

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die virtuelle Mikroskopie -  
Eine Evaluationsstudie in der Nephropathologie**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Hentschel

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Klaus Kayser  
2. Prof. Dr. med. Manfred Dietel  
3. Prof. Dr. med. Andreas Schulz

Datum der Promotion: 30. Januar 2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1	<i>Grenzen der Lichtmikroskopie</i>	7
1.2	<i>Prinzip der virtuellen Mikroskopie</i>	8
1.3	<i>Anwendungsgebiete der virtuellen Mikroskopie</i>	10
1.3.1	Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Lehre	10
1.3.2	Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Weiterbildung	12
1.3.3	Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Diagnostik	14
1.3.4	Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Forschung	15
1.3.5	Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Qualitätskontrolle	16
1.4	<i>Aufbau eines Virtuellen- Mikroskop- Systems (VMS)</i>	17
1.4.1	Slide Scanner	19
1.4.2	Server	21
1.4.3	Virtuelles Mikroskop	21
<b>2</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
3.1	<i>Bearbeitung der Nierenbiopsien</i>	27
3.2	<i>Scanprozess des Zeiss Mirax Scan</i>	29
3.3	<i>Eigenschaften des VM- Programms - der Mirax-Viewer</i>	32
3.4	<i>Untersuchung der WSI</i>	33
3.5	<i>Datenanalyse</i>	37
3.5.1	Technische Parameter	37
3.5.2	Bildqualität	37
3.5.3	Diagnostische Konkordanz	41
3.5.4	Verwendete Statistikmethoden	41
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>42</b>
4.1	<i>Auswertung der technischen Parameter</i>	42
4.2	<i>Bewertung der Bildqualität</i>	48
4.2.1	Vollständigkeit	48

4.2.2	Bildschärfe.....	54
4.2.3	Stitching.....	57
<b>4.3</b>	<b>Diagnostische Konkordanz .....</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1</b>	<b>Nephropathologische Diagnostik und virtuelle Mikroskopie.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2</b>	<b>Integration der virtuellen Mikroskopie in die nephropathologische Diagnostik.....</b>	<b>61</b>
5.2.1	Bildqualität der WSI.....	61
	<u>Vollständigkeit</u> .....	62
	<u>Bildschärfe</u> .....	63
	<u>Stitching</u> .....	63
	<u>Scanzeit</u> .....	64
	<u>Speicherbedarf</u> .....	64
5.2.2	Diagnostische Konkordanz .....	65
5.2.3	Vorteile der virtuellen Mikroskopie für die nephropathologische Diagnostik .....	66
<b>5.3</b>	<b>Faktoren, die die Einführung der virtuellen Mikroskopie behindern.....</b>	<b>67</b>
<b>5.4</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>68</b>
5.4.1	Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Weiterbildung .....	68
	<u>Aufbau von Bilddatenbanken</u> .....	68
5.4.2	Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Diagnostik.....	69
	<u>Die intraoperative Schnellschnittuntersuchung</u> .....	69
	<u>Erstellung einer primären digitalen Biopsie</u> .....	69
5.4.3	Einsatz der virtuellen Mikroskopie im Krankenhaus- Management .....	70
	<u>Erstellung einer elektronischen Patientenakte</u> .....	70
<b>5.5</b>	<b>Fazit .....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>82</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>82</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>83</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>84</b>

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Digitaler Histologiekurs: Alle Studenten können dasselbe Präparat untersuchen.....	11
<b>Abbildung 2:</b> Fachärztliche Weiterbildung (Grafik mit freundlicher Genehmigung von Kai Saeger, VMScope, Charité Berlin) .....	13
<b>Abbildung 3:</b> Arbeitsablauf eines Virtuellen- Mikroskop- Systems (Grafik mit freundlicher Genehmigung von Kai Saeger, VMScope, Charité Berlin.....	18
<b>Abbildung 4:</b> Nierenzylinder in PAS- Färbung .....	22
<b>Abbildung 5:</b> Diagnosespektrum der Nierenerkrankungen .....	27
<b>Abbildung 6:</b> Präparateherstellung im Labor (Grafik mit freundlicher Genehmigung von Zeiss GmbH) .....	28
<b>Abbildung 7:</b> Der Zeiss Mirax Scan (Grafik mit freundlicher Genehmigung von Zeiss GmbH).....	29
<b>Abbildung 8:</b> Der Scan- Prozess: Image Tiling .....	30
<b>Abbildung 9:</b> Übersichtsbild eines Nierenzylinders in HE- Färbung.....	34
<b>Abbildung 10:</b> Benutzeroberfläche des virtuellen Mikroskops .....	35
<b>Abbildung 11:</b> Nierenzylinder in PAS- Färbung .....	36
<b>Abbildung 12:</b> Anzahl der Einzelbilder (FOV), die vom Scanner erfasst wurden .....	42
<b>Abbildung 13:</b> Anzahl der FOV, die in einer Sekunde vom Scanner erfasst wurden ...	43
<b>Abbildung 14:</b> Größe der gescannten Fläche in mm <sup>2</sup> .....	44
<b>Abbildung 15:</b> Scanzeit in min für den einzelnen Schnitt und für den kompletten Fall.	45
<b>Abbildung 16:</b> Zusammenhang zwischen Scanzeit und der Größe der zu scannenden Fläche.....	46
<b>Abbildung 17:</b> Dateigröße in MB für den einzelnen Schnitt und den kompletten Fall ..	47
<b>Abbildung 18:</b> Benotung der einzelnen Schnitte bezüglich der Vollständigkeit.....	48
<b>Abbildung 19:</b> Nierenzylinder in HE- Färbung - Note 1 .....	50
<b>Abbildung 20:</b> Nierenzylinder in HE- Färbung - Note 2 (Präparat zu groß).....	51
<b>Abbildung 21:</b> Nierenzylinder in Amyloidfärbung - Note 5 (zu helle Färbung des kompletten Präparates) .....	52
<b>Abbildung 22:</b> schematische Darstellung, bei dem der Nierenzylinder nicht mittig platziert ist .....	53
<b>Abbildung 23:</b> Benotung der Schnitte bezüglich der Bildschärfe .....	54

<b>Abbildung 24:</b> Nierenzylinder in SFOG- Färbung - Note 5 (falsche Berechnung der Fokusebene) .....	55
<b>Abbildung 25:</b> WSI in hoher Vergrößerung (x 200) mit Schnittstellen der Einzelbilder	57
<b>Abbildung 26:</b> Klassifizierung der Fälle.....	58
<b>Abbildung 27:</b> Maske einer TBase- Patientenakte.....	71

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Technische Daten des Zeiss Mirax Scan.....	29
<b>Tabelle 2:</b> Eigenschaften des BildServers .....	31
<b>Tabelle 3:</b> Spezifikation des VM- Arbeitsplatzes.....	32
<b>Tabelle 4:</b> Bewertung der Vollständigkeit.....	38
<b>Tabelle 5:</b> Bewertung der Bildschärfe .....	39
<b>Tabelle 6:</b> Gründe für die Unvollständigkeit der einzelnen Schnitte.....	49
<b>Tabelle 7:</b> Faktoren, die zu einer Beeinträchtigung der Bildschärfe führten.....	56

# 1 EINLEITUNG

Für die Arbeit eines Pathologen ist das Lichtmikroskop unerlässlich. Erst Rudolph Virchow und seine wissenschaftlichen Arbeiten trugen dazu bei, dass Ärzte das Mikroskop für die alltägliche Arbeit nutzen konnten. Neben dem Lichtmikroskop gehören heute ein Computer und ein Diktiergerät zum Arbeitsplatz eines Pathologen. (Saeger K 2006a).

Die nachfolgenden Ausführungen zeigen, in welchen Bereichen der Pathologie das Mikroskop genutzt wird bzw. in welcher Art und Weise Neuerungen und Verbesserungen dazu beitragen können, die Arbeit eines Pathologen zu erleichtern.

## 1.1 Grenzen der Lichtmikroskopie

Die Pathologie ist ein visuelles Fach, somit ist die Qualität der mikroskopischen Bilder für eine genaue Diagnosestellung von enormer Wichtigkeit (Riley RS 2004). Um diesem Anspruch stets gerecht zu werden, unterliegt das Lichtmikroskop ständigen Veränderungen, Verbesserungen und Weiterentwicklungen. Ein Beispiel dafür ist der zusätzliche Einsatz einer Video- bzw. Fotokamera für eine bessere Bildaufnahme (Demichelis F 2002a).

In Bezug auf die Funktionalität weist die konventionelle Lichtmikroskopie aber nach wie vor deutliche Einschränkungen auf:

- Es gibt immer nur ein histologisches Präparat, das nicht kopiert werden kann. (Demichelis F 2002a, b, Leong FJ 2001)
- Da immer nur ein Ausschnitt auf dem Glasobjektträger sichtbar ist, wird die Orientierung erschwert. (Saeger K 2003)
- Die Glasobjektträger sind unbeständig und können leicht brechen. (Demichelis F 2002a, b, Fiscor L 2006, Leong FJ 2001)
- Die Färbungen der Präparate können mit der Zeit ausbleichen. (Demichelis F 2002b). Insbesondere Präparate mit Immunfärbungen sind nur innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne diagnostizierbar. (Leong FJ 2001)
- Es sind nur ausgewählte, linsenabhängige Vergrößerungen möglich. (Saeger K 2003)

- Die unterschiedlichen Färbungen der Objektträger können nicht zeitgleich betrachtet werden. (Saeger K 2003)
- Die Anzahl der möglichen zeitgleichen Betrachter ist gering, zumal dann ein Lichtmikroskop mit Betrachtungseinrichtung benötigt wird. (Saeger K 2006a)
- Der Glasobjektträger ist nicht beschreibbar, so dass keine Anmerkungen hinzugefügt werden können. (Saeger K 2006a)
- Der Glasobjektträger kann nicht in den digitalisierten Arbeitsablauf integriert werden, so dass z.B. die Erstellung einer digitalen Patientenakte unmöglich wird. (Saeger K 2003)

Diese Einschränkungen können nicht nur die Diagnosefindung erschweren (Leong FJ 2001), sondern auch verzögern.

## **1.2 Prinzip der virtuellen Mikroskopie**

Die virtuelle Mikroskopie ist eine der jüngsten Entwicklungen der Telepathologie (Glatz-Krieger K 2005b). Der Begriff Telepathologie beschreibt die Diagnostik von makro- oder mikroskopischem Bildmaterial über eine Distanz unter Nutzung von Telekommunikationsnetzwerken (Costello SSP 2003). Dies bedeutet, dass die diagnostische Begutachtung von Fällen erfolgt, die sich physikalisch an einem anderen Ort befinden (z.B. histologische Schnitte oder makroskopische Präparate).

Die Telepathologie wird in die dynamische und statische Telepathologie unterteilt:

- Der dynamische Ansatz beruht auf bewegungskontrollierten Robotermikroskopen, inklusive einer Digitalkamera, mit denen Live- Bilder aufgenommen und dann mittels Internet übertragen werden (Demichelis F 2002b, Lundin M 2004b, Wolf 2001).
- Bei der statischen Form, zu der auch die virtuelle Mikroskopie zählt (Cross SS 2003), wird ein automatisiertes Mikroskop und eine digitale Bildtechnologie dazu genutzt, mikroskopische Bilder zu digitalisieren, zu speichern und anzusehen (Steinberg DM 2001).

Durch die stetige Verbesserung der Computertechnologie besteht mittlerweile die Möglichkeit, einen kompletten Objektträger zu digitalisieren (Demichelis F 2002b), so dass das Gewebe auf einem Computermonitor mit einer speziellen Software analog zu einem echten Mikroskop dargestellt und untersucht werden kann. (Glatz- Krieger K 2005a, b, Bloodgood RA 2005) Durch das Digitalisieren entsteht ein „Whole Slide Image“ (nachfolgend WSI genannt), ein virtuelles Präparat, das per Client-Server Lösung virtuell mikroskopiert werden kann. (<http://medical.nema.org/dicom>)

Da es derzeit noch keine allgemeingültige Definition für „Virtuelle Mikroskopie“ und „virtuelles Slide“ gibt, werden in der Literatur verschiedene Ansichten zur Begriffsbestimmung vertreten. Kalinski T 2005 vertritt den Ansatz, dass allein schon der Begriff „Virtuelle Mikroskopie“ unglücklich gewählt ist, da „...es sich bei digitalisierten Präparaten nicht um künstlich erzeugte Objekte handelt, sondern um digitale Abbilder tatsächlicher mikroskopischer Präparate...“. Auch Rojo MG 2006 vertritt diese Ansicht. Seiner Meinung nach sind digitalisierte Präparate nicht weniger real als die Originalobjektträger. Daher führt er den Begriff „digitale Mikroskopie“ ein. In der Vergangenheit sind all diese Begriffe für verschiedene Zwecke verwendet wurden.

Im Allgemeinen, so ist die Ansicht von Dee FR 2003 und Demichelis F 2002b, ist ein virtuelles Slide als eine digitale Kopie eines mikroskopischen Gewebestücks eines Glasobjektträgers anzusehen. Bis vor kurzem war es unwichtig, ob es sich dabei um ausgewählte einzelne mikroskopische Bilder, die zu Konsultationszwecken als Anhang in einer E-Mail an einen Kollegen gesendet wurden (Okada DH 1999, Singson RP 2000) oder um einen kompletten histologischen Schnitt handelte (Demichelis F 2002b, Leong FJ 2001, Glatz- Krieger K 2005a). Auch für große einzelne Bilder oder Bildersammlungen in Online-Atlanten wurde der Begriff „virtuelles Slide“ verwendet, die einzelne Abschnitte eines Präparates in verschiedenen Vergrößerungen zeigen (Glatz- Krieger K 2005a).

Der Begriff „virtuelles Slide“ bezog sich demnach häufig nur auf das Scannen eines Präparates mit niedriger Auflösung oder eines ausgewählten Abschnittes mit hoher Auflösung (Blake CA 2003, Costello SSP 2003, Leong FJ 2001).

Aber für die Diagnostik von Erkrankungen ist das Scannen mit geringer Auflösung unzureichend, besonders da die Bewertung einzelner Zellkulturen und eine Pilz- und Bakterienidentifizierung für den Diagnoseprozess wichtig sind (Leong FJ 2001).

Einige Forschungsgruppen sind übereinstimmend der Meinung, dass es sich bei einem virtuellen Slide um einen komplett digitalisierten Objektträger mit einer hohen Auflösung

von min. x20 handelt (Demichelis F 2002b, Glatz- Krieger K 2005b, Leong FJ 2001, Lundin M 2004b, Weinstein RS 2004)

All diese verschiedenen Definitionen des virtuellen Slides wurden nun zu dem international anerkannten Begriff „Whole Slide Image“ (WSI) zusammengefasst. (<http://medical.nema.org/dicom>)

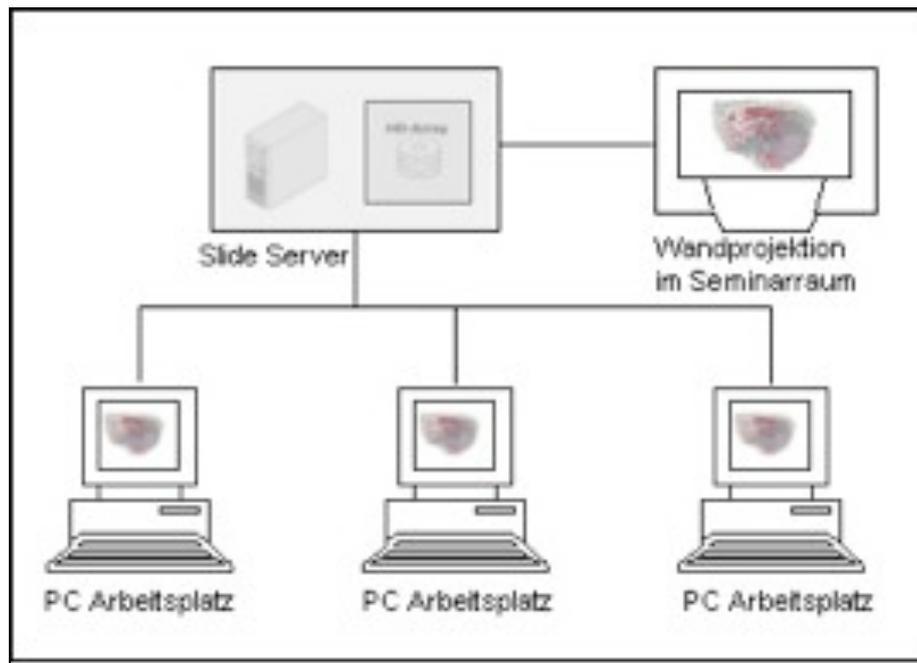
### **1.3 Anwendungsgebiete der virtuellen Mikroskopie**

Die virtuelle Mikroskopie zeigt aufgrund ihrer digitalen Natur ein hohes Potential für zahlreiche Anwendungsgebiete. WSI werden schon seit einigen Jahren hauptsächlich in der Lehre, der Weiterbildung und der Diagnostik verwendet. Durch die ständige Weiterentwicklung der Computertechnologie können sie nun auch in der Forschung und in Qualitätskontrollprogrammen eingesetzt werden.

#### **1.3.1 Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Lehre**

Die Verwendung der virtuellen Mikroskopie für die Ausbildung von Medizinstudenten war eines der ersten Anwendungsgebiete dieser neuen Technologie. WSI werden seit einigen Jahren an verschiedenen Einrichtungen erfolgreich eingesetzt (Becker SH 2007, Blake CA 2003, Boutonnat J 2006, Fujita K 2003, Glatz- Krieger K 2003, Harris T 2003, Heidger PM 2002, Krippendorf BB 2005, Kumar RK 2004, Saeger K 2003, Zito FA 2004).

An einigen Universitäten ist der digitale Histologiekurs schon in den Lehrplan integriert worden, das bedeutet, konventionelle Objektträger und Lichtmikroskope wurden durch WSI und virtuelle Mikroskope vollkommen ersetzt. Dadurch wird das Unterrichten in großen Gruppen ( > 200 Teilnehmer) möglich gemacht (Krippendorf BB 2005). Beispiele dafür sind die Universität von Iowa, USA (Harris T 2003, Heidger PM 2002 ), die Universität von South Carolina, USA (Blake CA 2003), die Universität von Wisconsin, USA (Krippendorf BB 2005) und die Universität von New South Wales, Australien (Kumar RK 2004).



**Abbildung 1:** Digitaler Histologiekurs: Alle Studenten können dasselbe Präparat untersuchen

An anderen Fakultäten wiederum gibt es für die Medizinstudenten die Möglichkeit, zusätzlich zum konventionellen Histologie- bzw. Pathologiekurs mit Hilfe von WSI ihr Wissen zu vertiefen, zu festigen und zu überprüfen. Die virtuellen Präparate sind entweder über das Internet verfügbar oder werden auf einer CD- Rom bzw. DVD gespeichert, so dass die Studenten zu jeder Zeit Zugang zu ihnen haben zu können. (Blake CA 2003, Kayser K 2004).

Beispiele dafür sind die Universität von Magdeburg, Deutschland ([https:// patho.med.uni-magdeburg.de](https://patho.med.uni-magdeburg.de)), die Universitäten von Grenoble und Lyon, Frankreich (Boutonnat J 2006), die Universität von Udine, Italien (Demichelis F 2002b), die Universität von Helsinki, Finnland (Lundin M 2004b), die Universität von Basel, Schweiz (Glatz- Krieger K 2003), die Universität von Pittsburgh (Fujita K 2003), Los Angeles (Marchevsky AM 2003a) und Baltimore, USA und die Universität von Adelaide, Australien (Lee SH 2005). Die Charité, die medizinische Fakultät der Universität zu Berlin entwickelte in Zusammenarbeit mit anderen Universitäten im März 2001 das Meducase- Projekt (Saeger K 2003), in dessen Rahmen Medizinstudenten im Selbststudium durch fallbasiertes Ler-

nen und neue interaktive Lehrmethoden, wie die virtuelle Mikroskopie ihr Wissen vertiefen konnten (Hohne S 2004).

Seit dem Wintersemester 2006/07 wurde auch an der Charité ein digitaler Pathohistologiekurs für die Studenten eingerichtet, den sie zusätzlich zum konventionellen Histologiekurs nutzen können, um so leichter wichtige histologische Strukturen zu erkennen. ([vhcc.charite.de/moodle](http://vhcc.charite.de/moodle))

Um zu ermitteln, ob diese neue Technologie Anklang bei den Studenten fand, wurden Umfragen an verschiedenen Universitäten durchgeführt (Blake CA 2003, Boutonnat J 2006, Dee FR 2003, Glatz- Krieger K 2003b, Harris T 2003, Heidger 2003, Krippendorf BB 2003, Kumar RK 2004, Weinstein RS 2005). Die Ergebnisse stimmten zum großen Teil überein. Die Studenten empfanden die Arbeit mit den WSI als Anreiz, sich eingehender mit der Pathologie zu beschäftigen. Das Interesse an diesem Gebiet wurde geweckt und aufrechterhalten. Die Mehrzahl der Studenten betrachtete die virtuellen Präparate als sinnvolle Ergänzung zu den konventionellen Objektträgern und sie konnten diese neue Lehrmethode gut in ihren Studienalltag integrieren.

### **1.3.2 Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Weiterbildung**

Auch für die Fort- und Weiterbildung von Pathologen kann die virtuelle Mikroskopie genutzt werden.

Ein Beispiel dafür sind Live- Präsentationen auf Pathologiekongressen. Anstatt auf konventionelle Fotografien zurückgreifen zu müssen, kann der Redner während seines Vortrages die WSI darstellen und live untersuchen, zu jeder Stelle auf dem Schnitt navigieren oder die Vergrößerung wechseln. Er kann interessante Gebiete dem Publikum sofort zeigen. Der visuelle Eindruck ähnelt der Untersuchung eines Objektträgers durch ein Multikopf- Mikroskop, wenn gleich die virtuelle Mikroskopie eine höhere Teilnehmerzahl ermöglicht. (Lundin M 2004b, Romer DJ 2003)

Auch bei der Durchführung von klinisch- pathologischen Fallkonferenzen ist die virtuelle Mikroskopie von Nutzen. In solchen Konferenzen diskutieren Pathologen den histologischen Befund zusammen mit Klinikern in Hinblick auf die anstehende Weiterbehandlung des Patienten. Auch hier liegt der Vorteil darin, dass mehrere Personen gleichzeitig das Präparat ansehen können (Saeger K 2006a). Dies gilt ebenso für Konsensuskonferenzen internationaler Expertengruppen (Costello SS 2003).

Weitere Beispiele sind

- Schnittseminare, in denen WSI zusätzlich zu den konventionellen Objektträgern angeboten werden (Glatz- Krieger K 2005b),
- Workshops, in denen mit Hilfe der virtuellen Mikroskopie morphologische und klinische Aspekte von Erkrankungen eingehender untersucht werden können (Dee FR 2003),
- die Erstellung eines digitalen Atlanten der Mammahistopathologie, auf den die Ärzte via Internet zu jeder Zeit Zugang haben (Lundin M 2004a),
- der Versand von Serien mit WSI zu Lehrzwecken über das Internet (Saeger K 2006b).

