ◀ SLIM vom infektiösen Typ (Typ II). Immunohistochemische Färbung (Anti-CD15), positiver mikrobiologischer Befund: *Staphylococcus caprae*, „CD15-Quantifier“-Modus, VMscope Berlin: 57 neutrophile Granulozyten (NG; blau umrandete NG). Vergrößerung: Original 200:1



**Abb. 6** ◀ SLIM vom kombinierten Typ (Typ III). Immunohistochemische Färbung (Anti-CD15), positiver mikrobiologischer Befund, „CD15-Quantifier“-Modus, VMscope Berlin: 171 neutrophile Granulozyten (NG; blau umrandete NG) Vergrößerung: Original 200:1

### Kostenkalkulation und Zeiteffizienz durch eine automatisierte Software

Eine orientierende Kostenkalkulation ergibt, dass sich eine für den automatisierten „CD15-Quantifier“ notwendige Investition, bestehend aus Hardware und Software, nach einer Fallzahl von etwa 120 Fällen amortisiert. Bei einer Thematik wie der Endoprothesenpathologie, wo die interdisziplinäre Zusammenarbeit unerlässlich ist, um eine periprothetische Gelenkinfektion zu diagnostizieren [18], ist ein standardisierter und zeiteffizienter Quantifizierungsmodus hilfreich. Automatisierte Bildverarbeitungssysteme zeigen im Allgemeinen eine geringe Intra- und Interobservervariabilität [16]. Bezüglich der Zeiteffizienz ist festzuhalten, dass ab einer Zellzahl größer als 62 bei dem Kollektiv dieser Untersuchung der „CD15-Quantifier“ immer schneller als der auszählende Pathologe ist. Unter Ein-

satz des „CD15-Quantifiers“ würde der Pathologe für alle Präparate, die mehr als 62 CD15NG/Fokus aufweisen, pro Präparat 32 s Zeit sparen. Bei einer Fallzahl von 500 Präparaten mit einer hohen Zellzahl wäre dies über 4 h. Die neuen Bildanalyseverfahren werden die Arbeit der Pathologen nicht ersetzen, aber sie unterstützen den Pathologen, die diagnostische Präzision zu steigern [16].

### CD15-Expressionsmuster in der SLIM und mögliche „pit falls“ in der histopathologischen Diagnostik

Die Abgrenzung der CD15NG zu CD15-positiven Makrophagen ist durch das divergente zelluläre Expressionsmuster formal möglich [4, 11]. Eine CD15-Expression in Makrophagen war bislang nur in Zelllinien nachgewiesen worden [4]. In dieser Arbeit wurde dieser Befund im Gewebe erstmals bestätigt und das zellu-

läre Expressionsmuster in Makrophagen definitiv beschrieben. Die definitive Abgrenzung der CD15NG, die eine farblich intensive, grobe granuläre Reaktivität mit einer Überdeckung von Zellkern und Zytoplasma aufweisen, von den CD15-positiven Makrophagen (farblich schwächere, feinstgranuläre Reaktivität ohne vollkommene Überdeckung von Zellkern und Zytoplasma) ist das wesentliche diagnostische Kriterium. Orientiert sich die Pathologin/der Pathologe an diesen Kriterien, kann auch in schwierigen Fällen mit hohem Makrophagenanteil eine eindeutige Identifikation von CD15NG erfolgen.

### Infektionsdiagnostik in der SLIM

Prinzipiell folgt die indirekte, immunhistochemische Infektionsdiagnostik in der SLIM dem Algorithmus in der Konsensusklassifikation [6, 8, 9]. Dies inkludiert somit eine Stufendiagnostik von der HE-Färbung zur CD15-Quantifikation. Eine Quantifikation von neutrophilen Granulozyten ist nur in den SLIM-Fällen erforderlich, wo ein geringes, diffuses NG-Infiltrat besteht. Hier ist dann eine NG-Quantifikation notwendig. Die PAS-Reaktion und die Chlorazetatesterase-Färbung gelten in diesem Zusammenhang als valide Methoden der NG-Detektion in der SLIM-Diagnostik [2, 3, 10, 12], wobei auch Mastzellen eine intensive Chlorazetatesterase-Positivität aufweisen können. Enzymhistochemische Färbungen unterliegen – allerdings auch in Abhängigkeit der Färbemodalitäten – qualitativen Schwankungen, sodass einer automatisierten, standardisierten immunhistochemischen Darstellung des NG-spezifischen Antigens CD15 in der SLIM-Diagnostik der Vorzug gegeben werden kann.

Insbesondere bei der diagnostischen Betreuung von Endoprothesenzentren mit hohem Probenaufkommen und zeitnaher Bearbeitung können somit bei immunhistochemischer CD15-Quantifikation von NG der CD15-Fokus-Score und der Einsatz einer automatisierten Bildanalyse als infektionspathologisches Substrat einer periprothetischen Gelenkinfektion hilfreich sein.