Die Charité bietet seit 2006 das sog. „Berliner Histologische Kolloquium“ an. Dort können Ärzte über das Internet histologische Fälle diagnostizieren und mit anderen Ärzten diskutieren. ([vhcc.charite.de/moodle](http://vhcc.charite.de/moodle))



**Abbildung 2:** Fachärztliche Weiterbildung (Grafik mit freundlicher Genehmigung von Kai Saeger, VMScope, Charité Berlin)

Umfragen unter den Pathologen ergaben, dass die Mehrzahl der Ärzte zufrieden mit der Nutzung des VM- Systems war. Wichtig für sie waren folgende Faktoren (Saeger K 2003, Costello SSP 2003, Burthem J 2005, Glatz- Krieger K 2003):

- eine Bildvisualisierung in Echtzeit,
- ein Mikroskop, das in seiner Funktionalität dem Lichtmikroskop mindestens gleichgestellt wenn nicht besser ist,
- eine beschleunigte Diagnosefindung,
- ein einfacher Systemgebrauch.

### **1.3.3 Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Diagnostik**

Die virtuelle Mikroskopie kann für Onlinekonsultationen, also für das Einholen einer Zweitmeinung genutzt werden. Diese Methode wird schon seit einigen Jahren eingesetzt. (Costello SS 2003, Okada DH 1999, Singson RP 2000)

Der anfragende Pathologe schickt die WSI mit den klinischen Informationen an den Kollegen, dieser untersucht und diagnostiziert sie erneut und schickt das Ergebnis per Mail zurück (Hufnagl P 2003). Dabei ist es unerheblich, ob beide Seiten, der anfragende sowie der beratende Pathologe, zur gleichen Zeit anwesend sind (Demichelis F 2002a).

Als Beispiele für Webportale, die Konsultationen per Internet anbieten, seien das kostenpflichtige Diagnosezentrum der AFIP<sup>1</sup> (Williams 1998), der erst kürzlich gegründete ebenfalls kostenpflichtige webbasierte Pathologie- Diagnostik- Service der Baccus- Laboratorien in den USA (Weinstein RS 2005), das kostenfreie Telepathologiezentrum der UICC<sup>2</sup> (Hufnagl P 2003) und der Telepathologie- Konsultationsservice des Berufsverbandes Deutscher Pathologen („T. Konsult Pathologie“) (Schrader T 2005, Schrader T 2006a) genannt.

Die virtuelle Mikroskopie wird ebenfalls seit einigen Jahren in der diagnostischen Zytopathologie eingesetzt. Ein Beispiel dafür ist der virtuelle PAP- Abstrich (Marchevsky AM 2003b, Taylor RN 1999).

---

<sup>1</sup> Armed Forces Institute of Pathology (USA)

<sup>2</sup> International Union against Cancer

Im Rahmen des Mamma- Screening- Programms wird an der Charité, Berlin derzeit eine Studie durchgeführt, in der die Einsatzmöglichkeiten der virtuellen Mikroskopie für die Telekonsultation genauer untersucht werden (Schrader T 2006a).

Eine weltweite Standardisierung zur Klassifikation bestimmter Krankheitsgruppen (Gleason- Grading des Prostata- CA, PAP- Abstriche) wird durch die virtuelle Mikroskopie ermöglicht (Lundin M 2004b, Marchevsky AM 2006).

Derzeit gibt es nur wenige Studien, wie die von Molnar B 2003, die sich eingehender mit dem Einsatz von WSI in der Routinediagnostik beschäftigen. In der Molnar- Studie wurden WSI – aufgenommen von Biopsiepräparaten des GI- Traktes – mit den entsprechenden konventionellen Objektträgern auf ihre diagnostische Konkordanz hin verglichen.

Der Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Routinepathologie ist von zunehmender Bedeutung. Im Abschnitt 5.2.3. wird darauf näher eingegangen.

#### **1.3.4 Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Forschung**

Im Bereich der Forschung gibt es vielfältige Einsatzmöglichkeiten für die virtuelle Mikroskopie.

Ein Beispiel ist die quantitative Pathologie. Hier werden Messungen von Mikro- Tissue- Arrays (Mikrogewebereihen) durchgeführt, bei denen ein Raster von kleinen Gewebespots einer Probe gleichzeitig bearbeitet wird (Saeger K 2006a), beispielsweise zur Bestimmung prognostisch wichtiger Tumormarkerproteine (Demichelis F 2002a, Giltnane JM 2004) und zur Bestimmung von Angiogenesefaktoren (Demichelis F 2002b). Mit Hilfe von WSI kann eine automatisierte Analyse von GI- Trakt- Proben zur Klassifikation der Magenmukosa (Fiscor L 2006, 2008) sowie eine Fluoreszenzbestimmung von markierten Zellen eines Präparates (Fine JI 2008, Varga VS 2004) durchgeführt werden. Für solche Bild- und morphometrische Analysen wird eine spezielle Software benötigt (Kalinski T 2005, Saeger K 2006b).

WSI eignen sich für die automatisierte Analyse von Gewebeproben (Giltnane JM 2004), da der Pathologe sie mit Bezugsproben vergleichen, Immunfärbungen auf ein und denselben Präparat durchführen sowie eine quantitative Einschätzung eines jeden Markers durchführen kann (Demichelis F 2002a).

WSI werden für Illustrations- und Dokumentationszwecke in Publikationen eingesetzt (Lundin M 2004a, b, Riley RS 2004). Die Schnitte werden auf einer CD- Rom oder DVD gespeichert und der Zeitschrift beigelegt (Demichelis F 2002a). Der Leser kann sofort auf die histopathologischen Präparate zugreifen und sich die beschriebenen Läsionen oder die seltenen Krankheitsbilder selbst ansehen. Dadurch wird die Transparenz im wissenschaftlichen Bericht gefördert (Lundin M 2004b).

Auch bei der Durchführung von klinischen Studien ist die virtuelle Mikroskopie von Nutzen. Die Einrichtungen, die an den Studien teilnehmen, gewährleisten den Referenzpathologen Zugang zu ihren elektronisch gespeicherten Präparaten. Die anschließende Durchsicht der histopathologischen Diagnosen kann dann in dem jeweiligen Referenzinstitut erfolgen. Damit ist eine Registrierung der Patienten in die für ihn passende Studie gesichert und im Falle einer Änderung der Studienbedingungen, können die Ärzte schnell auf die Präparate zurückgreifen und gegebenenfalls Patienten aus- bzw. einschließen. Die Einführung und Überwachung einer Therapie würde erleichtert sein. (Weinstein RS 2004)

### **1.3.5 Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Qualitätskontrolle**

Die Qualitätskontrolle ist ein Programm, das der Aufrechterhaltung und Gewährleistung einer adäquaten diagnostischen Leistung in der Histo- und Zytopathologie dient. Dafür wird der Sachkenntnisstand von Pathologen in so genannten Leistungstests überprüft. Dies ist eine Voraussetzung dafür, dass eine professionelle Qualifizierung der einzelnen Teilnehmern erreicht wird und somit allgemein gültige Standards für die pathologische Diagnostik entwickelt werden können (Demichelis F 2002b).

Eine Vorbedingung für die Durchführung der Leistungstests ist, dass alle Pathologen dasselbe bzw. äquivalentes Material untersuchen, um eine diagnostische Leistung zu erbringen. Aufgrund der Eigenschaften konventioneller Objektträger stellte diese Voraussetzung die bisher größte Einschränkung für die Durchführung von Qualitätskontrollprogrammen dar. Die Teilnehmer hatten bisher nie identisches Ausgangsmaterial. (Leong FJ 2001)

Dagegen kann die virtuelle Mikroskopie gut für diese Form der Qualitätssicherung genutzt werden. Von einem konventionellen Objektträger können mit Hilfe eines WSI unendlich viele Kopien erstellt werden, so dass alle Pathologen denselben Schnitt unter-

suchen und diagnostizieren können. Somit werden allgemein gültige Rahmenbedingungen für die Leistungstests entwickelt. (Demichelis F 2002a, Lee SH 2005, Lundin M 2004b) Ebenfalls können die Kenntnisse der einzelnen Teilnehmer besser miteinander verglichen werden. (Demichelis F 2002b)

Beispiele für Kontrollprogramme, die schon WSI nutzen, sind das NEQAS – Programm für die Hämatologie, für die Mammaphathologie und die Nephropathologie, Großbritannien (Burthem J 2005, Demichelis F 2002b, Furness P 2007, Leong FJ 2000), das QUATE- Programm für die Zervixpathologie, Großbritannien (Demichelis F 2002b), Qualitätskontrollprogramme für die zytologische Pathologie in Maryland und Atlanta, USA (Gagnon M 2004).

Bei der Durchführung von Qualitätskontrollprogrammen kann die virtuelle Mikroskopie als Alternative zu den konventionellen Objektträgern angesehen werden, da es durch die WSI möglich wird, nationale und internationale Standards für die Qualitätssicherung zu entwickeln (Taylor RN 1999, Lundin M 2004b).

#### **1.4 Aufbau eines Virtuellen- Mikroskop- Systems (VMS)**

Für die Untersuchung von histologischen Fällen können die Schnitte mit Hilfe eines VM- Systems digital dargestellt werden. Derzeit sind nur wenige hoch entwickelte Systeme verfügbar, mit denen man einen kompletten Objektträger digitalisieren kann (Fiscor L 2006, Glatz- Krieger K 2003). Daher schreitet die Entwicklung solcher Systeme durch Universitäten (Afework 1998, Blake 2003, Catalyurek 2003, Costello 2003, Demichelis 2002, Harris 2001, Kumar 2004, Marchevsky 2003a, b, Okada 1999, Steinberg 2001, Weinstein 2001) und kommerzielle Anbieter (Aperio technologies, Chromavision, Interscope, Soft imaging systems, Trestle, Zeiss/ 3DHistech) rasch voran.

Einen ausführlichen Vergleich von 31 VM- Systemen, deren Komponenten und technischen Eigenschaften zeigt der Artikel von Rojo MG 2006.

Ein VM- System besteht aus drei unabhängigen Komponenten (Glatz- Krieger K 2003, Weinstein RS 2004):

- Slide Scanner – Akquisitionssystem zum Erwerb und zur Bearbeitung der Bilder,
- Server und entsprechender Serversoftware, die die Bilder speichern und bereitstellen,
- virtuelles Mikroskop – Client- Rechner mit Anwendersoftware zum Betrachten der Bilder



**Abbildung 3:** Arbeitsablauf eines Virtuellen- Mikroskop- Systems (Grafik mit freundlicher Genehmigung von Kai Saeger, VMScope, Charité Berlin)

Die Anforderungen an ein leistungsfähiges VM- System sind hoch (Glatz- Krieger K 2003, Leong FJ 2001, Lee SH 2005):

- Die Digitalisierung eines Objektträgers sollte so einfach und so schnell wie möglich ablaufen.
- Die Bildqualität muss gleichwertig oder besser im Vergleich zum Originalpräparat sein.
- Die Bildvisualisierungsgeschwindigkeit muss durch eine entsprechend schnelle Netzverbindung/ Internetanbindung gesichert sein.
- Die Handhabung des Systems sollte für den anwesenden Pathologen einfach sein.

Diese Art von Bildaufbereitung und – speicherung ist nicht neu in der Medizin. Digitale Techniken und Arbeitsplätze existieren bereits in der Radiologie (Molnar B 2003, Weinstein RS 2004). Hier werden die radiologischen Bilder in einem sog. PACS- System gespeichert. Solch ein System kann auch für die Pathologie genutzt werden. Es ermöglicht den Aufbau eines Informationssystems, dass von den Ärzten aller Fachbereiche gemeinsam genutzt werden kann. Voraussetzung dafür ist, dass die Dateien in einem einheitlichen Dateiformat abgelegt werden (Kalinski T 2005). Ein Beispiel dafür ist das DICOM- Format, ein weltweites Standardformat zur Verarbeitung und Verwaltung sämtlicher Bilddaten. (Kalinski T 2005, Saeger K 2006a, Zwoenitzer R 2007)

### **1.4.1 Slide Scanner**

Die Entwicklung der Objektträgerscanner begann mit Robotermikroskopen. Diese bestanden aus einem Mikroskop mit Kamera und einem steuerbaren Tisch, auf den das Präparat gelegt wurde. Bei der Aufnahme des Bildes über die Kamera wurde jede Bewegung des Mikroskops von einem Computer kontrolliert. (Demichelis F 2002b, Kalinski T 2005)

Im Gegensatz dazu ist der Slide Scanner in der Lage, nicht nur einzelne Abschnitte eines histologischen Schnittes aufzunehmen, sondern einen kompletten Objektträger zu digitalisieren. (Leong FJ 2001)

Bei den Objektträgerscannern kommt ebenfalls lichtmikroskopische Technik zum Einsatz. Daher wird die maximale Auflösung eines WSI wie beim konventionellen Mikroskop durch die Wellenlänge des Lichts und die numerische Apertur des verwendeten Objektivs bestimmt. (Kalinski T 2005)

Beim Scanvorgang wird der Objektträger in vertikaler und horizontaler Richtung bewegt, wobei die Mechanik, die Kamera und die Fokussierung des Präparates computergesteuert koordiniert werden. Für die Digitalisierung eines Schnittes gibt es zwei Möglichkeiten: die kontinuierliche Aufnahme von Bildstreifen (Line scanning) und die rasterförmige Aufnahme von Einzelbildern (Image tiling). Die Einzelbilder werden als Field of view (FOV) bezeichnet. Beim Image tiling entstehen im Gegensatz zum Line scanning zusätzlich zu den horizontalen auch vertikale Schnittstellen zwischen den Einzelbildern. Diese Einzelbilder werden mosaikartig zu einem Gesamtbild zusammengesetzt („stitching“). (Kalinski T 2005, Rojo MG 2006). Um Überlappungen, Farb-, Helligkeits- und Kontrastunterschiede der FOV auszugleichen, benötigt man eine leistungsfähige Software. Wird auf eine solche Korrektur verzichtet, kann der so genannte Kacheleffekt entstehen, der bei der Diagnostik virtueller Präparate als störend empfunden werden kann (Burthem J 2005, Kalinski T 2005, Ma B 2006).

Um Fehler in der späteren Zuordnung der Schnitte zu den einzelnen Fällen auszuschließen, werden diese mit Barcodes versehen und vor dem Scanvorgang ebenfalls vom Scanner eingelesen (Kalinski T 2005).

Für eine mögliche Integration des Scanners in die Routinediagnostik ist es von Nöten, dass eine große Anzahl histologischer Präparate möglichst schnell digitalisiert werden kann. Dafür eignet sich zum Beispiel der „Mirax Scan“ der Firma Carl Zeiss, AG. Dieser Scanner ist mit einem Ladesystem ausgestattet, der es möglich macht, bis zu 300 Objektträger automatisch nacheinander zu digitalisieren. (Saeger K 2006b)

Je nach Größe des Präparates nimmt ein Scanvorgang bis zu mehreren Minuten in Anspruch. Weitere Entwicklungen, wie der ultraschnelle Slide Scanner, der auf sog. Reihenmikroskopen mit Mikrolinsen basiert, ist bereits patentiert und wird in den nächsten Jahren zum Einsatz kommen. (Weinstein RS 2004)

### **1.4.2 Server**

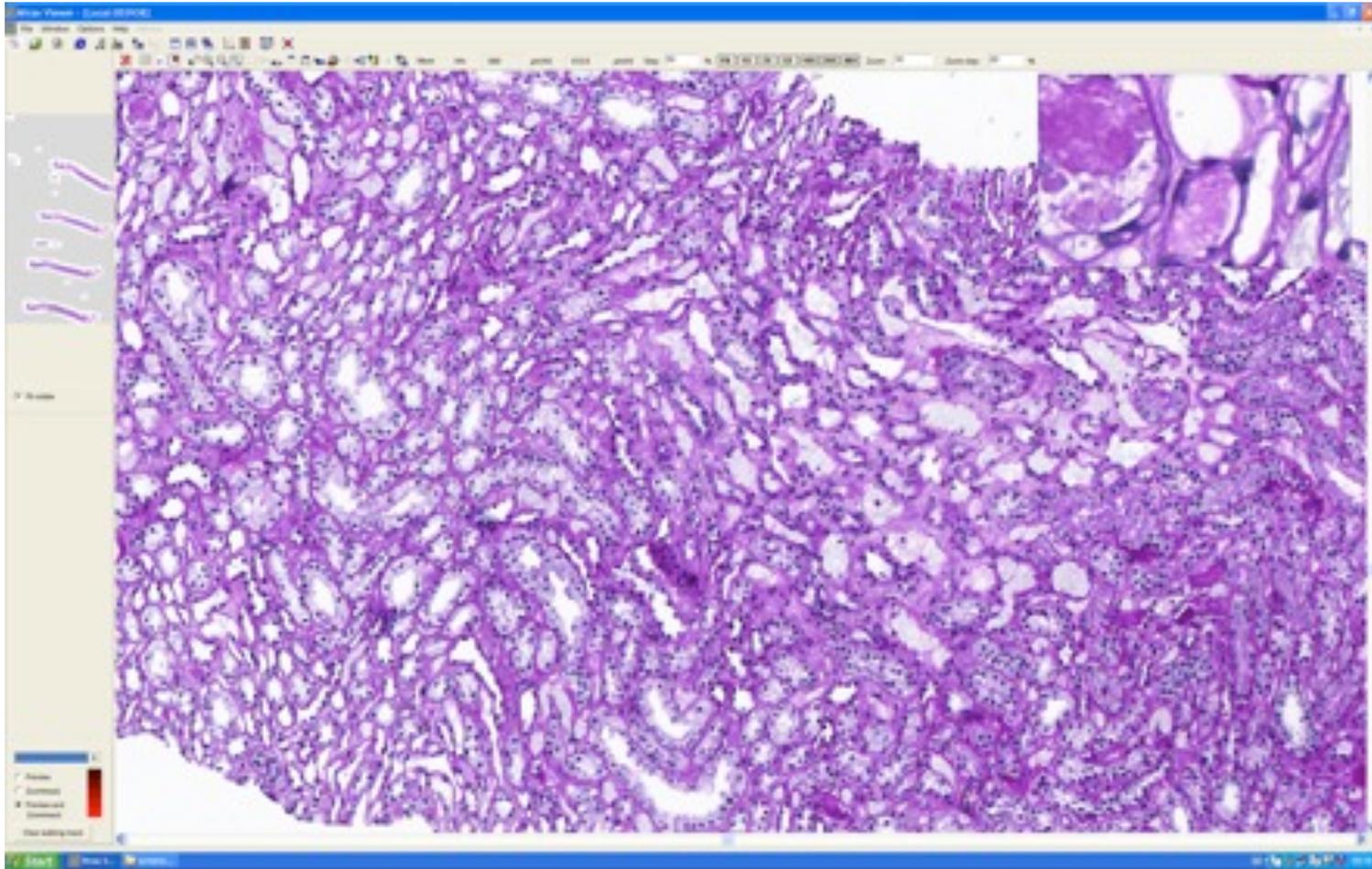
Der Speicherbedarf eines WSI ist abhängig von seiner Größe und seiner Auflösung. Für einen Resektatschnitt mit einer Scanauflösung von  $0,3 \mu\text{m} \times 0,3 \mu\text{m}$ , wird ein Speicherplatz von 4 bis 20 GB benötigt. (Saeger K 2003) Um diesen enormen Platzbedarf zu minimieren, werden auf Wavelet basierte Komprimierungsformate wie JPEG 2000 verwendet. (Leong FJ 2001) Damit lassen sich Kompressionsraten von 1: 20 ohne sichtbaren Qualitätsverlust der Bilder erreichen. Dennoch ist der Speicherbedarf nach der Komprimierung immer noch enorm (Glatz- Krieger K 2003) - bei dem Resektatschnitt kann er bis zu einem GB einnehmen.

Die Übertragung einer solch großen Datei auf den Anwenderrechner nach dem DICOM-Standard ist nicht praktikabel. Die Lösung für dieses Problem ist das sog. Image streaming. Dabei werden nur die Informationen über das Netz gesendet, die der Pathologe in diesem Moment benötigt. Er kann dann entweder einen kleinen Bereich mit maximaler Auflösung betrachten oder einen größeren Bereich mit niedriger Auflösung. Die anderen, nicht benötigten Daten lagern auf einem externen Server, von dem sie bei Bedarf angefordert werden können (Saeger K 2002). Die Übertragung der Daten über eine Internetverbindung von 100 MBit/ s ist ausreichend für eine Untersuchung des WSI ohne erkennbare Verzögerung. (Saeger K 2006b)

### **1.4.3 Virtuelles Mikroskop**

Ein virtuelles Mikroskop ist ein Softwareprogramm für den Anwenderrechner, den sog. Client. Diese spezielle Mikroskopsimulation ist für das Betrachten und Untersuchen der WSI notwendig. (Afework A 1998, Saeger K 2006a).

Die virtuellen Präparate werden über eine benutzerfreundliche Oberfläche dargestellt. Die nachfolgende Abbildung zeigt ein Übersichtsbild in kleiner Vergrößerung und das Hauptuntersuchungsbild in hoher Auflösung an. (Demichelis F et al. 2002a)



**Abbildung 4:** Nierenzylinder in PAS- Färbung

Damit sich das virtuelle Mikroskop in der Praxis bewährt, muss es die gleichen Funktionen wie ein konventionelles Lichtmikroskop haben (Burthem 2005, Demichelis F 2002b, Romer DJ 2003, Dee FR 2003, Glatz- Krieger K 2005, Lundin M 2004b):

- einfache Handhabung des Programms,
- stufenlose Vergrößerung des virtuellen Präparates und
- müheloses Scrollen und Navigieren innerhalb des Schnittes.

Eine zusätzliche Option für den Nutzer ist das Einfügen von Anmerkungen und Grafiken oder das Markieren von interessanten Gebieten. Diese Möglichkeit ist gerade für Studenten didaktisch hochwertig (Afework A 1998, Demichelis F 2002a, Fujita K 2003, Lundin M 2004a).

Darüber hinaus gibt es noch weitere Funktionen, die bisher mit einem Lichtmikroskop nicht realisierbar waren (Saeger K 2006a):

- Die Präparate können zur jeder Zeit und von jedem internetfähigen Computer aus mikroskopiert werden.
- Es können Bildanalyse und Bildmessung durchgeführt werden.
- Die Schnittstufen und Färbungen können überlagert werden.

Mehrere WSI können zu einem virtuellen Fall zusammengefasst werden. Auf diesen Schnitten werden alle relevanten klinischen und pathologischen Daten vermerkt und eventuell noch mit Röntgenbildern und zusätzlichen Färbungen erweitert (Demichelis F 2002a, Marchevsky AM 2003a).

An die Qualität eines WSI werden hohe Anforderungen gestellt (Glatz- Krieger K 2003):

- Das gesamte Präparat sollte verfügbar sein.
- Die Bildschärfe, die Färbung und die Kontraste des WSI dürfen nicht schlechter sein als die des Originalpräparates.
- Die Qualität des Originalpräparates bestimmt die Qualität des virtuellen Präparates.

Ebenfalls für eine gute Bildqualität eines WSI ist eine genügend hohe Auflösung des Bildschirmmonitors von Nöten (Lundin M 2004b), diese wird derzeit nur von Monitoren der aktuellen Generation geleistet (Kaliniski T 2005)

Wichtig bei der Betrachtung der WSI ist ein ausreichend großer Monitor, der mehr Bildinformationen sichtbar macht, als dies bei einer Betrachtung durch ein Okular ermöglicht wird (Kalinski T 2005).

Um die Untersuchung der WSI für den Pathologen zu vereinfachen, wurde ein sog. „diagnostischer Pfad“ entwickelt. Dieser zeichnet die Betrachtungsabfolge der einzelnen Bilder auf („Betrachtungspfad“) und speichert die klinischen Befunde des Pathologen zu den Schnitten ab („Diktatpfad“). (Schrader T 2006b)

## 2 AUFGABENSTELLUNG

Im Vergleich zu anderen Bereichen bildet die Nephropathologie ein kleines Spezialgebiet. Für die Diagnostik von Nierenerkrankungen wird einerseits die Erfahrung des Pathologen, andererseits ein hoher Zeitfaktor vorausgesetzt, da an die Schnittpräparate sehr hohe Ansprüche gestellt werden. Die Pathologen müssen für eine genaue Diagnose auch kleinste mikroskopische Strukturen, wie die Basalmembran und die Glomeruli beurteilen. Aufgrund dessen wird der Bild- und Färbequalität der einzelnen Schnitte in der Nephropathologie eine besondere Bedeutung beigemessen.

Die vorliegende Studie hat zum Ziel, den Prozess und die Validität der Diagnostik von konventioneller Mikroskopie mit der virtuellen Mikroskopie in der Nephropathologie zu vergleichen und zu evaluieren.

Folgende Fragen stehen im Mittelpunkt der Arbeit:

- 1. Kann das virtuelle Mikroskop das konventionelle Lichtmikroskop in der Nephropathologie ersetzen? Gibt es eine Übereinstimmung von digital erstellten Diagnosen mit konventionell erstellten Diagnosen? Inwieweit schränken fehlende Zusatzuntersuchungen wie Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie die Diagnosefindung ein?**

Im Rahmen einer retrospektiven Studie werden die konventionell erstellten Diagnosen mit den digital erstellten Diagnosen verglichen und so die diagnostische Konkordanz bzw. die Diskordanz untersucht. Zusätzlich werden die Gründe für die Diskordanz ermittelt.

**2. Welche Anforderungen sind an die Bildqualität der WSI zu stellen, um eine nephropathologische Diagnostik zu gewährleisten? Ab wann wird die Diagnosefindung durch eine unzureichende Bildqualität beeinträchtigt?**

Hierzu wird eine Untersuchung zur Bildqualität der WSI durchgeführt. Im Einzelnen werden Faktoren analysiert und bewertet, die auf die Qualität von digitalen Bildern Einfluss nehmen können. Dazu gehören die Vollständigkeit, die Bildschärfe und das Stitching.

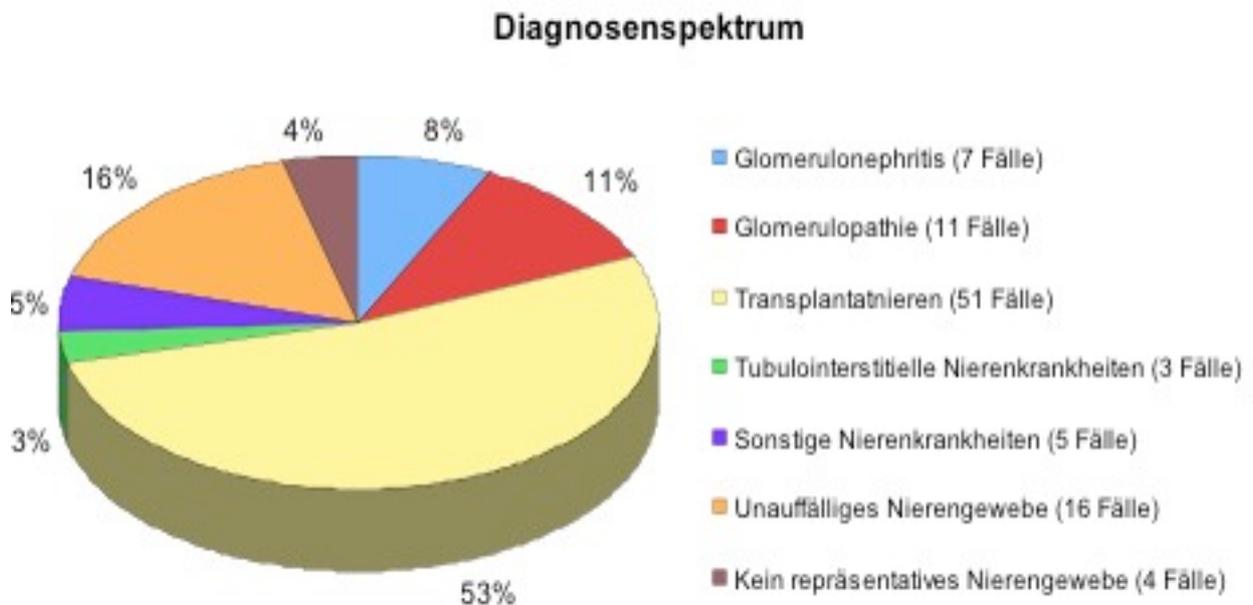
**3. Kann das virtuelle Mikroskop in den Arbeitsablauf der nephropathologischen Routinediagnostik integriert werden?**

Um diese Frage zu klären, wird eine eingehende Untersuchung der Digitalisierung von WSI durchgeführt. Dazu werden technische Parameter (z.B. Anzahl der FOV, Größe der gescannten Fläche, benötigte Scanzeit, benötigter Speicherbedarf) der virtuellen Präparate ermittelt, analysiert und bewertet.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

Im Institut für Pathologie der Charite, Campus Mitte werden pro Jahr etwa 900 Nierenbiopsien untersucht. Innerhalb von 2 Monaten wurden aus der Routinediagnostik 97 Fälle nach der konventionellen Diagnostik vollständig digitalisiert und am Computer bezüglich der diagnostischen Konkordanz nachuntersucht.

Die Fälle umfassten das gesamte Diagnosenspektrum der Nierenerkrankungen.



**Abbildung 5:** Diagnosenspektrum der Nierenerkrankungen

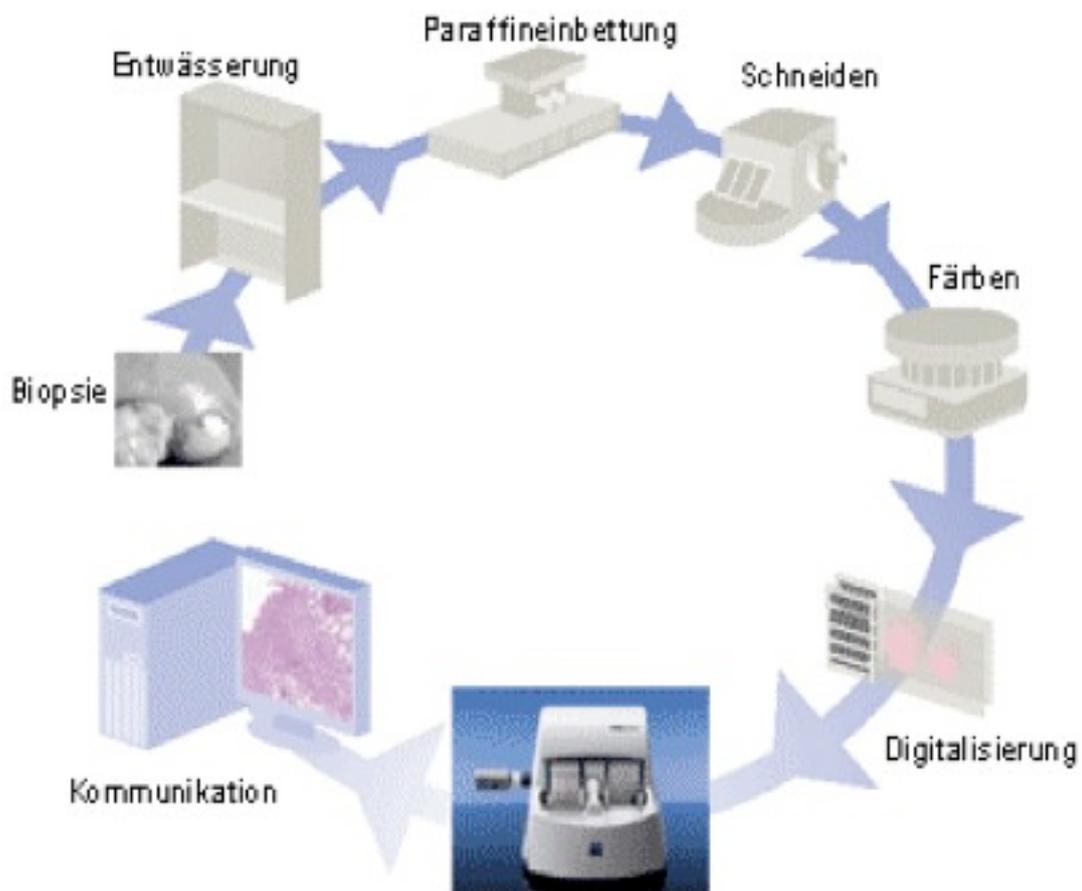
#### 3.1 *Bearbeitung der Nierenbiopsien*

Von jedem Fall wurden nach Formalinfixierung und Paraffineinbettung standardmäßig zunächst Schnitte mit Hämatoxylin- Eosin (HE) und PAS- Färbungen hergestellt. Einen Tag später erfolgten die Zusatzfärbungen Amyloid-, die Eldo-, die Movat- und die SFOG- Färbung. In der Routineuntersuchung lagen weiterhin Immunfluoreszenz-Färbungen für die Immunglobuline IgG, IgA, IgM, die Komplementfaktoren C1q, C3, C4, C4d und Fibrin vor. Die Immunfluoreszenzschnittpräparate konnten nicht digitalisiert werden, weil dafür die technischen Voraussetzungen fehlten.

Von jedem Fall lagen somit Stufenschnitte auf durchschnittlich 9 Glasobjektträgern (maximale Anzahl der Objektträger: 11, minimale Anzahl der Objektträger: 4) vor.

Insgesamt wurden innerhalb des genannten Zeitraums 908 Objektträger (HE, PAS, Elido, Movat, SFOG) im Labor hergestellt und dann digitalisiert.

Die Erstdiagnostik erfolgte an einem konventionellen Lichtmikroskop vom Typ Leica Leitz DMRB. Nach abgeschlossener Diagnose wurden die Objektträger mittels eines Slide Scanners (Zeiss Mirax Scan) digitalisiert und auf einem „Digital Slide Server“ gespeichert. Für eine leichtere Identifizierung der WSI wurden die Schnitte mit fortlaufenden Barcodes versehen, die beim Scanvorgang vom Computer eingelesen wurden.



**Abbildung 6:** Präparateherstellung im Labor (Grafik mit freundlicher Genehmigung von Zeiss GmbH)

### 3.2 Scanprozess des Zeiss Mirax Scan

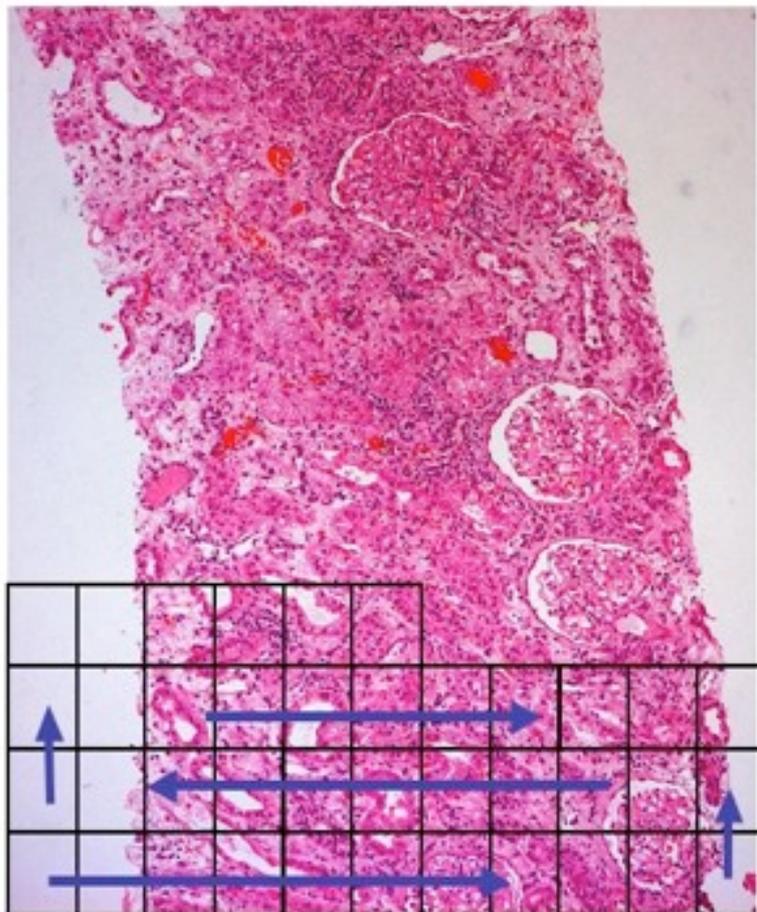


**Abbildung 7:** Der Zeiss Mirax Scan (Grafik mit freundlicher Genehmigung von Zeiss GmbH)

**Tabelle 1:** Technische Daten des Zeiss Mirax Scan

<b>Technische Daten des Zeiss Mirax Scan</b>	
Auflösung	Pixelauflösung 0.31µm
Setup	Keine Kalibrierung/ Konfiguration notwendig
Objektive	Zeiss Plan-Apochromat 20x, NA 0.80
Kamera	Sony DFW-X710, 1024x768 Pixel
Kameraadapter	1.0
PC	XEON Dual 2.8 GHz; mind. 2048 MB RAM
Labelerkennung	Barcodes (linear und Matrix) + Beschriftungen
Slidezuführung	scannt bis zu 300 Objektträger automatisch oder manuell
Breite x Höhe x Tiefe	74 cm x 45 cm x 53 cm
Gewicht	25 kg

Beim Scanprozess des Mirax Scanners werden mosaikartig zeilenweise Einzelbilder angefertigt und anschließend zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Ein Einzelbild (= ein Kästchen) wird als Field of View (FOV) bezeichnet. Das Zusammenfügen der FOV geschieht durch das sog. „Image tiling“. Bei diesem speziellen Digitalisierungsverfahren bestehen neben den horizontalen Schnittstellen zusätzlich noch vertikale Schnittstellen, so dass es zu einer rasterförmigen Aufnahme der Einzelbilder kommt. Bei den vorliegenden WSI wurde auf Grund des technischen Aufwandes auf ein softwareoptimiertes Stichting verzichtet.



**Abbildung 8:** Der Scan- Prozess: Image Tiling

Nachdem die Objektträger in das Magazin eingelegt wurden, wurde diese automatisch positioniert, bis der erste Schnitt eingezogen wurde. Der Bereich, der gescannt werden sollte, wurde automatisch festgelegt. Begrenzungen waren die obere rechte und die untere linke Ecke des zu scannenden Gebietes. Das Autoscanning wurde gestartet, nachdem die Bühne für die Zero- Position eingestellt wurde.

Während des Scanprozesses wurde der Autofokus durch Nutzung von Algorithmen nach Brenner nur an jedem 3. bis 5. FOV durchgeführt (Molnar B 2003).

Alle Bilder wurden mit Hilfe des Wavelet- Verfahrens in das JPEG- Format (Verhältnis 1: 20) komprimiert und als Dateien im Verzeichnissystem des Betriebssystems abgelegt. Metainformationen über die Bilder wurden in einer SQL-Datenbank (Microsoft SQL-Server) gespeichert.

Um eine spätere Zuordnung der einzelnen Schnitte zu den Fällen zu ermöglichen, wurden die Objektträger zuvor mit einem Barcode versehen. Diese Nummern wurden vom Slide Scanner eingelesen und die Fälle entsprechend der Barcodes als Datei auf einem Bild- Server gelagert.

**Tabelle 2:** Eigenschaften des BildServers

<b>Eigenschaften des BildServers</b>	
Computer	IBM kompatibler Rechner: AMD Athlon „XP“ 2400+; 256 MB RAM; 558 GB HDD
Datenbank	Microsoft SQL- Server
Betriebssystem	Windows 2000
Netzwerkkarte	100 MBit/s

### 3.3 *Eigenschaften des VM- Programms - der Mirax-Viewer*

Zur Befundung des digitalisierten Schnittpräparates wurde ein VM- Arbeitsplatz mit folgender Spezifikation genutzt:

**Tabelle 3:** Spezifikation des VM- Arbeitsplatzes

<b>Spezifikation des VM- Arbeitsplatzes</b>	
Computer	IBM IntelliStation M Pro, Pentium 4, 3000 GHz, 1024 MB RAM, 32 GB HDD
Bildschirm	LCD TFT Monitor IBM T221, sichtbare Diagonale 22,2*, maximale Auflösung 3840 x 2400 Pixel
Betriebssystem	Windows XP Professional
Betrachtungssoftware	MiraxView
Netzwerkkarte	100 MBit/s

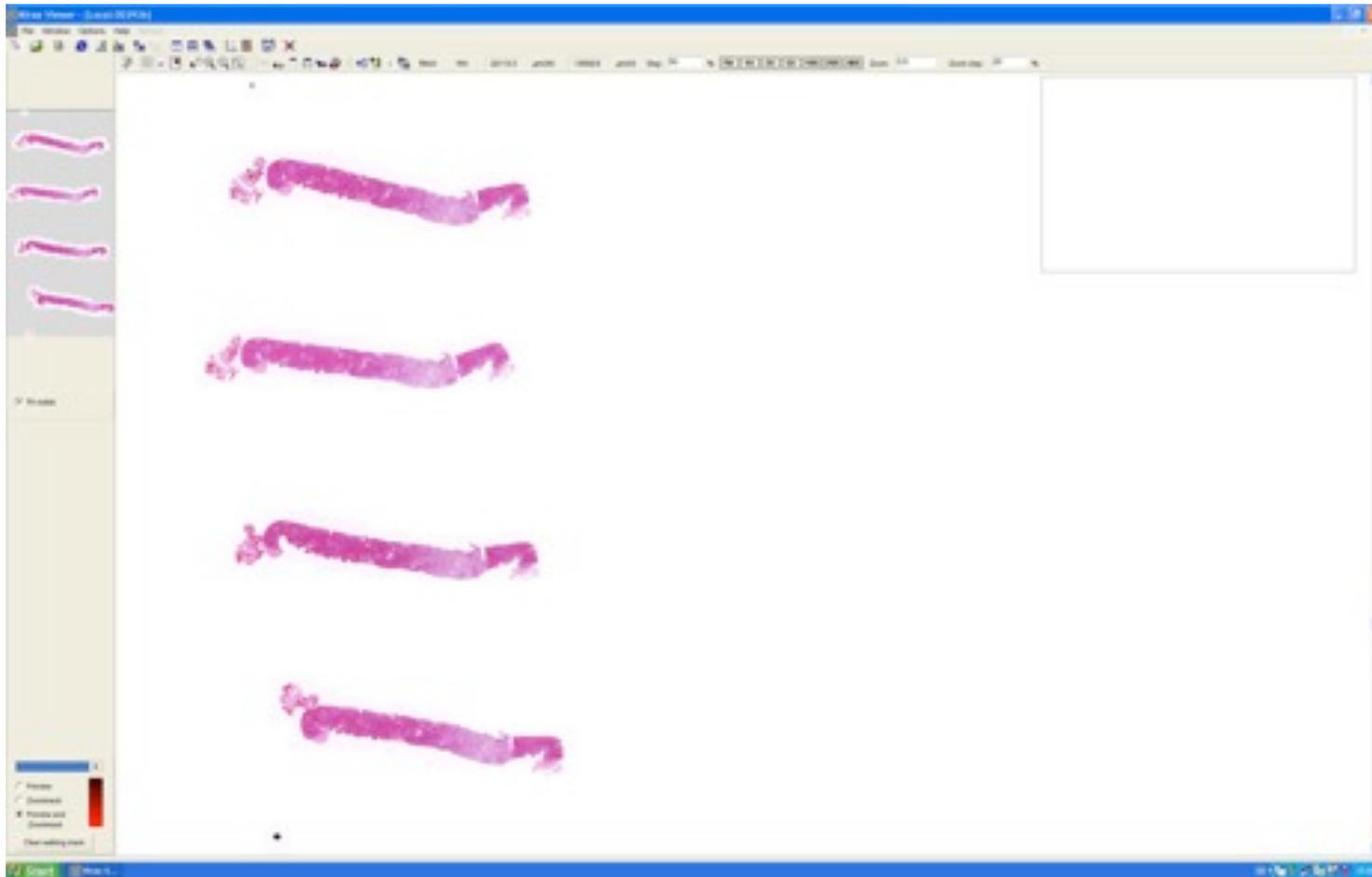
Jedes WSI wurde über das Netzwerk vom Image-Server geladen.

### **3.4 Untersuchung der WSI**

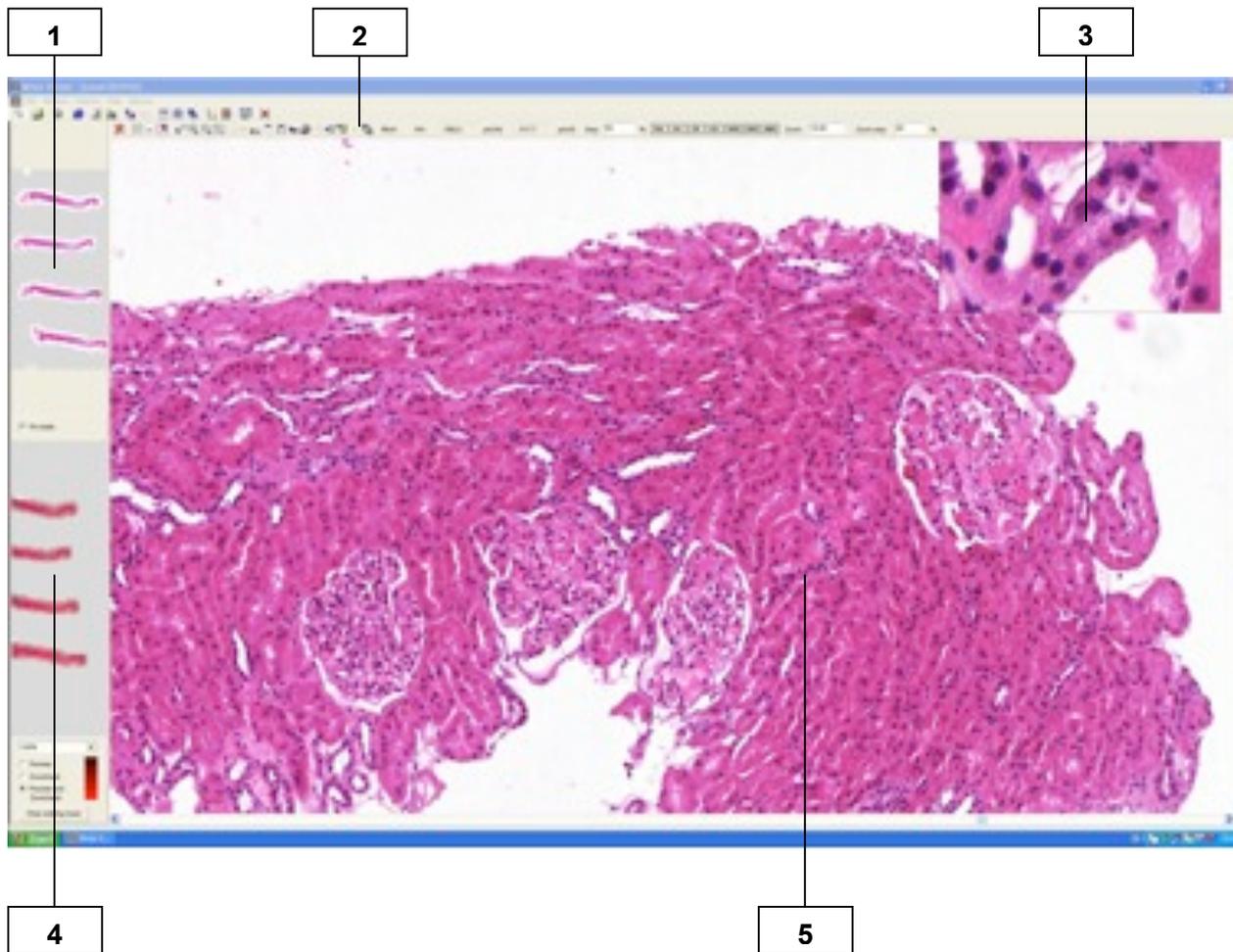
Wenn der Pathologe einen Fall untersuchen wollte, suchte er sich auf dem Server die entsprechenden Schnitte mit Hilfe der Barcodes aus.