## Korrespondenzadresse

### Prof. Dr. V. Krenn

Zentrum für Histologie, Zytologie  
und Molekulare Diagnostik  
Max-Planck-Str. 5, 54296 Trier  
v.krenn@patho-trier.de

**Danksagung.** Teile dieses wissenschaftlichen Projektes wurden durch den ENDO-Verein e. V. (Hamburg) durch Drittmittelgabe (Forschungsantrag: Histopathologische Klassifikation der Arthrose und Charakterisierung eines Immunomarkers als Basis für eine spezifische Diagnostik und Therapie) unterstützt.

## Einhaltung ethischer Richtlinien

**Interessenkonflikt.** B. Kölbl, S. Wienert, J. Dimitriadis, D. Kendoff, T. Gehrke, M. Huber, L. Frommelt, A. Tiemann, K. Saeger und V. Krenn geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht. Der korrespondierende Autor bestätigt, dass der dargestellte CD15-Quantifier durch Kooperation von V.K. und B.K. mit der Firma VMscope, Berlin (S.W.) entwickelt worden ist. Die Präsentation des Themas ist dennoch nicht produktbezogen und somit unabhängig und die Darstellung der Inhalte produktneutral.

Alle im vorliegenden Manuskript beschriebenen Untersuchungen am Menschen wurden mit Zustimmung der zuständigen Ethik-Kommission, im Einklang mit nationalem Recht sowie gemäß der Deklaration von Helsinki von 1975 (in der aktuellen, überarbeiteten Fassung) durchgeführt. Von allen beteiligten Patienten liegt eine Einverständniserklärung vor.

## Literatur

- Banit DM, Kaufer H, Hartford JM (2002) Intraoperative frozen section analysis in revision total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 401:230–238
- Fink B, Gebhard A, Fuerst M et al (2013) High diagnostic value of synovial biopsy in periprosthetic joint infection of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 471:956–964
- Fink B, Makowiak C, Fuerst M et al (2008) 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* 90-B:874–878
- Knapp W, Dörken B, Gilks WR et al (1989) Leucocyte typing IV, 1. Aufl. Oxford University Press, Oxford
- Krenn V, Morawietz L, Burmester GR et al (2006) Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology* 49(4):358–364
- Krenn V, Morawietz L, Perino G et al (2014) Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract* 210(12):779–786
- Lonner JH, Desai P, Dicesare PE et al (1996) The reliability of analysis of intraoperative frozen sections for identifying active infection during revision hip or knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 78:1553–1558
- Morawietz L, Classen RA, Schröder JH et al (2006) Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol* 59(6):591–597
- Morawietz L, Gehrke T, Claßen RA et al (2004) Vorschlag für eine Konsensus-Klassifikation der periprosthetischen Membran gelockerter Hüft- und Knieendoprothesen. *Pathologe* 25(5):375–384
- Morawietz L, Tiddens O, Mueller M et al (2009) Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. *Histopathology* 54:847–853
- Munro JM, Lo SK, Corless C et al (1992) Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes and lymphoid tissues. *Am J Pathol* 141(6):1397–1408
- Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA (1999) An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *J Clin Pathol* 52:118–123
- Robert Koch Institut Berlin (2003) Anlage 5.1. Richtlinie für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention. Urban und Fischer, München
- Ruifrok AC, Johnston DA (2001) Qualification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 23:291–299
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311–322
- Wienert S, Heim D, Kotani M et al (2013) CognitionMaster: an object-based image analysis framework. *Diagn Pathol* 8:34
- Wienert S, Heim D, Saeger K et al (2012) Detection and segmentation of cell nuclei in virtual microscopy images: a minimum-model approach. *Sci Rep* 2:503
- Zmistowski B, Della Valle C et al (2014) Diagnosis of periprosthetic joint infection. *J Orthop Res* 32:98–107

## EU analysiert Gesundheitsrisiko durch endokrine Stoffe

Inwieweit können endokrin wirksame Substanzen (EAS) Gesundheitsrisiken bedeuten? In einer Studie will die EU-Kommission bis 2016 nun dieser Frage nachgehen und eine Antwort darauf finden, wo die Grenzen für eine unbedenkliche Exposition zu ziehen sind. Beispiele für endokrin aktive Substanzen, die mitunter in Lebens- und Futtermitteln nachgewiesen werden, umfassen Pestizide, Dioxine und PCB sowie eine Reihe von in Lebensmittelkontaktmaterialien enthaltene Substanzen wie Bisphenol A (BPA). Nach Ansicht der EU-Kommission stehen hormonaktive Stoffe in Verdacht, in wenigstens drei Wegen störend in den Organismus einzugreifen:

- Erstens imitieren sie die Aktivität von natürlich produzierten Hormonen wie Östrogen oder Testosteron und lösen damit ähnliche chemische Reaktionen im Körper aus (Hormon-Agonisten).
- Weiterhin blockieren sie die Hormonrezeptoren in Zellen und verhindern so die Wirkung von normalen Hormonen (Hormon-Antagonisten).
- Sie beeinflussen darüber hinaus die Synthese, den Transport, den Metabolismus und die Ausscheidung von Hormonen und ändern hierdurch die Homöostase von natürlichen Hormonen im Organismus.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt mit dem Schwerpunktprogramm „THYROID TRANS ACT“ die Forschungsarbeiten auf europäischer Ebene.

[www.thyroidtransact.de](http://www.thyroidtransact.de)