Das WSI lässt sich mittels den Cursor-Tasten oder der Maus in alle Richtungen verschieben.

Um die Vergrößerung zu verändern, hat der Nutzer mehrere Optionen. Die vorbereiteten Vergrößerungsschritte von x100 bis x200 über die Auswahl von Menü-Buttons oder „+“ und „-“ Taste des Nummernfeldes der Tastatur können verwendet werden. Weiterhin ist eine Auswahl durch Ziehen eines Cursor-Vierecks in der Übersichtsvergrößerung möglich.

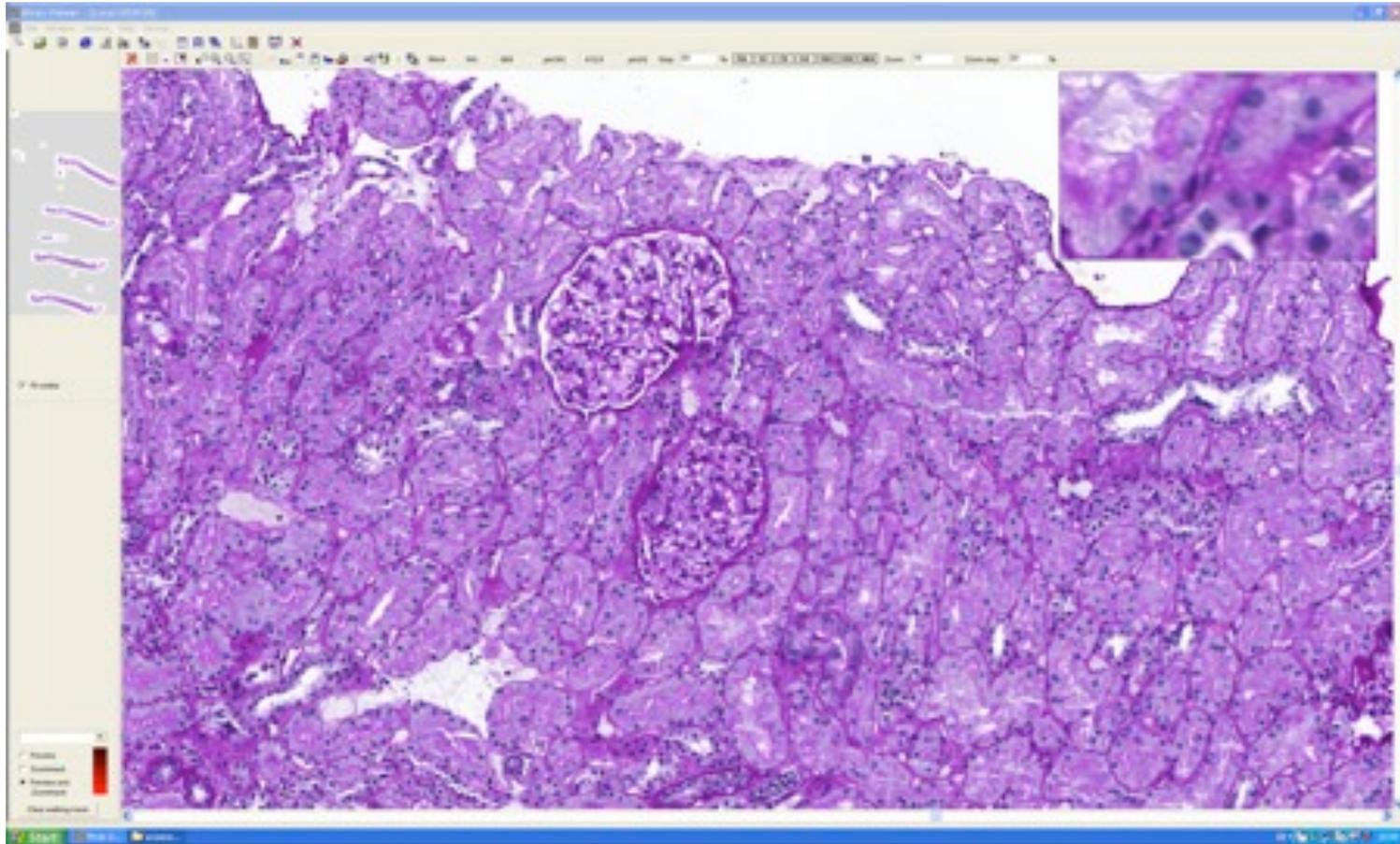


**Abbildung 9:** Übersichtsbild eines Nierenzylinders in HE- Färbung



- 1: Übersichtsbild
- 2: Menüleiste
- 3: Detailbild
- 4: Übersichtsbild mit Betrachtungspfad
- 5: Untersuchungsbild

**Abbildung 10:** Benutzeroberfläche des virtuellen Mikroskops



**Abbildung 11:** Nierenzylinder in PAS- Färbung

## **3.5 Datenanalyse**

### **3.5.1 Technische Parameter**

Zur Erfassung der Scannereigenschaften wurden zunächst von allen Schnittpräparaten folgende technische Parameter beim Scanvorgang ermittelt:

- die Anzahl der FOV für den einzelnen Schnitt
- die Anzahl der FOV pro Sekunde für den einzelnen Schnitt
- die gescannte Fläche in mm<sup>2</sup> für den einzelnen Schnitt
- die benötigte Scanzeit in min für den einzelnen Schnitt
- die benötigte Scanzeit in min für den kompletten Fall
- das Datenvolumen in MB für den einzelnen Schnitt
- das Datenvolumen in MB für den kompletten Fall

Die Beziehung zwischen der Scanzeit und der Größe der zu scannenden Fläche wird durch eine lineare Regression dargestellt.

### **3.5.2 Bildqualität**

Es wird zunächst von allen Schnittpräparaten die Bildqualität nach folgenden Kriterien untersucht und beurteilt:

- Vollständigkeit
- Bildschärfe
- Stitching

- **Vollständigkeit** – Ist das Gewebestück vollständig eingescannt worden?

**Tabelle 4:** Bewertung der Vollständigkeit

<b>Note</b>	<b>Vollständigkeit</b>	<b>Bewertung</b>
1	Vollständig eingescannt	Diagnostik nicht eingeschränkt
2	Unvollständig eingescannt (kleinere Mosaikteile im Randbereich fehlen)	Diagnostik nicht eingeschränkt
3	Unvollständig eingescannt (kleinere Mosaikteile in der Präparatmitte fehlen)	Diagnostik nicht wesentlich eingeschränkt
4	Unvollständig eingescannt (nur noch einzelne Fragmente sind sichtbar)	Diagnostik stark eingeschränkt
5	Unvollständig eingescannt	Diagnostik nicht möglich

Danach wurden die Gründe für die Unvollständigkeit ermittelt.

- **Bildschärfe** – Beeinträchtigt die auftretende Bildunschärfe die Diagnostik?

**Tabelle 5:** Bewertung der Bildschärfe

<b>Note</b>	<b>Bildschärfe</b>	<b>Bewertung</b>
1	Keine Unschärfen vorhanden	Diagnostik nicht eingeschränkt
2	Unschärfen in wenigen Segmenten ( < 10 )	Diagnostik nicht eingeschränkt
3	Unschärfen in mehreren Segmenten ( < 15 )	Diagnostik nicht wesentlich eingeschränkt
4	Unschärfen in vielen Segmenten ( > 15 )	Diagnostik stark eingeschränkt
5	Große Teile des Schnittes sind unscharf ( > 20% )	Diagnostik nicht möglich

Danach werden Faktoren ermittelt, die die Bildschärfe zusätzlich beeinträchtigen können.

- **Stitching** – Tritt ein Kacheleffekt zwischen den einzelnen FOV auf und wird dadurch die Diagnostik erschwert?
  - Bewertung:
    - Ja
    - Nein

Auf eine Bewertung der Farbqualität wurde verzichtet. Die Farbqualität am Monitor ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig:

- Färberische Qualität des Originalschnittpräparates,
- Farbspektrum des Scanners,
- Farbspektrum des Monitors.

Die färberische Qualität der Schnittpräparate fiel teilweise sehr unterschiedlich aus. Daraus resultierte ein unterschiedlicher Farbeindruck am Monitor. Eine Kalibrierung des Aufnahmeapparates sowie des Monitors wurde wegen des hohen technischen Aufwandes nicht durchgeführt.

### 3.5.3 Diagnostische Konkordanz

Als eine randomisierte, geblindete, retrospektive Studie wurde eine Nachbefundung der 97 Fälle durch zwei Pathologen durchgeführt. Beiden Ärzten lagen nur die klinischen Informationen vor, die auch die Pathologin erhielt, die die Fälle konventionell untersuchte. Die Ergebnisse der Erstdiagnostik waren den Zweitbefundern unbekannt.

Die Übereinstimmung der konventionell erstellten Diagnose mit der virtuell erstellten Diagnose wird als diagnostische Konkordanz bezeichnet und in sog. Level unterteilt (Weinberg D 1997). Sind die beiden erstellten Diagnosen so verschieden, dass sich eine unterschiedliche Therapieoption ergibt, so wird dies als klinisch wichtige Diskordanz bezeichnet. Eine klinisch unwichtige Diskordanz tritt bei den Diagnosen auf, die zwar nicht übereinstimmen, aber bei denen sich die gleiche Therapie anschließen würde.

- **Level A:** klinische Konkordanz
- **Level B:** klinisch wichtige Diskordanz
- **Level C:** klinisch unwichtige Diskordanz

Nach Abschluss der Befundung wurden die Erstdiagnosen mit den Zweitdiagnosen verglichen und diskutiert. Bei einer Diskordanz wurden die Fälle noch ein zweites Mal von den Pathologen zusammen untersucht und diagnostiziert.

Gründe für eine auftretende Diskordanz wurden wie folgt klassifiziert (Molnar B 2003):

- **Klasse I:** inadäquate Bildqualität
- **Klasse II:** unterschiedliche Interpretation der Pathologen
- **Klasse III:** ungenügend klinische Information

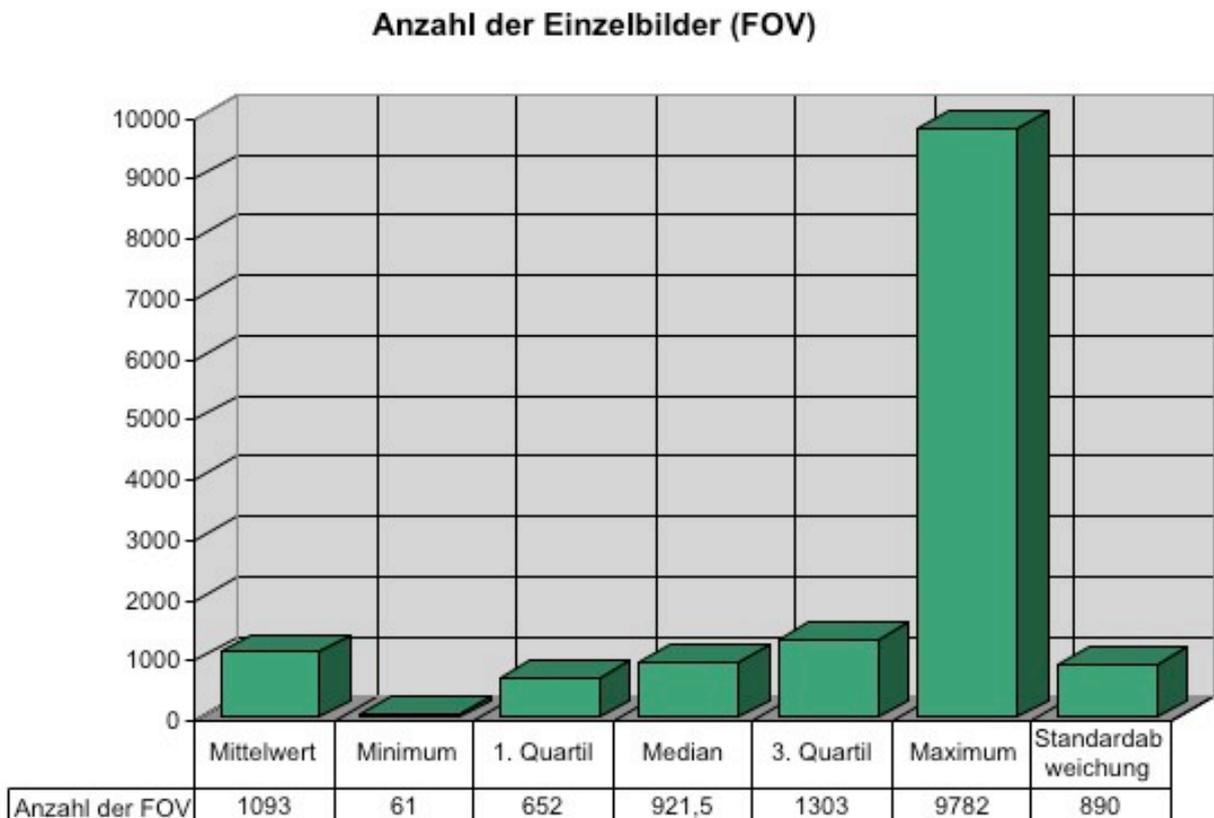
### 3.5.4 Verwendete Statistikmethoden

Das Statistikprogramm „SLab 0.5“ wurde für die statistische Auswertung und Berechnung der Daten wie Minimum, Median, Quartil, Maximum, Standardabweichung und für die Darstellung der linearen Regression verwendet.

## 4 ERGEBNISSE

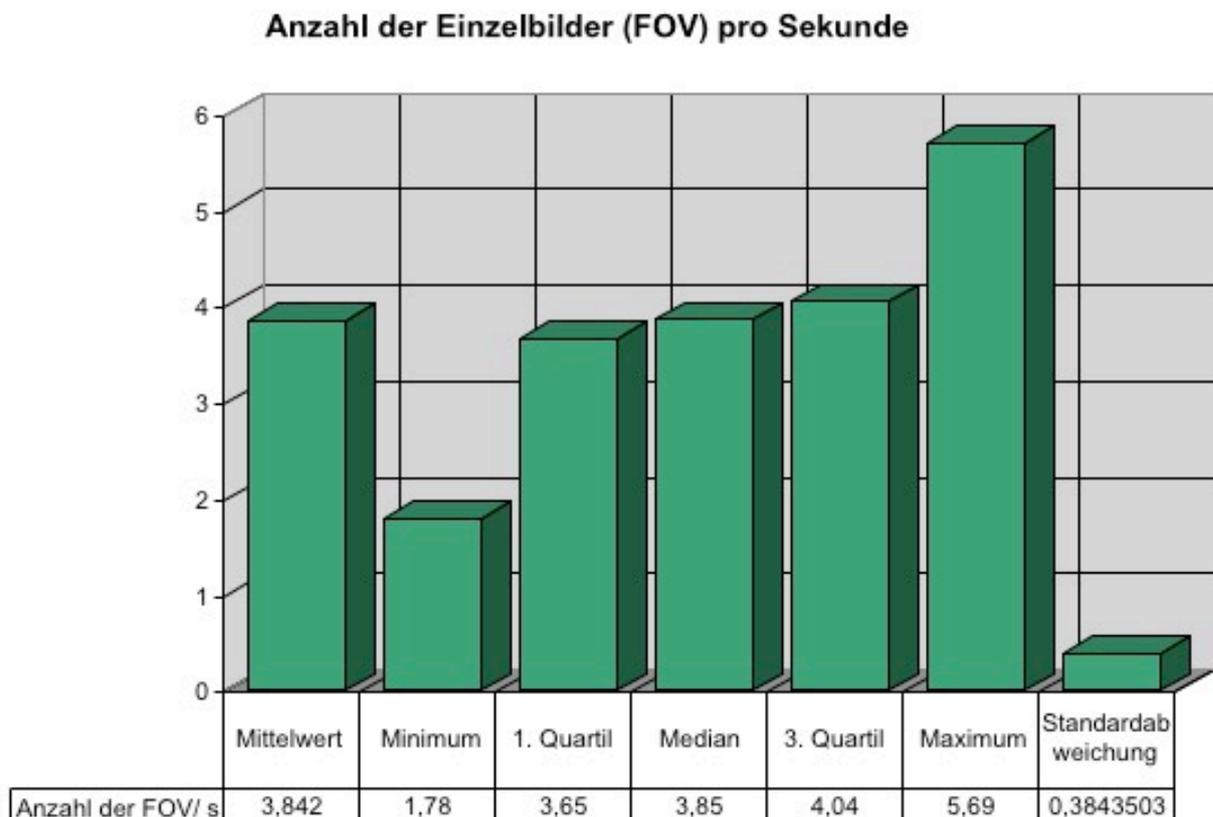
### 4.1 Auswertung der technischen Parameter

Die technischen Parameter beschreiben die systemabhängigen Faktoren beim Scanprozess. Bei der Digitalisierung des Objektträgers werden mosaikartig angeordnete Einzelbilder angefertigt, die als Field of View (FOV) bezeichnet werden. In dieser Studie setzte sich ein digitalisierter Schnitt aus durchschnittlich 1093 FOV zusammen (minimale Anzahl: 61 FOV, maximale Anzahl: 9782 FOV).



**Abbildung 12:** Anzahl der Einzelbilder (FOV), die vom Scanner erfasst wurden

Von der Leistungsfähigkeit des Scanners hängt es ab, wie viele Einzelbilder (FOV) pro Sekunde erzeugt und abgespeichert werden können. Ein FOV repräsentiert eine gescannte Fläche auf dem Schnittpräparat, die sich aus der Kameraauflösung und der Pixelauflösung berechnet. In dieser Studie betrug die Kameraauflösung des Scanners 1024 x 768 Pixel und die Pixelauflösung 0,31 µm. Somit betrug die gescannte Fläche pro FOV 75576 µm<sup>2</sup> = 0,08 mm<sup>2</sup>.



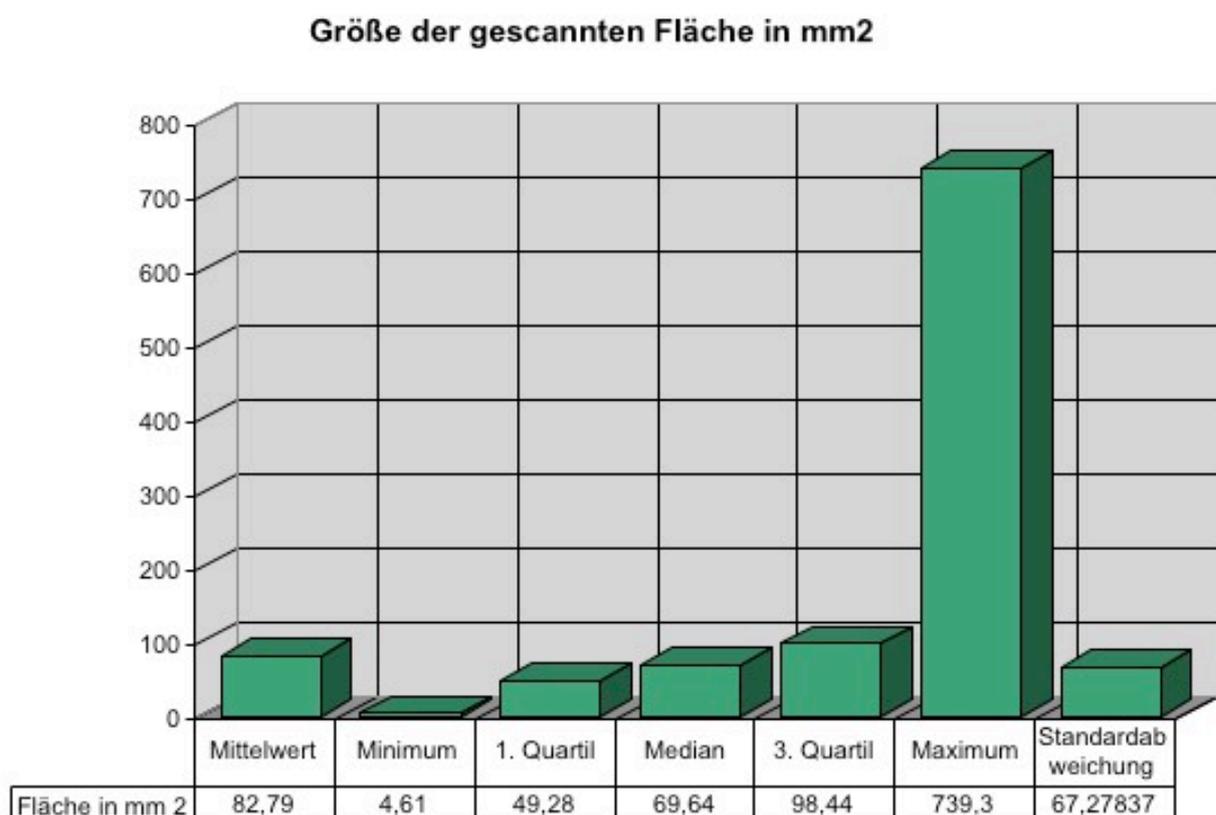
**Abbildung 13:** Anzahl der FOV, die in einer Sekunde vom Scanner erfasst wurden

Pro Sekunde wurden vom Scanner durchschnittlich 3,8 FOV/ s (minimale Anzahl: 1,78 FOV/ s, maximale Anzahl: 5,69 FOV/ s) erfasst. Die Variabilität der Anzahl der Einzelbilder pro Sekunde war von verschiedenen Faktoren abhängig:

- Der Scanprozess wurde mit einem Vorscannen (Pre- Scan) eingeleitet, mit dem die Bildebenen für den Autofokus berechnet werden. Beim Wechsel von einem Einzelbild zum nächsten ergaben sich Nachstellzeiten, um die errechnete Bildebene (Verschiebung in der z-Achse) zu erreichen.

- Die Stanzzyylinder lagen nicht als ein geschlossenes Gewebepräparat auf dem Objektträger, sondern einzeln. Wenn ein Einzelzylinder gescannt wurde, wurde je nach Entfernung zwischen den Einzelzylindern eine Verschiebung des Objektes in der x- und y-Achse notwendig.

Aus den Parametern der Einzelbildern ließen sich dann weitere Werte für den einzelnen Schnitt und den gesamten Fall berechnen, die einen besseren Eindruck vermitteln, wie viel Zeit für die Digitalisierung benötigt wurde.

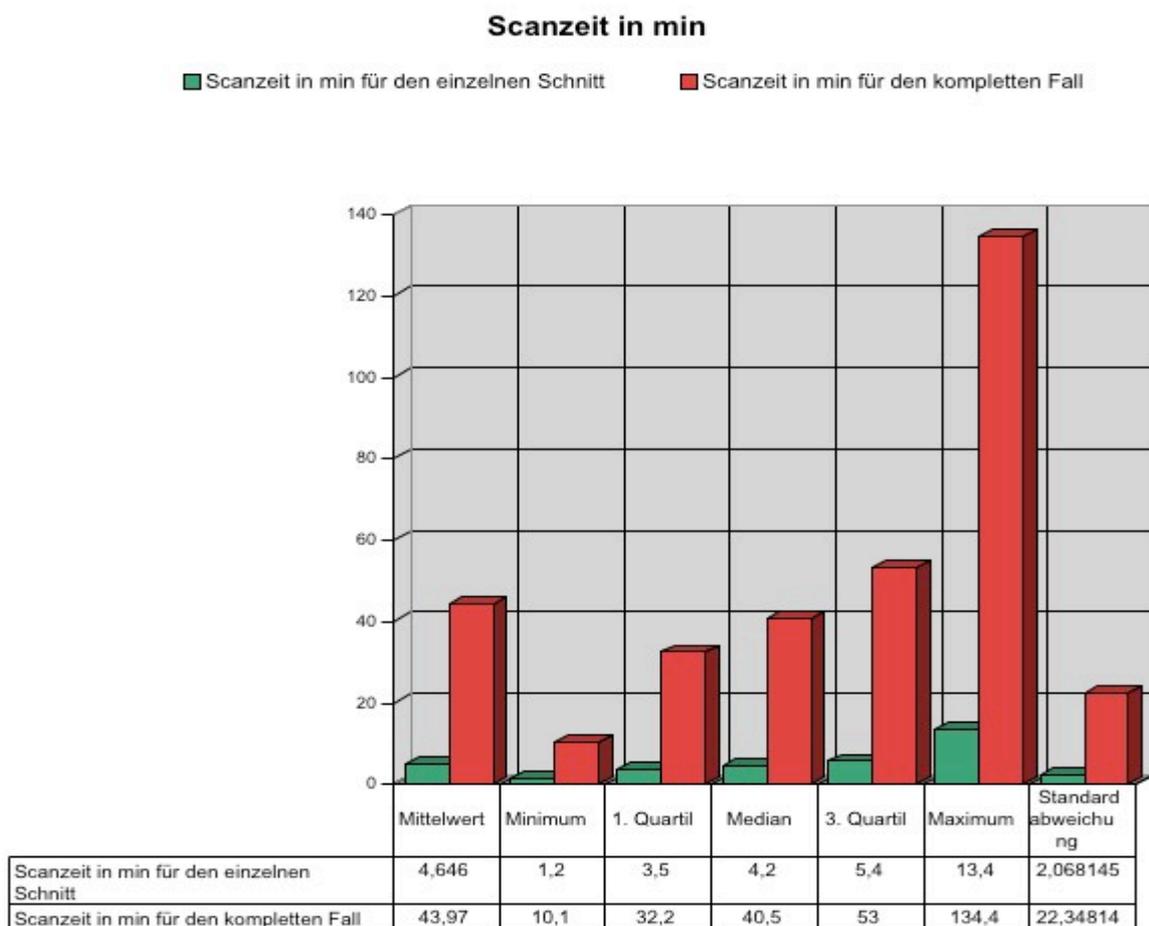


**Abbildung 14:** Größe der gescannten Fläche in mm<sup>2</sup>

Von einem einzelnen Schnitt wurde durchschnittlich 82,61 mm<sup>2</sup> Gewebe (minimale Größe: 4,61 mm<sup>2</sup>, maximale Größe: 739,30 mm<sup>2</sup>) erfasst.

Die Gesamtscanzeit eines Präparates ist abhängig von der Anzahl der FOV pro Sekunde und von der zu scannenden Bildfläche. Die durchschnittlichen Scanzeiten pro Schnitt und pro Fall verschaffen einen Überblick über den zeitlichen Aufwand, der notwendig ist, um jeweils Schnitt und Fall vollständig zu digitalisieren. ( Abbildung 15). Um ein Präparat zu scannen, wurden durchschnittlich 4,6 Minuten (minimale Scanzeit: 1,2 min, maximale Scanzeit: 13,4 min) benötigt.

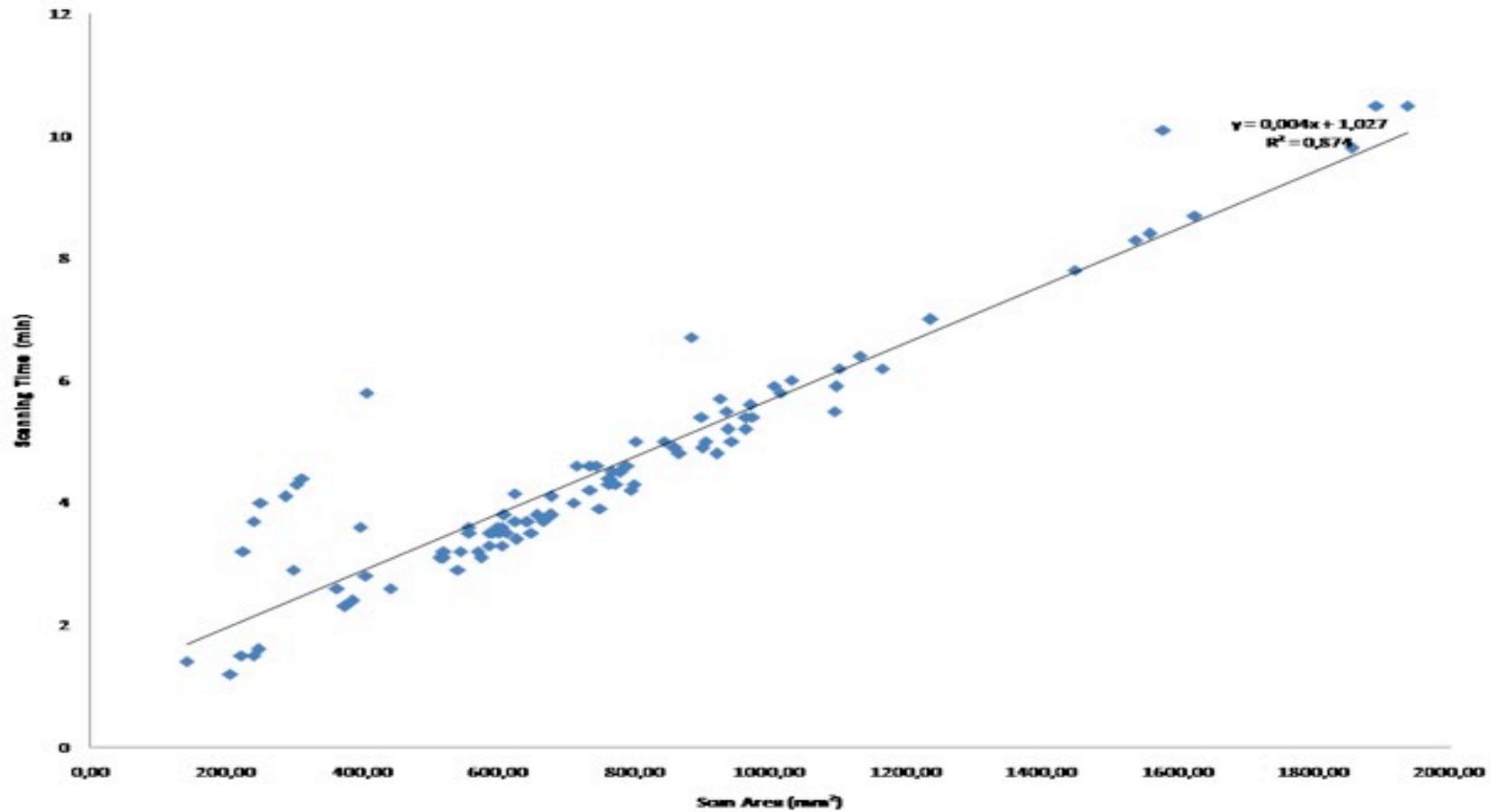
Wird dies hochgerechnet, so wurde für das Scannen eines kompletten Falls, der aus durchschnittlich 9 Schnitten bestand, im Durchschnitt 44 Minuten benötigt (minimale Scanzeit: 10 min, maximale Scanzeit: 134 min).<sup>3</sup>



**Abbildung 15:** Scanzeit in min für den einzelnen Schnitt und für den kompletten Fall

<sup>3</sup> Zum Zeitpunkt der Untersuchung konnten keine Immunfluoreszenz- Präparate gescannt werden.

Den Zusammenhang zwischen der Scanzeit und der Größe der zu scannenden Fläche zeigt die Abbildung 16, es besteht ein lineare Abhängigkeit zwischen diesen beiden Faktoren. Je größer das Gewebstück ist, desto mehr Zeit wird benötigt, um diese Fläche zu scannen. Bei Objektträgern mit kleineren Gewebeproben kam es zu einer größeren Streuung bei den Scanzeiten.



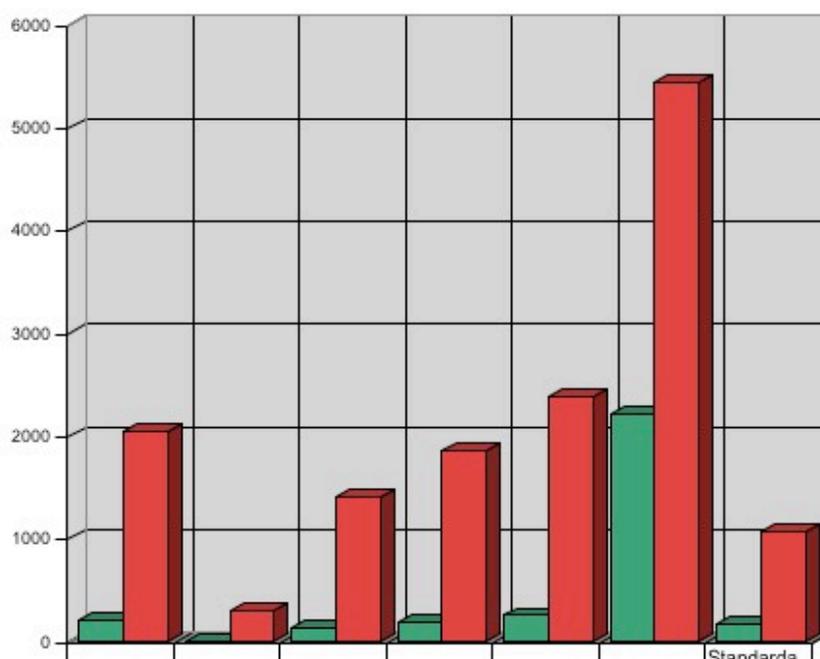
**Abbildung 16:** Zusammenhang zwischen Scanzeit und der Größe der zu scannenden Fläche

Die Abbildung 17 zeigt das Datenvolumen der einzelnen Schnitte bzw. eines kompletten Falles. Ein digitalisierter Schnitt hatte eine durchschnittliche Dateigröße von 215 MB (minimales Datenvolumen: 10 MB, maximales Datenvolumen: 2222 MB). Die Dateigröße ist abhängig von der gescannten Fläche, der Anzahl der Einzelbilder, dem verwendeten Objektiv (hier wurde das 20x Objektiv verwendet) und dem Komprimierungsfaktor, der in dieser Studie 1:20 betrug.

Pro Fall wurden durchschnittlich 2045 MB (minimales Datenvolumen: 297 MB, maximales Datenvolumen: 5440 MB; Standardabweichung 1070,1 MB) Speicherplatz benötigt.

### Dateigröße in MB

■ Dateigröße in MB für den einzelnen Schnitt ■ Dateigröße in MB für den kompletten Fall



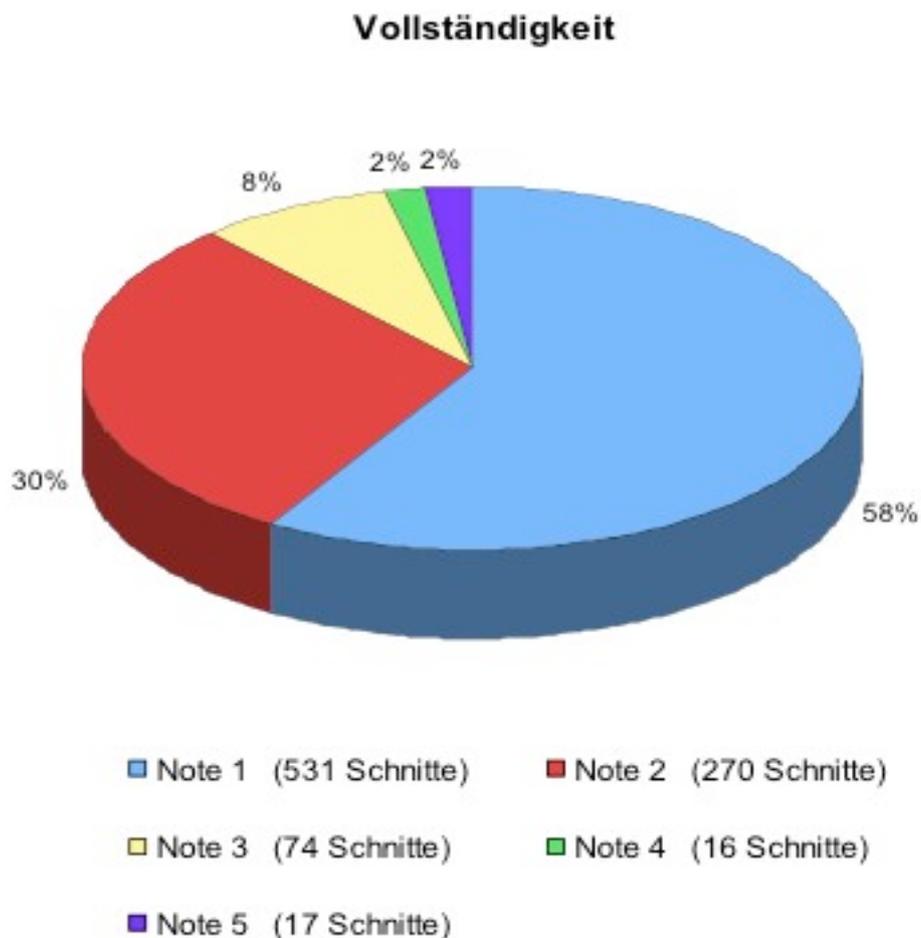
	Mittelwert	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum	Standardabweichung
Dateigröße in MB für den einzelnen Schnitt	215	10	128	187	255,3	2220	166,6869
Dateigröße in MB für den kompletten Fall	2045	297	1406	1849	2378	5440	1070,125

**Abbildung 17:** Dateigröße in MB für den einzelnen Schnitt und den kompletten Fall

## 4.2 Bewertung der Bildqualität

### 4.2.1 Vollständigkeit

Jeder Schnitt wurde auf seine Vollständigkeit hin überprüft und mit den Noten von 1- 5 bewertet.



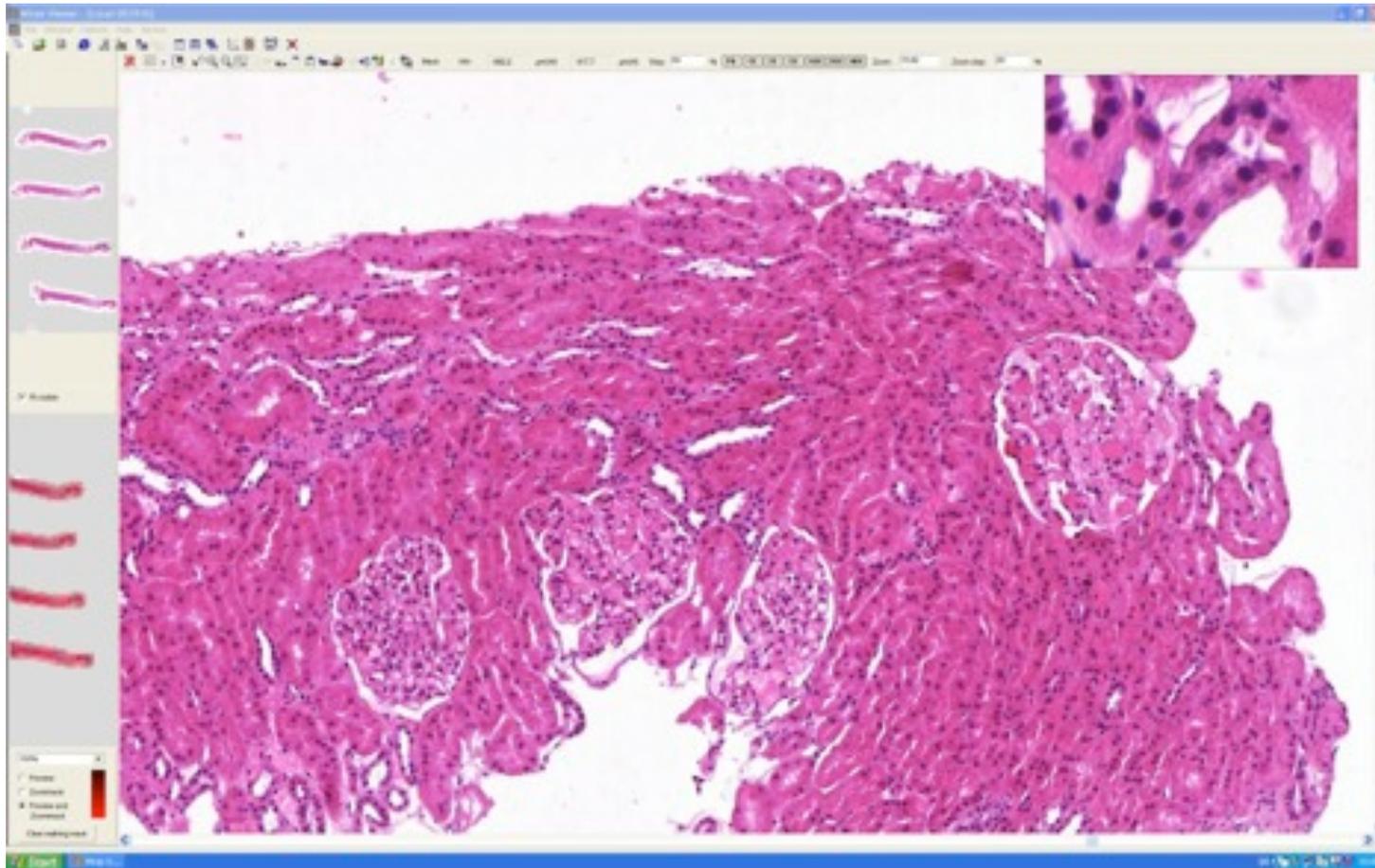
**Abbildung 18:** Benotung der einzelnen Schnitte bezüglich der Vollständigkeit

Die nachfolgende Tabelle listet die Gründe für eine eventuell auftretende Unvollständigkeit auf. Dabei musste zwischen Mängeln unterschieden werden, die einerseits technischen Ursprungs waren (z.B. Präparat zu groß, siehe Abbildung 20 oder Gewebe nicht mittig platziert, siehe Abbildung 22) oder die andererseits im Präparat selbst zu finden waren (z.B. zu helle Färbung des Gewebes, siehe Abbildung 21).

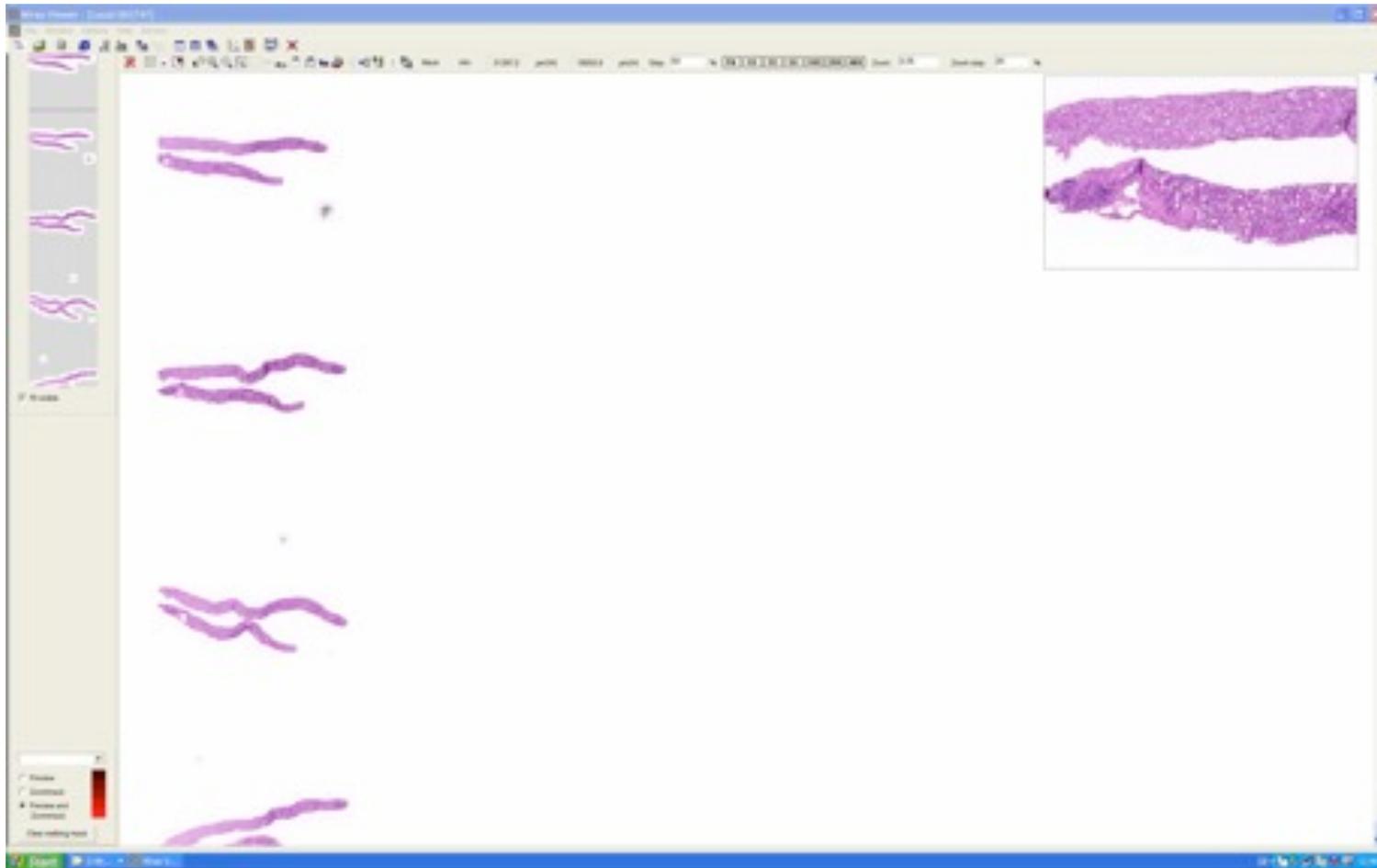
**Tabelle 6:** Gründe für die Unvollständigkeit der einzelnen Schnitte

	<b>Benotung</b>				
	<b>Note 1</b>	<b>Note 2</b>	<b>Note 3</b>	<b>Note 4</b>	<b>Note 5</b>
<b>Anzahl der Schnitte</b>	<b>531</b>	<b>270</b>	<b>74</b>	<b>16</b>	<b>17</b>
<b>Gründe</b>					
Zu helle Färbung der Präparatränder	-	164	4	-	-
Zu helle Färbung einiger Präparatausschnitte	-		48	9	-
Gewebe auf dem Objektträger nicht mittig platziert	-	105	17	3	-
Zu helle Färbung des kompletten Präparates	-	-	-	4	17
Präparat war zu groß	-	1	5	-	-

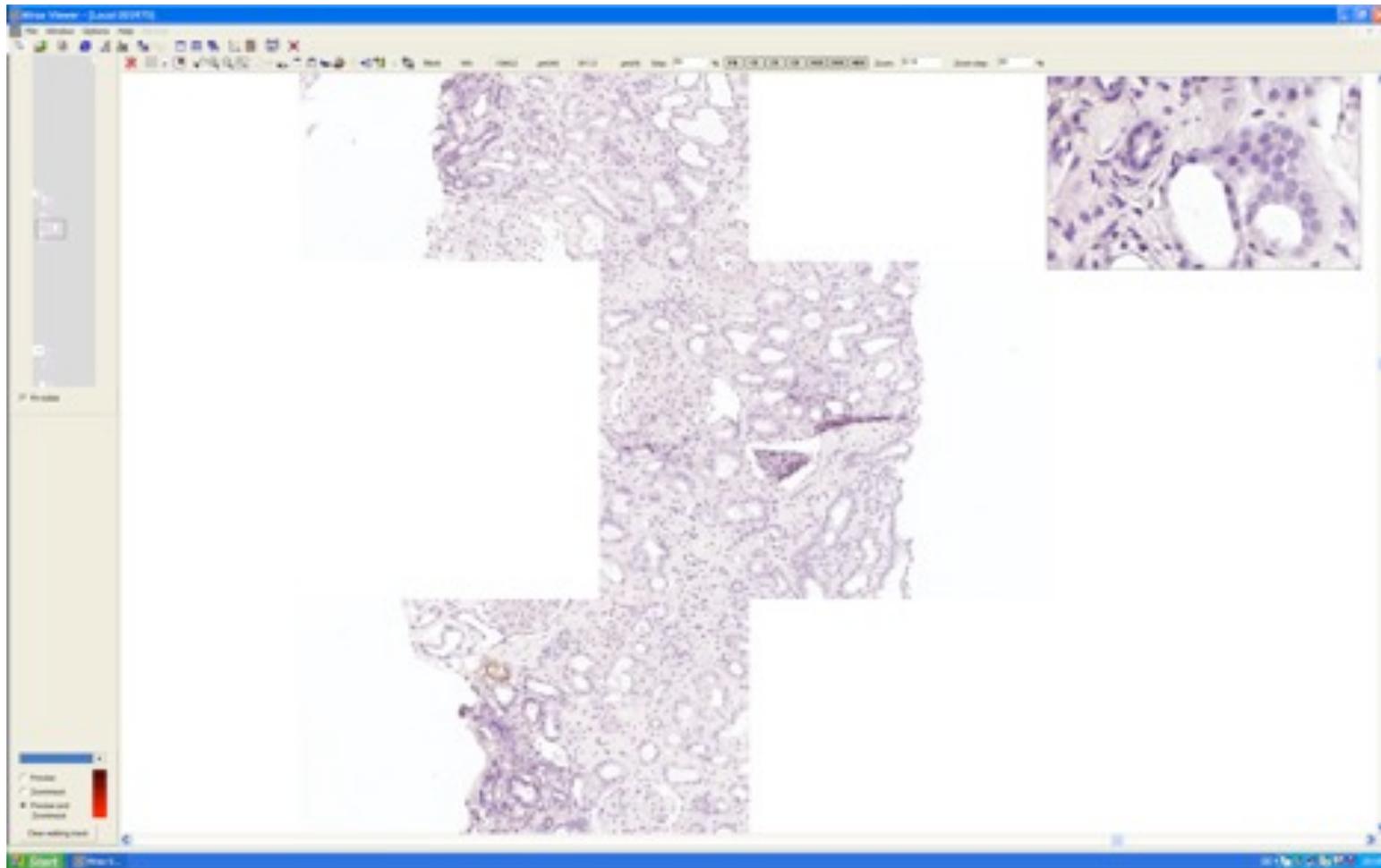
Die nachfolgenden Abbildungen 19 bis 21 zeigen Beispiele für die Benotung bezüglich der Vollständigkeit der WSI.



**Abbildung 19:** Nierenzylinder in HE- Färbung - Note 1

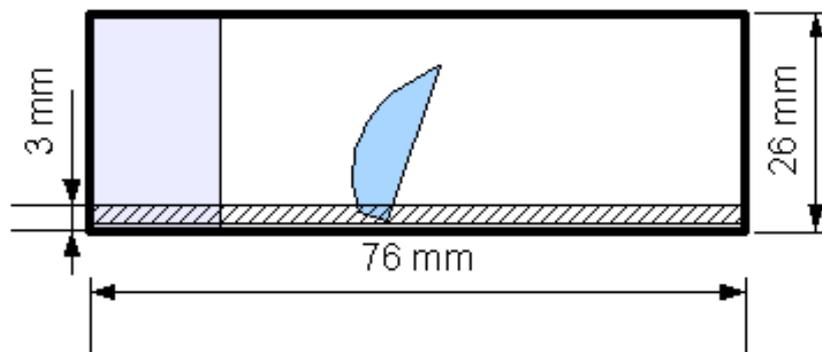


**Abbildung 20:** Nierenzylinder in HE- Färbung - Note 2 (Präparat zu groß)



**Abbildung 21:** Nierenzylinder in Amyloidfärbung - Note 5 (zu helle Färbung des kompletten Präparates)

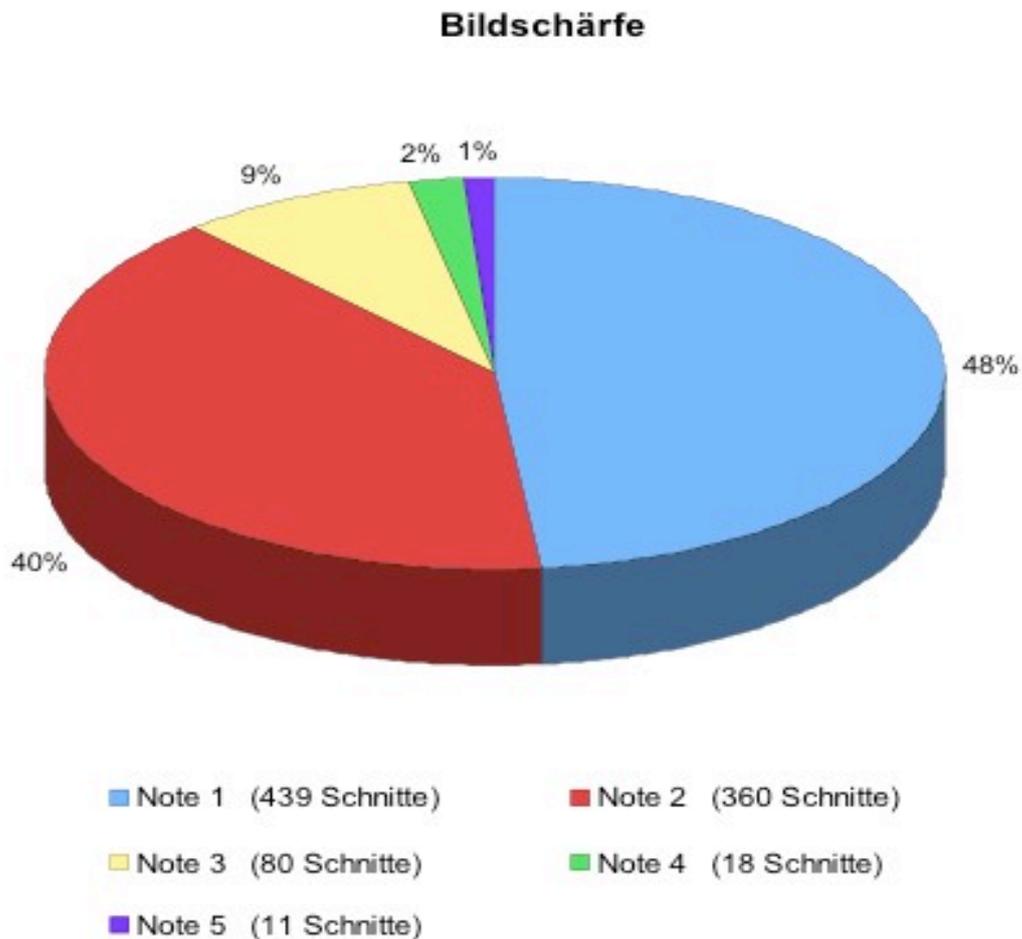
Ein technischer Mangel des Zeiss MiraxScan war, dass beim Scanvorgang drei Millimeter der rechten Seitenkante des Objektträgers nicht erfasst wurden. Bei einer Seitenlänge von 76 mm war ein Gebiet von 228 mm<sup>2</sup> betroffen. Lag der Stanzzylinder nun nicht in der Mitte oder nahm er die gesamte Breite des Objektträgers ein, wurde dieses Areal an der rechten Seitenkante nicht erfasst. Dadurch kam es zu unvollständigen Präparaten. Dieser technische Fehler tritt bei der aktuellen Generation des Mirax Scan nicht mehr auf.



**Abbildung 22:** schematische Darstellung, bei dem der Nierenzylinder nicht mittig platziert ist

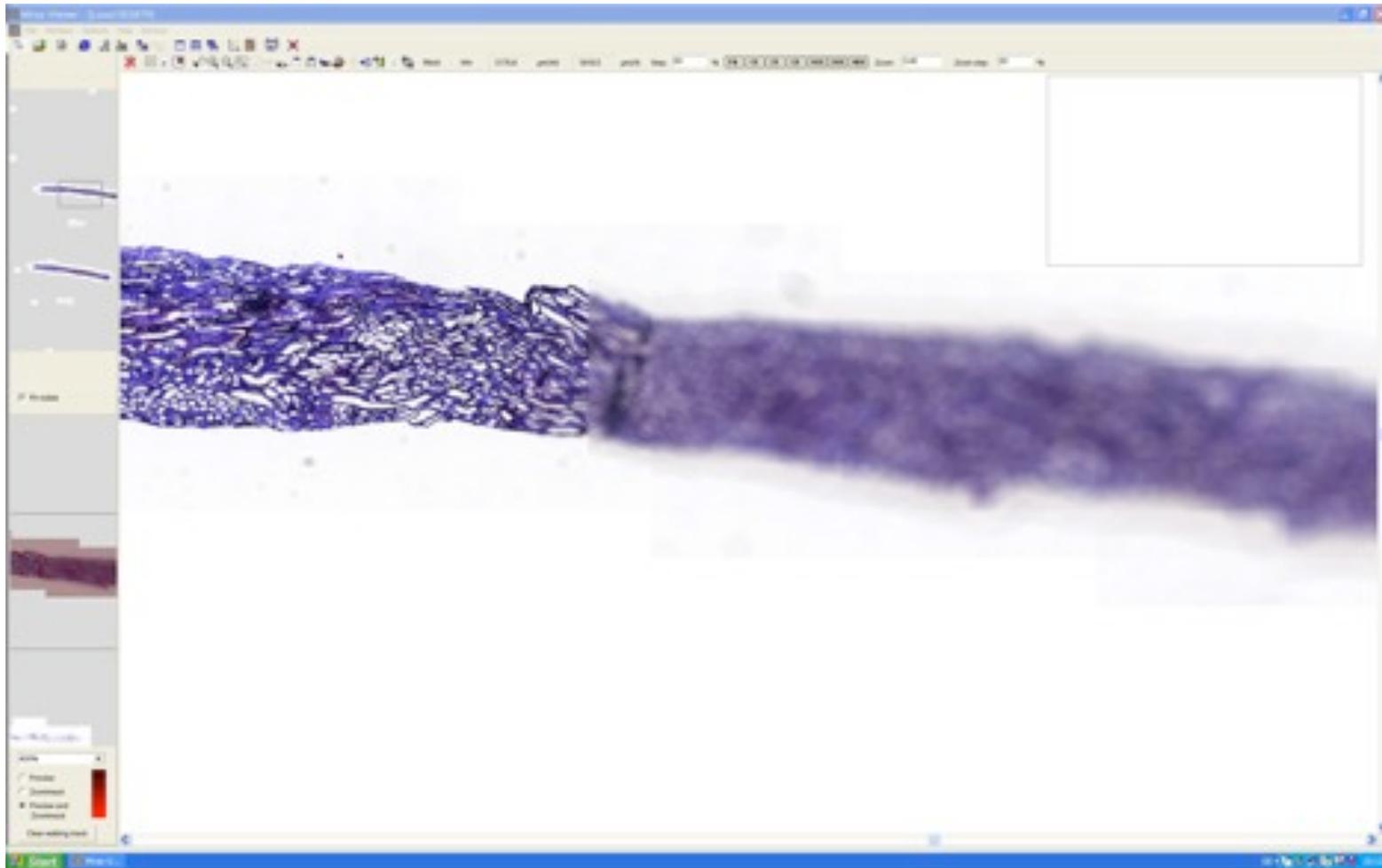
## 4.2.2 Bildschärfe

Die Bildschärfe wurde für jeden Schnitt einzeln erfasst und mit den Noten von 1 bis 5 bewertet.



**Abbildung 23:** Benotung der Schnitte bezüglich der Bildschärfe

Dabei musste zwischen Mängeln unterschieden werden, die im Präparat selbst begründet waren (z.B. starke Verschmutzung) und technischen Problemen (falsche Berechnung der Fokusebene durch den Scanner). Die Qualität des Originalobjektträgers war aber der wesentliche Faktor für die Bildqualität beim Scannen. Starker Schmutz oder eine starke Hintergrundfärbung konnten zu Fehlern beim Autofokus führen. Bei einigen Bildern kam es vor, dass das Präparat ganz oder teilweise außerhalb der Fokusebene lag (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Nierenzylinder in SFOG- Färbung - Note 5 (falsche Berechnung der Fokusebene)

Die nachfolgende Tabelle listet die weiteren Gründe auf, die zur Beeinträchtigung der Bildschärfe führten.

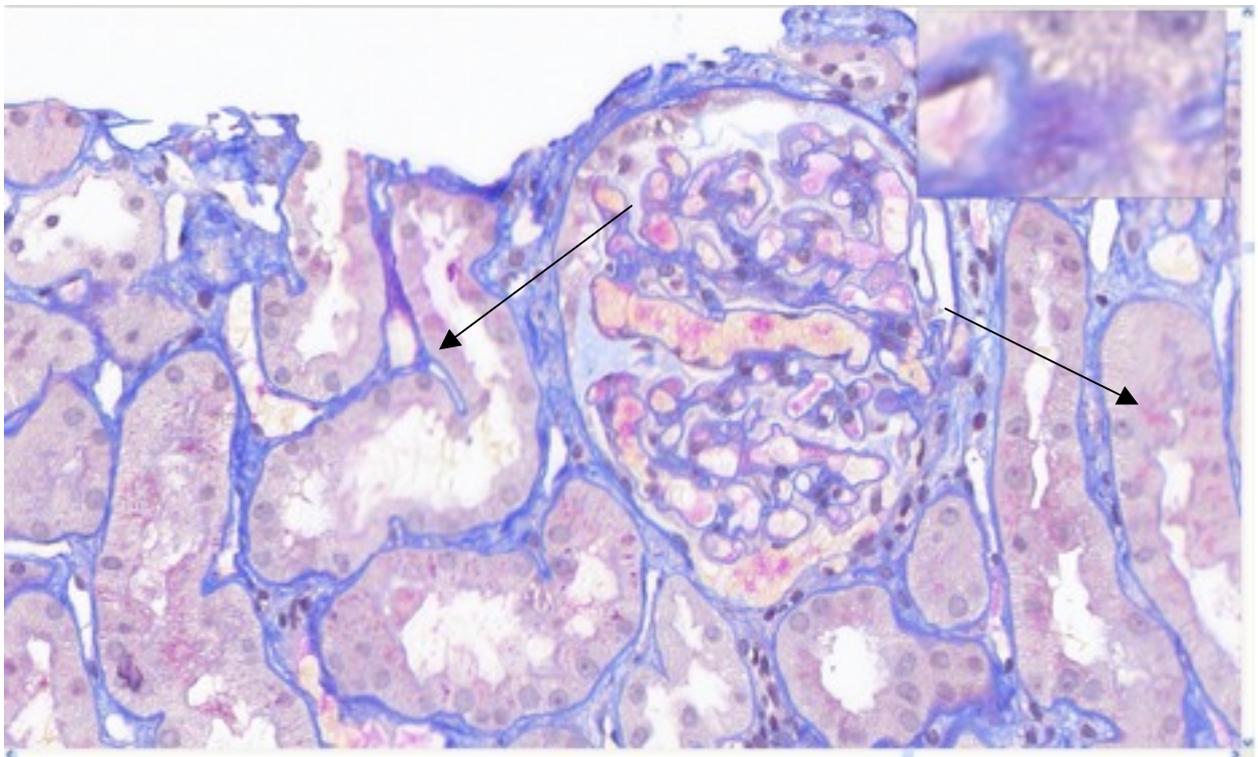
**Tabelle 7:** Faktoren, die zu einer Beeinträchtigung der Bildschärfe führten

	<b>Benotung</b>				
	<b>Note 1</b>	<b>Note 2</b>	<b>Note 3</b>	<b>Note 4</b>	<b>Note 5</b>
<b>Anzahl der Schnitte</b>	439	360	80	18	11
<b>Keine zusätzlichen Bemerkungen</b>	439	358	71	16	10
<b>Gründe</b>					
Fehler beim Bildzusammenbau	-	-	-	2	-
Hintergrund zu stark verschmutzt	-	-	6	-	-
Fleck	-	2	2	-	-
Haar	-	-	1	-	-
Luftblase	-	-	-	-	1

### 4.2.3 Stitching

Im Rahmen dieser Studie wurde keine zusätzliche Software installiert, um das spezifische Stitching durchzuführen, das ein optimales Zusammenfügen der Einzelbilder in x- und y- Achse gewährleisten sollte. Es traten die technisch bedingten Überlappungen und erkennbaren Kachelungen auf, die an Farb- und Kontrastunterschieden erkennbar waren.

Die nachfolgende Abbildung zeigt ein WSI in sehr hoher Vergrößerung (x 200), bei dem die Schnittstellen zwischen den Einzelbildern sichtbar wurden und zu Unschärfen führten:

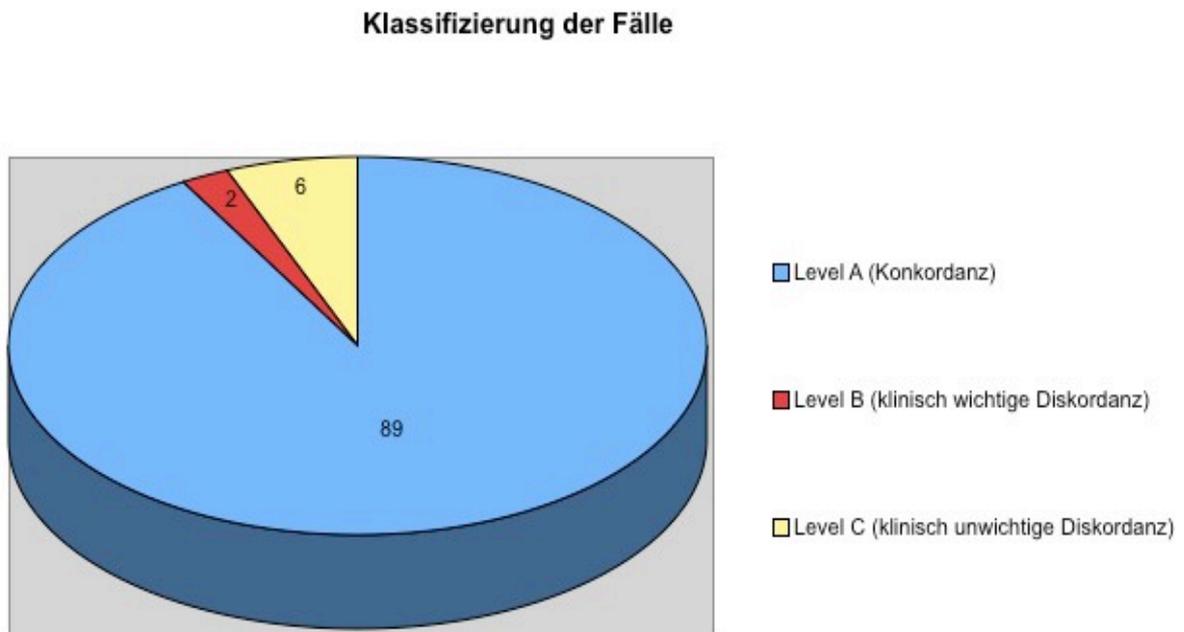


**Abbildung 25:** WSI in hoher Vergrößerung (x 200) mit Schnittstellen der Einzelbilder

Für den diagnostischen Prozess waren diese Bildfehler vernachlässigbar. Sie wurden von keinem der PathologInnen als problematisch in der Bildqualität hervorgehoben und stellten somit lediglich ein ästhetisches Problem dar.

### 4.3 Diagnostische Konkordanz

Insgesamt 97 Fälle der Routinediagnostik wurden zunächst von einer Pathologin konventionell diagnostiziert und von zwei weiteren Ärzten virtuell nachbefundet.



**Abbildung 26:** Klassifizierung der Fälle

Nach Auswertung der Ergebnisse zeigte sich bei 89 Fällen (= 92%) eine diagnostische Übereinstimmung, eine Konkordanz.

Bei den übrigen 8 Fällen (8%) stellten die Pathologen verschiedene Diagnosen, d.h. die Ergebnisse waren diskordant. Die Diskordanz wird in 2 Stufen unterteilt. Man unterscheidet zwischen einer klinisch wichtigen oder einer klinisch unwichtigen Diskordanz.

Bei 2 Fällen (2%) wurde eine klinisch wichtige Diskordanz festgestellt, d.h. die Diagnosen waren so verschieden, dass sich nach Diagnosestellung eine jeweils andere Therapie anschließen würde.

Bei 6 Fällen (6%) gab es ebenfalls nicht übereinstimmende Diagnosen, diese Unterschiede waren aber für eine anschließende Therapie nicht von Bedeutung.

Nach Molnar 2003 ist die unterschiedliche Interpretation eines Pathologen (Klasse II) der Grund für die auftretende Diskordanz in den 8 Fällen. Die Fälle, bei denen es keine diagnostische Übereinstimmung gab, wurden nochmals von den drei Pathologen zusammen untersucht und erneut diagnostiziert.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 *Nephropathologische Diagnostik und virtuelle Mikroskopie*

In der Pathologie nimmt die nephropathologische Diagnostik auf Grund des hohen technischen Aufwandes für die Bearbeitung eines Falles eine besondere Stellung ein. Zunächst werden Stufenschnitte in der Standardfärbung HE und PAS angefertigt, dann folgen die Spezialfärbungen SFOG, Amyloid und Movat. Im Anschluss folgt ein umfangreiches immunhistochemisches Programm. Dazu wird die Technik der Immunfluoreszenz verwendet. Zur Diagnostik der primären glomerulären Erkrankungen ist zudem die Durchführung einer elektronenmikroskopischen Untersuchung notwendig. Erst im Resümee der histologischen, immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Befunde, sowie der klinischen Daten ist eine pathomorphologische Diagnose möglich.

Die Anforderungen an die Qualität des Schnittpräparates sind sehr hoch. Probleme in der Fixierung des Materials oder beim Färbeprozess führen zu Artefakten und schränken die diagnostischen Möglichkeiten stark ein. Beim Mikroskopieren ist es häufig notwendig, mit einer hohen Vergrößerung (40x, 68x oder 100x Ölimmersion) zu arbeiten, um die glomerulären Veränderungen sicher zu differenzieren. Die aufgeführten Gründe zeigen die hohen Anforderungen der nephropathologischen Diagnostik an die virtuelle Mikroskopie.

Die Studie zeigt, dass die virtuelle Mikroskopie in der Nierenpathologie eingesetzt werden kann. Es zeigt sich eine hohe diagnostische Konkordanz zwischen den konventionell erstellten Diagnosen und den virtuell erstellten Diagnosen. Mit dem verwendeten Objektträgerscanner können WSI von guter Bildqualität für die nephropathologische Diagnostik erstellt werden. Eingeschränkt wird der Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Nephropathologie durch das Fehlen von speziellen Untersuchungsmethoden wie die Elektronenmikroskopie, die Immunfluoreszenz und die Polarisation. Mit Objektträgerscannern der neueren Generation (z.B. Mirax Midi, Zeiss) können Spezialuntersuchungen wie die Immunfluoreszenz nun durchgeführt werden.

## **5.2 Integration der virtuellen Mikroskopie in die nephropathologische Diagnostik**

Die Routinediagnostik ist eines der wichtigsten Teilgebiete der Pathologie. In einem Jahr werden an der Charite etwa 900 Nierenbiopsien durchgeführt und begutachtet. Die Untersuchungen sollten schnell und effizient durchgeführt werden können, daher muss bei einem Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der nephropathologischen Routinediagnostik hohe Anforderungen gestellt werden.

In dieser Studie wird besonders auf die Bildqualität der WSI und die diagnostische Konkordanz näher eingegangen. Zusätzlich werden zur Erfassung der Scannereigenschaften technische Parameter der WSI wie Scanzeit und Speicherbedarf untersucht.

### **5.2.1 Bildqualität der WSI**

Das WSI ist eine digitalisierte Kopie eines Glasobjektträgers und enthält somit sämtliche Artefakte des Originalpräparates (Kalinski T 2005). Für eine genaue Diagnosestellung ist es daher wichtig, dass die Bildqualität des Originalpräparates so hoch wie möglich ist, denn sie bestimmt letztendlich die Qualität des WSI. (Demichelis F 2002b, Glatz-Krieger K 2003). Der Schnitt sollte keine Risse, Falten oder Verunreinigungen aufweisen und auch die Färbung sollte gut erkennbar sein.

Die Aufnahme des WSI kann auch durch spezielle Fotokameras mit CCD- oder CMOS-Bildsensoren verbessert werden (Molnar B 2003, Riley R 2004).

In dieser Studie wurden drei wichtige Faktoren untersucht, die für die Bildqualität eines WSI eine entscheidende Rolle spielen:

- die Vollständigkeit
- die Bildschärfe
- das Stitching

Für eine nephropathologische Diagnostik sind zum Teil spezielle Untersuchungsmethoden wie Elektronenmikroskopie, Immunfluoreszenz und Polarisation notwendig.

In dieser Studie konnten die zusätzlichen Untersuchungen nicht durchgeführt werden, da der Objektträgerscanner nicht über eine Fluoreszenzoption verfügte. Die neueren

Modelle des Mirax Scan ( z.B. Mirax Midi, Zeiss) verfügen über diese Option, die bei Bedarf eingesetzt werden kann.

Die Polarisation ist eine spezielle Untersuchungsmethode, die nur bei bestimmten Fragestellungen angewendet wird. Mit den verfügbaren Objektträgerscannern kann die Polarisation noch nicht durchgeführt werden. Einerseits fehlten dafür die technischen Voraussetzungen, andererseits bedeutet diese Untersuchungsmethode einen zusätzlichen Zeitaufwand und Speicherbedarf, da der Objektträger nach Bedarf erneut gescannt werden muss.

### **Vollständigkeit**

Von insgesamt 908 Glasobjektträgern wurden 531 (58%) Präparate vollständig erfasst, 270 (30%) Schnitte erhielten die Note 2, 74 (8%) die Note 3 und jeweils 2% der Objektträger wurden mit den Noten 4 (16 Schnitte) bzw. 5 (17 Schnitte) bewertet.

Die Hauptursache für einen unvollständigen Scanvorgang der Schnitte war eine zu helle Färbung des Präparates bzw. Präparatanteile. Dies traf auf 246 (27%) WSI zu. Ebenfalls trugen die ungenaue Platzierung des Gewebes auf dem Objektträger sowie die Größe des Gewebes zu unvollständigen Scanergebnissen bei.<sup>4 5</sup>

Obwohl 377 (42%) Schnitte nicht vollständig erfasst wurden, wurde die Diagnostik erst dann beeinträchtigt bzw. war eine Diagnostik nicht möglich, sobald große Anteile des Schnittes nicht erfasst wurden. Dies traf auf insgesamt 97 Präparate (12%) zu, die mit der Note 3 oder schlechter bewertet wurden. Da von einer Nierenbiopsie immer durchschnittlich 2- 3 Stufenschnitte in der jeweiligen Färbung angefertigt wurden, standen dem Pathologen dementsprechend auch 2- 3 WSI von einer Färbung zur Verfügung. Damit konnte der Pathologe auch eine Diagnose stellen, wenn einer der Stufenschnitte mit der Note 3 oder schlechter bewertet wurde.

---

<sup>4</sup> Gewebe war nicht in der Mitte des Objektträgers platziert

<sup>5</sup> Gewebe war insgesamt so groß, dass der Scanner die Randabschnitte nicht genau erfassen konnte

## **Bildschärfe**

In dieser Studie erhielten von 908 WSI 439 (48%) die Note 1. Insgesamt wiesen 469 (52%) der Präparate Unschärfen auf, 360 (40%) davon wurden mit der Note 2 bewertet, 80 (9%) mit der Note 3 und 18 (2%) bzw. 11 (1%) erhielten die Noten 4 bzw. 5. Dennoch war nur bei 29 WSI (3%) eine Diagnostik nur eingeschränkt bzw. unmöglich. Ursächlich dafür war die Positionierung des Gewebes auf den Objektträgern außerhalb der Fokusebene des Scanners. Bei 12 WSI (1,4%) war die Beschaffenheit des Originalschnittes der Grund für Unschärfen des virtuellen Präparates. Ein stark verschmutzter Hintergrund, Flecken, ein Haar und eine Luftblase beeinträchtigten die Bildaufnahme und verhinderten damit eine optimale Bildqualität. Zusätzlich zeigten 2 WSI einen unvollständigen Bildaufbau. Dieser Fehler konnte mit technischen Problemen begründet werden.

Die übrigen Präparate zeigten nur bei hohen Vergrößerungen einzelne Unschärfen, die eine Diagnostik nicht wesentlich beeinträchtigten.

Die handelsüblichen Objektträgerscanner nehmen die Schnitte in nur einer Brennebene (z- Ebene) auf. Daher führen Falten und eine zu hohe Schichtdicke des Präparates zu einer Beeinträchtigung der Bildqualität. (Costello SSP 2003, Kalinski T 2005, Steinberg DM 2002). Für eine genaue Diagnostik muss der Schnitt jedoch mehrere Brennebenen aufweisen, damit der Pathologe auch kleinste Details wie virale Einschlüsse erkennen kann (Demichelis F 2002b).

Eine Verbesserung der Bildschärfe könnte durch das mehrdimensionale Scannen in verschiedenen Fokusebenen erreicht werden (Lundin M 2004b). Um den Speicherbedarf aber nicht unnötig zu erhöhen, muss das mehrdimensionale Scannen nur auf die betroffenen Gebiete beschränkt bleiben (Kalinski T 2005).

## **Stitching**

Das fehlende softwareoptimierte Stitching, das Zusammenfügen von Einzelbildern zu einem Gesamtbild, führte nicht zu einem Kacheleffekt, der durch Überlappungen, Farb- und Kontrastunterschiede der Einzelbilder entstehen kann. Bei sehr hohen Vergrößerungen (> x200) zeigten sich auf den WSI einzelne Unschärfen, die aber für eine genaue Diagnosestellung ohne Bedeutung waren.

## **Scanzeit**

In der Nephropathologie werden täglich bis zu 60 Präparate mikroskopisch untersucht. Deshalb ist es für eine Integration in die Routinediagnostik nötig, dass die einzelnen Schnitte in einer möglichst kurzen Zeit digitalisiert werden. Die Zeitdauer dafür ist abhängig von der Größe des Präparates.

Der Zusammenhang zwischen der Scanzeit und der Größe der zu scannenden Fläche wird durch die Abbildung 15 dargestellt. Bei Objektträgern mit kleineren Gewebeproben kam es zu einer größeren Streuung bei den Scanzeiten. Gründe dafür können sein, dass die Berechnung der Schärfeebenen bei kleineren Proben komplizierter ist und/oder dass sich der Abstand von einem Areal zum nächsten sich nachteilig auf die Gesamtzeit auswirkt.

In dieser Studie betrug die Größe eines Schnittes im Durchschnitt 73,9 mm<sup>2</sup>. Somit ergibt sich für den einzelnen Schnitt eine mittlere Scanzeit von 4,6 min. Nach Demichelis F 2006 ist eine Scanzeit von mehreren Minuten für einen Glasobjektträger zu langsam für die Routinediagnostik.

Eine mögliche Lösung wäre die parallele Anschaffung von mehreren Objektträgerscannern, soweit dies im Rahmen der finanziellen Möglichkeiten liegt (Kalinski T 2005, Glatz- Krieger K 2005b)

Der Objektträgerscanner, den wir verwendeten, basierte auf einem „single- axis“- System, d.h. die Schnitte wurden mittels einer einzelnen Linse gescannt. Eine andere Möglichkeit wäre daher das miniaturisierte Reihenmikroskop, das auf sog. Linsenreihen basiert, mit dem man einen kompletten Objektträger in weniger als 1 Minute scannen kann (Weinstein RS 2004).

## **Speicherbedarf**

Der Speicherbedarf für die Präparate, die täglich in der Routinepathologie untersucht werden müssen, ist enorm. Durch eine Komprimierung mittels Wavelet- Verfahren können die Dateigrößen bis max. auf 1/20 minimiert werden. (Leong FJ 2001)

In dieser Studie wurden 908 Schnitte von insgesamt 97 Fällen digitalisiert. Durchschnittlich benötigte jedes komprimierte Präparat 215 MB.

Bei bis zu 60 Präparaten in der Nephropathologie täglich würde dies auf einen Speicherplatz von mehreren Gigabytes hinauslaufen. In einem ganzen Jahr würden dann für die nephropathologischen Schnitte Speicherkapazitäten von mehreren hundert Terabyte benötigt werden. Diese Speicherkapazitäten sind im Moment noch nicht vorhanden. Aber die ständige Weiterentwicklung der Computertechnologie wird auch dieses Problem in einigen Jahren lösen können.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine höhere Komprimierungsrate für die Dateien. Diese müssen über spezielle Algorithmen aber noch entwickelt werden (Kaliniski T 2005). Dabei ist zu beachten, dass die Diagnostik durch die höhere Komprimierung, wie 1: 25 und 1: 30 nicht beeinträchtigt wird. (Tuominen VJ 2008) Zum Beispiel könnten bestimmte Strukturen wie extrazelluläre Matrices ohne diagnostische Relevanz deutlich höher komprimiert werden. (Kaliniski T 2005, Lee SH 2005).

### **5.2.2 Diagnostische Konkordanz**

In dieser Studie wurden insgesamt 97 nephropathologische Fälle jeweils konventionell bzw. virtuell diagnostiziert. Die Diagnosen der Pathologen stimmten in 92% der Fälle (89 Fälle) überein. Eine Diskordanz wurde in 8% der Fälle (8 Fälle) gefunden, wobei die Diagnosen von 6 Fällen in Hinblick auf die anstehende Therapie keine relevante Unterschiede aufwiesen. Bei 2 Fällen jedoch waren die Diagnosen jedoch so verschieden, dass es sich hierbei um eine klinisch wichtige Diskordanz handelt.

Die Gründe für eine auftretende Diskordanz werden in 3 Klassen eingeteilt. In dieser Studie war eine unterschiedliche Interpretation der Pathologen (Klasse II) ausschlaggebend für die Diskordanz. Grund dafür war ein unterschiedlicher Ausbildungsstand in der nephropathologischen Diagnostik der zwei Pathologen. Bei 2 Fällen war die Bildqualität sehr schlecht (Klasse I), dennoch wurden in diesen beiden Fällen übereinstimmende Diagnosen gestellt. Für jeden Fall lagen den Pathologen dieselben klinischen Informationen vor, so dass fehlende Angaben (Klasse III) in keinem der Fälle ein Grund für eine Diskordanz war.

### 5.2.3 Vorteile der virtuellen Mikroskopie für die nephropathologische Diagnostik

Die virtuelle Mikroskopie hat sich aufgrund der aufgezeigten technischen Einschränkungen noch nicht in der Routinediagnostik etabliert. Dennoch lassen sich jetzt schon viele positive Effekte einer Umstellung erahnen: (Saeger K 2003, 2006)

- Um die Untersuchung der WSI für den Pathologen zu vereinfachen, wäre es denkbar, dass in naher Zukunft, die Maus oder das Touchpad dahingehend verändert werden, dass die Steuerung und die Position innerhalb des WSI mit Eingabegeräten erfolgen, die mehr den Mikroskopbedienelementen ähneln (Kalinski T 2005).
- Der Arbeitsablauf vereinfacht sich, da die WSI in eine elektronische Patientenakte integriert werden können (Lee SH 2005, Kalinski T 2005).
- Arbeitsschritte werden eingespart, denn die Suche nach Vorbefunden und Präparaten im Archiv entfällt. Bei der Fallvorstellung können nun alle Ärzte gleichzeitig den Schnitt untersuchen, das „Anstehen vor dem Mikroskop“ entfällt (Saeger K 2006a)
- Für die Qualitätssicherung ist eine Überprüfung des Diagnoseprozesses durch den Chefarzt wichtig. Dies kann er mittels der virtuellen Mikroskopie nun tun, ohne anwesend sein zu müssen. Bei unklaren Diagnosen ist dem Pathologen die Möglichkeit einer standardisierten Präparatedurchsicht gegeben (Saeger K 2006a)
- Der Pathologe kann seine Arbeitszeit und seinen Arbeitsort flexibler gestalten, da er nun orts- und zeitunabhängig auf jeden Schnitt über Netzwerke zugreifen kann (Demichelis F 2002b). Die einzelnen Fälle können nach fachlichen Schwerpunkten unter den Pathologen aufgeteilt werden.
- Für den Pathologen ist die Betrachtung der WSI über einen Bildmonitor komfortabler als der Blick durch das Okular eines Lichtmikroskops, da mehr Bildinformationen sichtbar sind. (Molnar B 2003, Lundin M 2004)
- Der Dialog zwischen den unabhängigen Pathologieinstituten einerseits und andererseits auch innerhalb der einzelnen Fachdisziplinen wird vereinfacht und verbessert. (Hufnagl P 2003, Glatz- Krieger K 2005b)

### **5.3 Faktoren, die die Einführung der virtuellen Mikroskopie behindern**

Faktoren unterschiedlichster Art behindern die breite Einführung der virtuellen Mikroskopie.

Die Ergebnisse einer Studie aus Großbritannien zeigten, dass nur wenige Pathologen Interesse hatten, diese neue interaktive Arbeitsweise kennen zu lernen, zu nutzen und in ihren Alltag zu integrieren. Diese Ärzte nahmen auch nicht an Umfragen teil, so dass es den Initiatoren der Studie schwer fiel, deren Gründe für ihr Desinteresse zu erfahren und auf eventuelle Wünsche und Verbesserungsvorschläge bei der Weiterentwicklung einzugehen. (Bamford WM et al. 2003)

Damit die virtuelle Mikroskopie von Pathologen akzeptiert werden kann, ist es für sie wichtig zu wissen, dass die Verwendung dieser interaktiven Arbeitsweise keine Konkurrenzsituation für diagnostisch tätige Pathologen darstellt (Mairinger T 2000), da derzeit kein Überangebot an Pathologen besteht (Kant JA 2004, Ruiter R 2004).

Umfrageergebnisse einer anderen Studie zeigten, dass zudem noch nicht alle Nutzer über eine ausreichend schnelle Internetanbindung für eine gute Bildvisualisierungsgeschwindigkeit verfügen. Über kurz oder lang wird sich dieses Problem an Universitäten und anderen großen Einrichtungen von selbst lösen. (Glatz- Krieger K 2005a)

Desweiteren fiel es den Pathologen und Studenten mit unzureichender Computererfahrung schwer, an einem Monitor WSI zu untersuchen. (Glatz- Krieger K 2005b, Demichellis F 2002, Leong FJ 2001, Lundin M 2004) Eine Lösung wären spezielle Lehrgänge, in denen die Pathologen und Studenten erlernen, wie man mit Hilfe eines virtuellen Mikroskops genaue Diagnosen stellt. (Glatz- Krieger K 2005b)

Ein weiterer nicht zu unterschätzender Faktor ist die intuitive Wahrnehmung eines Pathologen, wenn er einen Schnitt unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Dieser unbewusste Anteil kann in die Diagnosestellung miteinfließen. Es bleibt abzuwarten, ob diese Wahrnehmung auch bei der Betrachtung von WSI an einem Computermonitor vorkommt. (Lundin M 2004).

## **5.4 Ausblick**

Die virtuelle Mikroskopie könnte in der Zukunft noch in vielen weiteren Anwendungsbereichen ihren Einsatz finden, sobald die technischen Voraussetzungen dafür gegeben wären.

### **5.4.1 Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Weiterbildung**

#### Aufbau von Bilddatenbanken

Für den Aufbau von öffentlich zugänglichen Bilddatenbanken kann die virtuelle Mikroskopie genutzt werden.

Durch die stetige Weiterentwicklung der Computertechnologie in den meisten Instituten und durch den Ausbau des Internets haben immer mehr Studenten und Ärzte die Möglichkeit eine Bilddatenbank in Anspruch nehmen (Glatz- Krieger K 2003).

Gleichzeitig würde sich so die Ausbildung von Studenten und Ärzten im Fachgebiet Pathologie national und international verbessern und angleichen. (Ruiter DJ 2004, Van den Tweel J 2002, Weinstein RS 2003)

Derzeit gibt es noch relativ wenige Datenbanken, die öffentlich zugänglich sind. Eine der ersten und größten Sammlungen von WSI ist die „Virtual Slide Box“ der Universität von Iowa, USA (Harris T 2001). Weitere Beispiele für die Bilddatenbanken mit virtuellen Präparaten sind „Interpath“, ein norwegisches Projekt (Glatz- Krieger K 2003), „Eslide“, ein Projekt der Universität von Udine, Italien (Demichelis F 2002b), „Virtual Pathology Slide“, ein Projekt der Universität von Dublin, Irland (Costello SP 2002), „Webmicroscope“, ein Projekt der Universitäten von Tampere und Helsinki, Finnland (Helin M 2005) und „vMic“, ein Projekt der Universität von Basel, Schweiz (Glatz- Krieger K 2003).

Diese Sammlungen von WSI sind für Studenten erstellt worden, Bilddatenbanken für ausgebildete Pathologen sind derzeit noch nicht verfügbar. Denkbar wäre, dass internationale Einrichtungen wie das National Biospecimen Network WSI, die alle Gebiete der Pathologie abdecken sowie seltene Befunde darstellen, sammeln und archivieren und diese anderen Bilddatenbanken und damit auch anderen Pathologen zur Verfügung stellen (Glatz- Krieger K 2005b, Weinstein RS 2004)

## **5.4.2 Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Diagnostik**

### Die intraoperative Schnellschnittuntersuchung

Bei der Schnellschnittuntersuchung, einem Gebiet der pathologischen Diagnostik, kamen bisher motorisierte Robotermikroskope und deren Übertragung von Live- Bildern via Internet zum Einsatz (Saeger K 2006). Die Technik der virtuellen Mikroskopie ist für diese Art von Diagnostik nicht ausgereift, da der Scanvasvorgang eines Präparates derzeit noch zuviel Zeit in Anspruch nimmt (Kalinski T 2005). Mit einem ultraschnellen Slide Scanner könnte aber auch dieses Problem in den nächsten Jahren behoben werden (Weinstein RS 2004).

### Erstellung einer primären digitalen Biopsie

Der Einsatz der virtuellen Mikroskopie in der Primärdiagnostik ist denkbar, da digital erstellte Diagnosen durchaus vergleichbar mit konventionell erstellten Diagnosen sind (Kalinski T 2005, Gilbertson JR 2006).

Ein denkbar neuer Ansatz wäre die Erzeugung einer sog. optischen Biopsie. Hierbei wird, ohne dabei vom Patienten Gewebe entnehmen zu müssen, eine primäre digitale Probe erstellt (Gombas P 2004).

Für einen Einsatz in der Primärdiagnostik müssen die Bildschirme und die Scanner zunächst nach den technischen Richtlinien für die In- vitro- Diagnostik standardisiert werden und auch von der Gesetzgeberseite aus dürfen keine Einschränkungen vorliegen (Kalinski T 2005).

### **5.4.3 Einsatz der virtuellen Mikroskopie im Krankenhaus- Management**

#### Aufbau eines digitalen Archivs

Aufgrund der Gesetzgebung müssen histologische Präparate 10 Jahre lang aufbewahrt werden. Das hat wiederum zur Folge, dass sich in einem pathologischen Archiv zehntausende Objektträger befinden, die auf Anfrage herausgesucht werden müssen (Saeger K 2006).

An dieser Stelle werden die Vorteile des Einsatzes der virtuellen Mikroskopie beim Aufbau eines digitalen Archivs deutlich: WSI benötigen kaum Platz und die Suche nach einem bestimmten Präparat erfolgt effektiver als auf herkömmliche Weise (Kalinski T 2005).

Dennoch ist aus technischen Gründen der Aufbau eines digitalen Archivs derzeit noch nicht möglich. Der Speicherbedarf für die WSI ist enorm, aber dank der technischen Weiterentwicklungen werden Speicherkapazitäten von mehreren Terabytes in nicht allzu weiter Ferne liegen (Glatz- Krieger K 2005b).

Ein weiteres Problem stellt die Archivierung im Allgemeinen dar, da bisher - trotz stetiger Weiterentwicklung der Computertechnologie - noch kein einheitliches und vor allem beständiges Dateiformat entwickelt werden konnte. Zudem müssen die Dateien sicher gelagert werden und gleichzeitig immer zugänglich sein. Der noch nicht realisierbare, dauerhafte Zugriff auf die virtuellen Präparate verhindert derzeit noch den Aufbau eines digitalen Archivs.

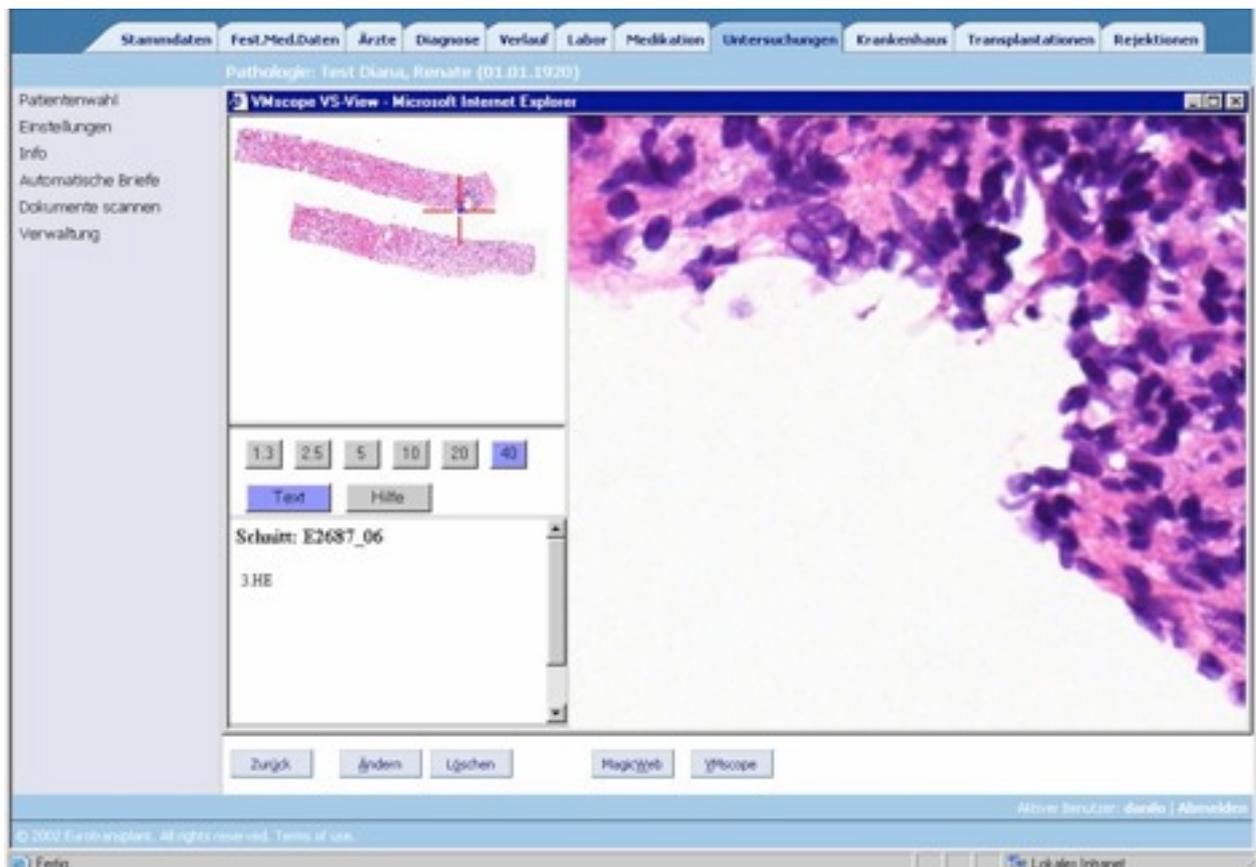
#### Erstellung einer elektronischen Patientenakte

Für die Erstellung einer elektronischen Patientenakte weisen die WSI gegenüber den konventionellen Objektträgern deutliche Vorteile auf (Kalinski T 2005, Lee SH 2005). Zum Einen lassen sie sich automatisch in den Arbeitsablauf (Workflow) integrieren (Kalinski T 2008, Saeger K 2006) und erlauben durch die digitale Erfassung sämtlicher Arbeitsschritte eine lückenlose Qualitätskontrolle (Kalinski T 2005).

Des Weiteren können aktuelle, aber auch zurückliegende histologische Befunde eines Patienten deutlich schneller aufgerufen und miteinander verglichen werden. (Lundin M

2004) Ferner können virtuelle Präparate bei Beratungen und Konferenzen mit anderen Fachdisziplinen eingesetzt und diskutiert werden (Riley RS 2004).

In der nephrologischen Klinik an der Charité zu Berlin wurde 2006 ein Modell gestartet, in dem die histologischen Schnitte in eine elektronische Patientenakte (TBase) integriert werden.



**Abbildung 27:** Maske einer TBase- Patientenakte

## 5.5 *Fazit*

Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Studien zeigt diese Studie, dass die virtuelle Mikroskopie in der Nephropathologie eingesetzt werden kann. Eingeschränkt wird ihr Einsatz durch das Fehlen von speziellen Untersuchungsmethoden wie die Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie. Mit den Objektträgerscanner der neueren Generation sind diese Untersuchungsmethoden nun möglich.. Die Polarisation kann derzeit mit der virtuellen Mikroskopie noch nicht ermöglicht werden. Mit einem virtuellen Mikroskop und den WSI können genaue Diagnosen erstellt werden. Auch die Bildqualität der virtuellen Präparate entspricht der des Originalpräparates oder kann sie übertreffen. Sie stellt eine Alternative zur traditionellen Lichtmikroskopie dar. (Blake CA 2003, Catalyurek U 2003, Costello SSP 2003, Cross SS 2003, Demichelis F 2002b, Leong FG 2000, Marchevsky RM 2003b, Molnar B 2003, Okada DH 1999, Saeger K 2003, Singson RP 2000, Steinberg DM 2001, Taylor RN 1999, Weinstein RS 2001)

Für eine mühelose Integration in die nephropathologische Routinediagnostik müssen an ein VM- System hohe Anforderungen gestellt werden, die bisher nur zum Teil erfüllt werden können. Es gibt derzeit noch keine umsetzbaren Serverlösungen für den enormen Speicherbedarf der Datenmengen hunderter Schnittpräparate. Der Digitalisierungsvorgang für einen Objektträger darf nicht länger als eine Minute in Anspruch nehmen. Diese Zeitvorgabe erfüllt im Moment nur der ultraschnelle Slide Scanner, der auf miniaturisierten Mikrolinsenreihen basiert. Dieser ist zwar bereits patentiert, aber sein Einsatz in der Routinediagnostik wurde bisher nicht evaluiert.

Wenn die technischen Hürden überwunden werden, wird die Zukunft der Pathologie durch Computerarbeitsplätze und virtuelle Mikroskopie bestimmt werden. (Demichelis F 2002b, Glatz- Krieger K 2005b, Saeger K 2003, Weinstein RS 2005)

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren hat sich die virtuelle Mikroskopie in vielen Bereichen der Pathologie fest etabliert. WSI werden als Ergänzung zu konventionellen Glasobjektträgern in der Ausbildung von Studenten und der Weiterbildung von Ärzten, in der Forschung, in Qualitätskontrollprogrammen und zum Teil auch in der Diagnostik verwendet. Umfragen der einzelnen Universitätsinstitute haben gezeigt, dass sowohl Studenten als auch Ärzte diese neue Arbeitsweise befürworten und sie in ihren Arbeitsalltag integrieren können.

Die Vorteile der virtuellen Mikroskopie sind vielfältig:

- Unendlich viele Kopien eines Objektträgers sind möglich.
- Mehrere Betrachter können zeitgleich und an jedem beliebigen Ort auf das Präparat zugreifen.
- Dem WSI können Anmerkungen und klinische Informationen beigefügt werden.
- Die Untersuchung von histologischen Schnitten über einen Bildschirm ist für den Pathologen komfortabler als der Blick durch ein Okular.

In dieser Studie wurde die Nutzung der virtuellen Mikroskopie in der Nephropathologie untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Bildqualität der WSI und die diagnostische Genauigkeit sowie die technischen Eigenschaften des Scanners gelegt.

Innerhalb von 2 Monaten wurden 97 Routinefälle der Nierenpathologie der Charité zu Berlin zunächst von einer Pathologin konventionell mit dem Lichtmikroskop diagnostiziert. Im Rahmen einer retrospektiv geblindeten Studie wurden alle 908 Schnitte komplett mittels eines Objektträgerscanners, dem „Mirax Scan“ (Zeiss GmbH) digitalisiert. Zwei Pathologen untersuchten und bewerteten die WSI an einem speziellen Arbeitsplatz und stellten dann ihre Diagnosen ohne Kenntnis der konventionell erstellte Diagnose. Die dazu benötigten WSI wurden auf einem Bildserver gelagert und konnten somit bei Bedarf angefordert werden. Die Betrachtung der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines „virtuellen Mikroskops“, einer speziellen Betrachtungssoftware, die der Betrachtung über einem Lichtmikroskop ähnelt.

Für eine Integration in die nephropathologische Routinediagnostik sind die Zeit, die für die Digitalisierung eines Objektträgers benötigt wird und das Datenvolumen eines WSI, von großer Bedeutung. Beide Faktoren sind abhängig von der Präparatgröße auf dem Objektträger.

In dieser Studie betrug die durchschnittliche Scanzeit eines WSI etwa 5 Minuten. In der Routinediagnostik müssen viele Schnitte in einer möglichst kurzen Zeit digitalisiert werden, d.h. die Scanzeit für ein Präparat sollte eine Minute nicht überschreiten.

Die durchschnittliche Dateigröße eines WSI betrug 215 MB. Bei mehreren hundert Präparaten, die täglich für die Routinediagnostik benötigt werden, würde dies auf einen Speicherbedarf hinauslaufen, der im Moment noch nicht realisierbar ist.

Für eine genaue Diagnosestellung ist die Bildqualität der WSI von besonderer Bedeutung, die letztendlich von der Qualität des Objektträgers abhängig ist. Die Schnitte sollten möglichst vollständig und ohne Unschärfen dem Pathologen zur Untersuchung vorliegen.

In dieser Studie waren von 908 Schnitten 12% so unvollständig gescannt, dass eine Diagnostik nur eingeschränkt bzw. nicht möglich war. Entscheidend dafür war die zu helle Färbung des Originalpräparates.

Bildunschärfen wiesen 42% der WSI auf, doch nur bei 12% zeigten sich so starke Unschärfen, dass auch hier eine Diagnose nur eingeschränkt bzw. nicht möglich war. Gründe dafür waren Verschmutzung des Bildhintergrunds auf dem Originalpräparat und die falsche Berechnung der Fokusebene des Scanners.

Am Ende der Studie wurden die virtuell erstellten Diagnosen mit den konventionell erstellten Diagnosen verglichen. Bei 89 Fällen (91%) gab es übereinstimmende Diagnosen, sie waren konkordant. Bei den übrigen 8 Fällen stimmten die Diagnosen nicht überein, sie waren diskordant. Doch nur bei 2 Fällen (2%) gab es eine klinisch wichtige Diskordanz, d.h. die Diagnosen waren so verschieden, dass sich jeweils eine andere Therapie anschließen würde.

Diese Studie zeigt, übereinstimmend mit den Ergebnissen vieler anderer Studien, dass mit WSI von guter Bildqualität eine hohe diagnostische Konkordanz erzielt werden können.

Für eine dauerhafte Etablierung der virtuellen Mikroskopie in die nephropathologische Routinediagnostik müssen Zusatzuntersuchungen wie Immunfluoreszenz, Elektronenmikroskopie und Polarisation ermöglicht werden. Doch mit der stetigen Weiterentwicklung der Computertechnologie wird die virtuelle Mikroskopie in den nächsten Jahren zu einem festen Bestandteil der Routinepathologie werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Afework A, B.M., Bustamante F et al. *Digital dynamic telepathology – the Virtual Microscope*. in *Proc. AMIA Symp.* 1998.
2. Bamford WM, R.N., Kassam M et al., *The development and evaluation of the UK national telepathology network*. *Histopathology*, 2004. 44(1): p. 82.
3. Blake CA, L.H., Milette CF, *Teaching medical histology at the University of South Carolina of Medicine: Transition to virtual Slides and virtual Microscope*. *Anat. Rec. B New Anat.* , 2003. 275(1): p. 196- 206.
4. Bloodgood RA, O.R., *Trends in histology teaching in United States medical schools*. *Anat. Rec. B New Anat.* , 2006. 289(5): p. 169- 175.
5. Boutonnat J, P.C., Faure C et al., *A pilot study in two French medical schools for teaching histology using virtual microscopy*. *Morphologie*, 2006. 90(288): p. 21- 5.
6. Burthem J, B.M., Ardem J et al., *The use of digital “virtual slides” in the quality assessment of haematological morphology: results of a pilot exercise involving UK NEQAS (H) participants*. *Br. J Haemat.*, 2005. 130(2): p. 293- 6.
7. Catalyurek U, B.M., Chang C et al., *The virtual microscope*. *IEEE Trans Inf Technol Biomed.*, 2003. 7(4): p. 230- 48.
8. Costello SS, J.D., Dervan PA et al., *Development and evaluation of the virtual pathology slide: A new tool in telepathology*. *J Med Internet Res.*, 2003. 5(2): p. e 11.
9. Cross SS, D.T., Stuart RD, *Telepathology: current status and future prospects in diagnostic histopathology*. *Histopathology*, 2002. 41(2): p. 91- 109.

10. Dee FR, L.J., Consoer D et al., *Implementation of virtual microscope slides in the annual pathobiology of cancer workshop laboratory*. Hum Pathol. , 2003. 34(5): p. 430- 6.
11. Demichelis F, B.M., Dalla Palma P et al., *The virtual case: a new method to completely digitize cytological and histological slides*. Virchows Arch. , 2002 a. 441(2): p. 159- 64.
12. Demichelis F, D.M.V., Forti S et al., *Digital storage of glass slides for quality assurance in histopathology and cytopathology*. J Telemed Telecare 2002 b. 8(3): p. 138- 42.
13. Ficsor L, V.V., Berczi L et al., *Automated virtual microscopy of gastric biopsies*. Cytometry B, Clin Cytom 2006. 70(6): p. 423- 431.
14. Ficsor L, V.V., Tagscherer A et al., *Automated classification of inflammation in colon histological sections based on digital microscopy and advanced image analysis*. Cytometry A, 2008 Jan 28.
15. Fine JL, G.D., Silowash R et al., *Evaluation of whole slide image immunohistochemistry interpretation in challenging prostate needle biopsies*. Hum Pathol., 2008 Jan 29
16. Fujita K, C.R. *The Virtual Slide Set – a curriculum development system for digital microscopy*. in AMIA Annu Symp Proc 2003.
17. Gagnon M, I.S., Hancock J et al., *Comparison of cytology proficiency testing: glass slides vs. virtual slides*. Acta Cytol. , 2004. 48(6): p. 788- 94.
18. Gilbertson JR, H.J., Anthony L et al., *Primary histologic diagnosis using automated whole slide imaging: a validation study*. BMC Clin Pathol. , 2006. 6: p. 4.
19. Glatz- Krieger K, G.D., Mihatsch MJ, *Virtual slides: high- quality demand, physical limitations and affordability*. Hum Pathol. , 2003. 34(10): p. 968- 74.

20. Glatz- Krieger K, G.D., Mihatsch MD, *Virtual microscopy: first applications*. Pathologie, 2006b. 27(6): p. 469- 76.
21. Glatz- Krieger K, S.U., Spatz A et al., *Factors to keep in mind when introducing virtual microscopy*. Virchows Arch. , 2006a. 448(3): p. 248- 55.
22. Goldberg HR, D.R., *The positive impact of team based virtual microscopy on student learning in physiology and histology*. Adv Physiol Educ, 2007. 31(3): p. 261- 5.
23. Gombas P, S.J., Krenacs T et al., *Past, present and future of digital pathology*. Orv Hetil., 2004. 145(8): p. 433- 43.
24. Harris T, L.T., Heidger P et al., *Comparison of a virtual microscope laboratory to a regular microscope laboratory for teaching histology*. Anat Rec 2001. 265(1): p. 10- 4.
25. Heidger PM Jr., D.F., Consoer D et al., *Integrated approach to teaching and testing in histology with real and virtual imaging*. Anat Rec, 2002. 269(2): p. 107- 12.
26. Helin H, H.M., Lundin J, *Web- based virtual microscopy in teaching and standardizing Gleason grading*. Hum Pathol. , 2005. 36(4): p. 381- 6.
27. Hohne S, S.R., *Computer- assisted learning in human and dental medicine*. Int J Comput Dent 2004. 7(2): p. 159- 67.
28. <http://medical.nema.org/dicom>. [cited.
29. <https://patho.med.uni-magdeburg.de>. [cited.
30. Hufnagl P, S.T., Saeger K et al., *Telepathologie*. Onkologe, 2003. 9: p. 29- 36.
31. Kalinski T, H.H., Zwönitzer R et al., *Virtual microscopy and digital pathology*. Pathologie 2006. 27(3): p. 222- 7.

32. Kalinski T, S.S., Hofmann H et al., *Digital workflow management for quality assessment in pathology*. *Pathol. Res Pract.*, 2008. 204(1): p. 17- 21.
33. Kant, J., *A tale of two systems: Pathology resident recruitment in and out of the National Resident Matching Program*. *Hum Pathol.* , 2001. 32(7): p. 677- 9.
34. Krippendorf BB, L.J., *Complete and rapid switch from light microscopy to virtual microscopy for teaching medical histology*. *Anat Rec B New Anat* 2005. 285(1): p. 19- 25.
35. Kumar RK, F.B., Velan GM et al., *Integrating histology and histopathology teaching in practical classes using virtual slides*. *Anat Rec B New Anat* 2006. 289(4): p. 128- 33.
36. Kumar RK, V.G., Korell SO et al., *Virtual microscopy for learning and assessment in pathology*. *J Pathol* 2004. 204(5): p. 613- 8.
37. Lee, S., *Virtual microscopy: applications to hematology*. *Lab Hematol* 2005. 11(1): p. 38- 45.
38. Leong FJ, G.A., Schwarzmann P et al., *Clinical trial of telepathology as an alternative modality in breast histopathology quality assurance*. *Telemed J E Health*, 2000. 6(4): p. 373- 7.
39. Leong FJ, M.J., *Automated complete slide digitization: a medium for simultaneous viewing by multiple pathologists*. *J Pathol* 2001. 195(4): p. 508- 14.
40. Lundin M, L.J., Helin H et al., *A digital atlas of breast histopathology: an application of web based virtual microscopy*. *J Clin Pathol*, 2004a. 57(12): p. 1288- 91.
41. Lundin M, L., Isola J, *Virtual microscopy*. *J Clin Pathol* 2004b. 57(12): p. 1250- 1.
42. Ma B, Z.T., Rohde M et al., *Use of autostitch for automatic stitching of microscope images*. *Micron* 2007. 38(5): p. 492- 9.

43. Mairinger, T., *Acceptance of telepathology in daily practice*. Anal Cell Pathol, 2000. 21(3- 4): p. 135- 140.
44. Marchevsky AM, K.R., Thomas P et al., *The use of virtual microscopy for proficiency testing in gynegologic cytopathology: a feasibility study using ScanScope*. Arch Pathol Lab Med 2006. 130(3): p. 349- 55.
45. Marchevsky AM, W.Y., Thomas P et al., *Virtual microscopy as a tool for proficiency testing in cytopathology: a model using multiple digital images of Papanicolaou tests*. Arch Pathol Lab Med 2003. 127(10): p. 1320- 4.
46. Molnar B, B.L., Diczhazy C et al., *Digital Slide and virtual microscopy based routine and telepathology evaluation of routine gastrointestinal biopsy specimens*. J Clin Pathol 2003. 56(6): p. 433- 8.
47. Okada DH, B.S., Felten CL et al., *„Virtual microscopy“ and the internet as telepathology consultation tools: diagnostic accuracy in evaluating melanocytic skin lesions*. J Dermatopathol 1999. 21(6): p. 525- 31.
48. Riley RS, B.-E.J., Massey D et al., *Digital Photography - A primer for Pathologists*. J Clin Lab Anal 2004. 18(2): p. 91- 128.
49. Romer DJ, S.S., *Use of virtual microscopy for didactic live audience presentation in anatomic pathology*. Ann Diagn Pathol, 2003. 7(1): p. 67- 72.
50. Ruitter DJ, R.B., Underwood J et al., *Histopathology training in Europe: a lesson for other specialties*. Virchows Arch. , 2004. 444(3): p. 278- 82.
51. Saeger K, H.P., *The Virtual microscope as a tool for internet based histology teaching*. Europ J Med Res 2002. 7.
52. Saeger K, S.D., *Digital slide training portal: Training slides available on the Internet from the German division of the IAP*. Pathologe 2006b. 27(6): p. 477- 80.

53. Saeger K, S.K., Schrader T et al. *The Virtual Microscope for Routine Pathology based on a PACS system for 6 GB images.* in *Proc CARS 2003.* 2003.
54. Saeger K, S.K., Hamann K et al., *Digitale Virtuelle Mikroskopie als modernes Kommunikationsmedium in der Pathologie,* in *Telemedizinführer Deutschland,* Jäckl, Editor. 2006a: Bad Nauheim. p. 104- 108.
55. Schrader T, H.K., Hufnagl P et al., *T. Konsult Pathologie- Zweite Meinung im Rahmen des Mamma- Screening- Programms,* in *Telemedizinführer Deutschland,* Jäckl, Editor. 2006: Bad Nauheim. p. 109- 115.
56. Schrader T, H.P., Schlake W et al. , *Study of efficiency of teleconsultation: the Telepathology Consultation Service of the Professional Assoziation of German Pathologists for the screening program of breast carcinoma.* *Verh Dtsch Ges Pathol,* 2005. 89: p. 211- 8.
57. Singson RP, N.S., Greenson J et al., *Virtual microscopy and the Internet as telepathology consultations tools. A study of gastrointestinal biopsy specimens.* *J Clin Pathol* 1999. 111(6): p. 792- 5.
58. Steinberg DM, A.S., *Application of virtual microscopy in clinical cytopathology.* *Diagn Cytopathol* 2001. **25**(6): p. 389- 96.
59. Taylor RN, G.M., Lange J et al., *CytoView. A prototype computer image- based Papanicolaou smear proficiency test.* *Acta Cytol.,* 1999. 43(6): p. 1045- 51.
60. Tuominen VJ, I.J., *The application of JPEG 2000 in Virtual Microscopy.* *J Digit Imaging,* 2007.
61. Van den Tweel J, T.C., *Globalization of pathology training and examination: The time to begin is now.* *Hum Pathol. ,* 2002. 34(6): p. 629- 30.
62. Varga VS, B.J., Sipos F et al., *Scanning fluorescent microscopy is an alternative for quantitative fluorescent cell analysis.* *Cytometry A,* 2004. 60(1): p. 53- 62.

63. [vhcc.charite.de/moodle](http://vhcc.charite.de/moodle). [cited].
64. Weinberg DS, A.F., Dusserre P et al., *Telepathology diagnosis by means of digital still images: an international validation study*. Hum Pathol. , 1996. 27(2): p. 111- 8.
65. Weinstein, R., *Innovations in medical imaging and virtual microscopy*. Hum Pathol., 2005. 36(4): p. 317- 9.
66. Weinstein RS, D.M., Liang C et al., *Telepathology overview: from concept to implementation*. Hum Pathol. , 2001. 32(12): p. 1283- 99.
67. Weinstein RS, D.M., Liang C et al., *An array microscope for ultrarapid virtual slide processing and telepathology. Design, fabrication an validation study*. Hum Pathol. , 2004. 35(11): p. 1303- 14.
68. Williams, B., *The AFIP- Center for telemedicine application- pathology for the twenty- first century*. Telemed Virtual Real 1999. 3(6): p. 64- 65.
69. Wolf G, P.D., Dietel M et al., *Telemicroscopy via Internet*. Nature, 1998. 391(6667): p. 613- 614.
70. Zito FA, M.F., D'Errico D et al., *Quicktime virtual reality technology in light microscopy to support medical education in pathology*. Mod Pathol 2004. 17(6): p. 728- 31.

## 8 ANHANG

### *Danksagung*

Herrn Prof. Dr. med. Dietel, Leiter des Institutes für Pathologie der Charite möchte ich für die Überlassung des Themas danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Thomas Schrader für die sehr gute Zusammenarbeit, die umfangreiche Betreuung und die viele Zeit, die er mir bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit widmete. Ebenso für die intensive fachliche Beratung und dafür, dass mir zu jeder Tageszeit bei meinen Problemen geholfen wurde.

Herrn Dr. rer. nat. Peter Hufnagl, Leiter der Abteilung „Digitale Pathologie“ am Institut für Pathologie der Charite danke ich für die für die hilfreiche Unterstützung und Bereitstellung der technischen Geräte bei der Durchführung der Scannerstudie.

Ein Dankeschön gilt Frau Dr. med. Birgit Rudolph und Prof. Dr. med. Z. Zhang von der Universität in Shanghai, China für ihre freundliche Unterstützung bei der Auswertung der Falldaten.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Karsten Schlüns und Dr. Kai Saeger bedanken, die mich bei technischen Fragen und Problemen jederzeit unterstützten.

Meinem Mann, Lars Hentschel, möchte ich für die ständige Hilfestellung und die besondere Motivation in der schweren Zeit danken. Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die langjährige Unterstützung während meines Medizinstudiums.

Franziska Hentschel

## ***Lebenslauf***

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Franziska Hentschel

## ***Erklärung***

„Ich, Franziska Hentschel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Die virtuelle Mikroskopie – Eine Evaluationsstudie in der Nephropathologie selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift