

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

DISSERTATION

CD15-Fokus-Score:
Ein immunhistochemisch basierter Score sowie die
Mitentwicklung einer morphometrischen Software
(„CD15-Quantifier“) zur Infektionsdiagnostik in der
periprothetischen Membran

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Beatrice Kölbl

geboren in Santa Monica (CA/USA)

Datum der Promotion: 11.12.2015

meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRAKT	VI
ABSTRACT	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1. ENDOPROTHETISCHE EINGRIFFE	1
1.1.1. HÄUFIGKEIT DES ENDOPROTHETISCHEN EINGRIFFS	1
1.1.2. REVISION/ WECHSEL BEI ENDOPROTHESEN	2
1.2. BEDEUTUNG DER ENDOPROTHETIK FÜR DIE GESELLSCHAFT	4
1.2.1. EINFLUSS AUF DIE LEBENSQUALITÄT	4
1.2.2. BEDEUTUNG FÜR DIE MEDIZIN UND DAS GESUNDHEITSSYSTEM	5
1.2.3. „ENDOProthetikZentrum“	5
1.3. DIE ENDOPROTHESENPATHOLOGIE	7
1.3.1. HISTOPATHOLOGISCHE KLASSIFIKATION VON GELENKENDOPROTHESEN-ASSOZIIERTEN ERKRANKUNGEN	7
1.4. DIAGNOSTIK DER PERIPROTHETISCHEN GELENKINFEKTION	11
1.4.1. DEFINITION DER PERIPROTHETISCHEN GELENKINFEKTION	11
1.4.2. GEGENÜBERSTELLUNG DER AUSSAGEKRAFT DER ANGEWANDTEN DIAGNOSTIK BEI DER DETEKTION DER PERIPROTHETISCHEN GELENKINFEKTION	12
2. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	16
3. MATERIAL UND METHODEN	17
3.1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND PATIENTEN	17
3.2. AUFARBEITUNG DER GEWEBEPROBEN	18
3.2.1. ANFERTIGUNG DER HISTOLOGISCHEN PRÄPARATE	18
3.2.2. FÄRBUNGEN DER SCHNITTE FÜR DIE HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN	20
3.3. DIE ENDOPROTHESENHISTOPATHOLOGIE	24
3.3.1. ASEPTISCHE UND SEPTISCHE PROTHESENLOCKERUNG	25
3.3.2. HISTOLOGISCHE KRITERIEN FÜR DIE JEWEILIGEN TYPEN DER ERWEITERTEN KONSENSUSKLASSIFIKATION	26
3.4. HISTOPATHOLOGISCHE AUSWERTUNG:	28
3.4.1. HISTOPATHOLOGISCHE AUSWERTUNG DER HE- UND PAS-SCHNITTE	28
3.4.2. HISTOPATHOLOGISCHE AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCH GEFÄRBTEN SCHNITTE	29
3.5. MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG	30
3.6. DER „CD15-QUANTIFIER“	31
3.6.1. SOFTWAREENTWICKLUNG FÜR DEN „CD15-QUANTIFIER“	31
3.6.2. ANWENDUNG DES „CD15 QUANTIFIER“	32
3.7. STATISTISCHE METHODEN	33
4. ERGEBNISSE	35
4.1. PATIENTENKOLLEKTIV	35
4.1.1. ALTER, GESCHLECHT UND HÄUFIGKEITSVERTEILUNG	35
4.2. ANZAHL AN CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN IN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN AUSWERTUNG BEI MIKROBIOLOGISCH POSITIVEM UND NEGATIVEM BEFUND.	36
4.2.1 DESKRIPTIVE STATISTIK, MITTELWERTE	36

4.2.2. DESKRIPTIVE STATISTIK, BOXPLOTS	37
4.3. ANZAHL DER CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN IN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN AUSWERTUNG NACH DEN KRITERIEN DER KONSSENSUSKLASSIFIKATION [MORAWIETZ ET AL. 2006, 2009]	40
4.3.1. KOLLEKTIVBESCHREIBUNG UND KOLLEKTIVDEFINITION	40
4.3.2. DESKRIPTIVE STATISTIK, MITTELWERTE	41
4.3.3. DESKRIPTIVE STATISTIK, BOXPLOTS	42
4.4. GRENZWERTERMITTLUNG. ANZAHL AN CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN PRO FOKUS, UM EINEN PERIPROTHETISCHEN GELENKINFEKT ZU DIAGNOSTIZIEREN.	45
4.4.1. MIKROBIOLOGIE ALS GOLDSTANDARD	45
4.4.2. DIE HISTOPATHOLOGISCHEN KRITERIEN DER KONSSENSUSKLASSIFIKATION [MORAWIETZ ET AL 2006] ALS GOLDSTANDARD	46
4.5. ANZAHL AN CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN IN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN AUSWERTUNG BEI EINEM UNTERSCHIEDLICHEN BAKTERIELLEN ERREGERSPEKTRUM	48
4.5.1. KOLLEKTIVBESCHREIBUNG	48
4.5.2. DESKRIPTIVE STATISTIK, MITTELWERTE	51
4.5.3. DESKRIPTIVE STATISTIK, BOXPLOTS	52
4.6. GRENZWERTERMITTLUNG. ANZAHL AN CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN PRO FOKUS, UM HOCH VIRULENTE VON NIEDRIG VIRULENTEN BAKTERIELLEN ERREGERN ZU UNTERSCHIEDEN.	54
4.6.1. KOLLEKTIVBESCHREIBUNG	54
4.7. VERGLEICH DES UNTERSCHIEDLICHEN ERREGERSPEKTRUMS BEI DEN HISTOPATHOLOGISCHEN TYPEN II UND III DER KONSSENSUSKLASSIFIKATION [MORAWIETZ ET AL. 2004, MORAWIETZ ET AL. 2006, MORAWIETZ ET AL. 2009]	56
4.7.1. BESCHREIBUNG DES KOLLEKTIVS	56
4.7.2. ERGEBNISBESCHREIBUNG	57
4.8. HISTOLOGISCHE BEGUTACHTUNG IMMUNHISTOCHEMISCH GEFÄRBTER PERIPROTHETISCHEN MEMBRANEN/ NEOSYNOVIALITIDEN	59
4.9. VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER IDENTIFIZIERTEN CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN MITTELS CD15-FOKUS-SCORE UND MITTELS „CD15-QUANTIFIER“.	63
4.9.1. KOLLEKTIVBESCHREIBUNG	63
4.9.2. ANZAHL AN CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN BEIM CD15-FOKUS-SCORE UND „CD15-QUANTIFIER“	64
5. DISKUSSION	67
5.1. EINLEITUNG	67
5.1.1. CD15, EIN IMMUNPHÄNOTYPISCHES OBERFLÄCHENMERKMAL.	67
5.1.2. DIE „HIGH-GRADE-INFEKTION“ UND DIE „LOW-GRADE-INFEKTION“	70
5.1.3. ERREGERSPEKTRUM BEI PERIPROTHETISCHEN INFEKTIONEN	72
5.2. ANZAHL AN CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN IN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN AUSWERTUNG BEI MIKROBIOLOGISCH POSITIVEM UND NEGATIVEM BEFUND.	74
5.3. ANZAHL DER CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN IN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN AUSWERTUNG NACH DEN KRITERIEN DER KONSSENSUSKLASSIFIKATION [MORAWIETZ ET AL. 2006, 2009]	77
5.4. VERGLEICH DER MIKROBIOLOGIE MIT DEN KRITERIEN DER KONSSENSUSKLASSIFIKATION [MORAWIETZ ET AL. 2006]	78

5.5. GRENZWERTERMITTLUNG: ANZAHL AN CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN PRO FOKUS, UM EINEN PERIPROTHETISCHEN INFEKT ZU DIAGNOSTIZIEREN.	78
5.6. ANZAHL AN CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN IN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN AUSWERTUNG BEI UNTERSCHIEDLICHEM BAKTERIELLEN ERREGERSPEKTRUM	83
5.7. GRENZWERTERMITTLUNG: ANZAHL AN CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN PRO FOKUS, UM HOCH VIRULENTE VON NIEDRIG VIRULENTEN BAKTERIELLEN ERREGERN ZU UNTERSCHIEDEN.	84
5.8. VERGLEICH DES UNTERSCHIEDLICHEN ERREGERSPEKTRUMS BEI DEN HISTOPATHOLOGISCHEN TYPEN II UND III DER KONSSENSUSKLASSIFIKATION [MORAWIETZ ET AL. 2004, MORAWIETZ ET AL. 2006, MORAWIETZ ET AL. 2009]	85
5.9. VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER IDENTIFIZIERTEN CD15 POSITIVEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN MITTELS CD15-FOKUS-SCORE UND MITTELS „CD15-QUANTIFIER“.	85
5.10. DIE VORZÜGE UND EVENTUELLEN NACHTEILE DES CD15-FOKUS-SCORES	87
5.10.1. CD15 EXPRESSION IN DER PERIPROTHETISCHEN MEMBRAN/ NEOSYNOVIALITIS UND DIE ERMITTLUNG DES „CD15 FOKUS SCORES“	87
5.10.2. EINSCHRÄNKUNGEN, DIE SICH DURCH DIE VERWENDUNG DES CD15-FOKUS-SCORE ERGEBEN	88
5.10.3. DIE BEDEUTUNG DES CD15-FOKUS-SCORES	89
5.10.4. DIE BEDEUTUNG VON COMPUTERGESTÜTZTEN VERFAHREN FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG VON ZELLEN MIT FOKUS AUF DEN „CD15-QUANTIFIER“	90
6. VERZEICHNIS	93
6.1. LITERATURVERZEICHNIS	93
6.2. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	101
7. ANHANG	X
7.1. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	X
7.2. LEBENS LAUF	XI
7.3. ANTEILSERKLÄRUNG AN ETWAIGEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	XII
7.4. EIGENE BISHERIGE ARBEIT	XIII
7.5. DANKSAGUNG	XIV

Abstrakt

Einleitung: Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Entwicklung eines infektionspathologischen CD15-Fokus-Scores eine präzise Quantifizierung von neutrophilen Granulozyten in nur einem einzigen Gesichtsfeld zu erarbeiten, welcher eine bakterielle Infektionsdiagnostik in der periprothetischen Membran ermöglicht. Dadurch wurde es möglich (in Zusammenarbeit mit VMscope-Berlin), eine Software, den „CD15-Quantifier“, zu entwickeln, welcher automatisch CD15 positive neutrophile Granulozyten quantifiziert.

Methoden: 91 intraoperativ im Rahmen einer Revisionsoperation entnommene periprothetische Membranen aus Hüfte (n=59) und Knie (n=32) wurden histopathologisch klassifiziert. Die Identifikation der neutrophilen Granulozyten erfolgte immunhistochemisch mittels eines CD15-spezifischen monoklonalen Antikörpers. Der quantifizierende Auswertungsmodus folgte dem Prinzip der fokalen Maximalinfiltration (Fokus) mit Bewertung eines einzigen Gesichtsfeldes (0,3mm²).

Ergebnisse: Die periprothetischen Membranen der Patienten mit positivem mikrobiologischen Befund (n=47) weisen signifikant ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test) mehr CD15 positive neutrophile Granulozyten pro Fokus auf als bei Patienten mit einem negativen mikrobiologischen Befund (n=44). Eine signifikant höhere Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten wurde in den periprothetischen Membranen gefunden, die histopathologisch als positiv (n=48) gelten, im Gegensatz zu denen die histopathologisch negativ (n=43) für eine Infektion waren. Mit Hilfe einer ROC-Kurve wurden 50 CD15 positive neutrophile Granulozyten pro Fokus als optimaler Schwellenwert bei der Diagnosestellung des periprothetischen Gelenkinfektes unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores ermittelt. Wird der mikrobiologische Befund als Goldstandard verwendet, beträgt die Sensitivität des Diagnostikums 0,83, die Spezifität 0,864. (Positiv prädikativer Wert (PPV): 0,87; negativ prädikativer Wert (NPV): 0,83; Accuracy: 0,846; AUC: 0,878.) Werden die histopathologischen Kriterien der Konsensusklassifikation als Goldstandard verwendet, weist das Diagnostikum unter Anwendung des festgelegten Schwellenwertes eine Sensitivität von 0,875, eine Spezifität von 0,93 auf. (PPV: 0,93; NPV: 0,87; Accuracy: 0,901; AUC: 0,944). Bei einer Infektion mit hoch virulenten bakteriellen Erregern (n=14) sind signifikant mehr CD15 positive neutrophile Granulozyten pro Fokus vorhanden als bei einer mit niedrig virulenten (n=29). Mit Hilfe einer ROC-Kurve wurden 100 CD15 positive neutrophile

Granulozyten pro Fokus als optimaler Schwellenwert bei der Diagnosestellung des periprothetischen Gelenkinfektes ermittelt, verursacht durch einen hoch virulenten bakteriellen Erreger. Die Sensitivität beträgt 1,0, die Spezifität 0,66. (PPV: 0,587; NPV: 1,0; Accuracy: 0,767; AUC: 0,863.) Die Präparate, die mit Hilfe des „CD15-Quantifiers“ ausgewertet (n=19) wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied zur histopathologischen Auswertung unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores.

Schlussfolgerung: Der infektionspathologische CD15-Fokus-Score und die dadurch ermöglichte Anwendung der Software „CD15-Quantifier“ reduziert durch die Automatisierung den konzentrationsaufwendigen und zeitkonsumierenden Prozess der mikroskopischen Zellauszählung und leistet somit einen Beitrag zur Standardisierung der Infektionsdiagnostik des periprothetischen Gelenkinfektes.

Abstract

Introduction: The aim of this thesis was to devise a precise quantification of neutrophilic granulocytes within a single focal point through the development of an infective-pathology CD15-Focus-Score which enables bacterial infection in the periprosthetic interface membrane to be diagnosed. This immunohistochemical approach made it possible (in collaboration with VMscope-Berlin) to develop "CD15-quantifier" software which automatically quantifies CD15-positive neutrophilic granulocytes.

Methods: 91 periprosthetic membranes removed during revision surgery from the hip (n=59) and knee (n=32) underwent histopathological classification. The neutrophilic granulocytes were identified immunohistochemically by means of a CD15-specific monoclonal antibody. The quantitative evaluation of CD15-positive neutrophilic granulocytes used the principle of maximum focal infiltration (focus) together with an assessment of a single focal point (0.3mm²).

Results: The periprosthetic membranes of patients with positive microbiological findings (n=47) have significantly more (p<0.001, Mann-Whitney U test) CD15-positive neutrophilic granulocytes per focal point than patients with negative microbiological findings (n=44). A significantly higher number of CD15-positive neutrophilic granulocytes were found in those periprosthetic membranes testing positive for histopathological evidence of infection (n=48) compared with those testing negative (n=43). By means of a ROC curve, 50 CD15-positive neutrophilic granulocytes per focal point were identified as the optimum threshold value when diagnosing infection of periprosthetic joints using the CD15-Focus-Score. If the microbiological findings are used as a 'gold standard' the diagnostic sensitivity is 0.83, the specificity 0.864. (Positive predictive value (PPV): 0.87; negative predictive value (NPV): 0.83; accuracy 0.846; AUC: 0.878.) If the histopathological criteria for the consensus classification are adopted as the gold standard, the diagnostic procedure using the threshold value achieves a sensitivity of 0.875, a specificity of 0.93. (PPV: 0.93; NPV: 0.87; accuracy: 0.901; AUC: 0.944). Thus significantly more CD15-positive neutrophilic granulocytes per focal point were present in cases of infection with highly virulent bacteriological pathogens (n=14) than in infections with a low level of virulence (n=29). By means of a ROC curve, 100 CD15-positive neutrophilic granulocytes per focal point were identified as the optimum threshold value when diagnosing infection of periprosthetic joints caused by highly

virulent bacteriological pathogens. The sensitivity is 1.0 and the specificity 0.66. (PPV: 0.587; NPV: 1.0; accuracy: 0.767; AUC: 0.863.) The evaluation findings for the preparations using the "CD15-quantifier" (n=19) did not differ significantly from histopathological evaluation findings using the CD15-focus-score.

Conclusion: The infective-pathology CD15-Focus-Score, and the use of the "CD15-quantifier" software which is thereby made possible, offers an automated procedure which shortens the mentally tiring and time-consuming process of microscopic cell-counting and thus makes a contribution towards the standardisation of tools for diagnosing infection of periprosthetic joints.

1. Einleitung

1.1. Endoprothetische Eingriffe

1.1.1. Häufigkeit des endoprothetischen Eingriffs

Die Zahl der Operationen bei stationären Patienten war in Deutschland im Jahr 2012 so hoch wie nie zuvor [Hillienhof 2013]. Von den 15,7 Millionen Eingriffen, die verzeichnet worden sind, wurden etwa 42% an über 65-jährigen Patienten durchgeführt [Hillienhof 2013]. Zu den häufigsten Operationen zählte unter anderem die Implantation einer Endoprothese am Hüftgelenk [Hillienhof 2013]. Insgesamt wurden in der Bundesrepublik im Jahr 2008 209.487 Hüftendoprothesen und 154.722 Knieendoprothesen implantiert. Mit diesen hohen Operationszahlen machen nach Angaben der fallpauschalenbezogenen Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) im Jahr 2008 der Hüft- und Kniegelenkersatz zusammen den führenden Anteil an operativen Eingriffen in Deutschland aus [Haas et al. 2013, Statistisches Bundesamt 2009]. International gesehen befindet sich Deutschland zusammen mit der Schweiz an der Spitze, was die Häufigkeit der endoprothetischen Versorgung betrifft [Niethard et al. 2013]. Entgegen vielen Behauptungen liegt kein anhaltender Anstieg bei erstimplantierten Hüft- und Knieendoprothesen vor, dieser war nur vorübergehend, zwischen 2006 und 2009, zu verzeichnen. Danach stagnierte die Zahl der Erstimplantationen auf etwa gleichem Niveau (siehe Tabelle 1). Betrachtet man die regionale Verteilung der operativen Eingriffe auf Länder- bzw. Kreisebene, so zeigt sich eine unterschiedliche Versorgungsrate mit Endoprothesen innerhalb Deutschlands. Besonders viele Endoprothesen werden zwischen Schleswig-Holstein über Niedersachsen, Hessen und Thüringen nach Bayern implantiert [Niethard et al. 2013, Schäfer et al. 2013]. Das Deutsche Ärzteblatt bezeichnet diese Region mit einer besonders hohen Anzahl an endoprothetischen Operationen als „mitteldeutsche Schiene“ [Niethard et al. 2013]. Deutliche Unterschiede in der Operationsfrequenz sind an der Grenze zwischen Baden-Württemberg und Bayern zu erkennen [Niethard et al. 2013, Schäfer et al. 2013]. In Teilen Baden-Württembergs wurden in den Jahren 2005 bis 2011 im Durchschnitt etwa 124 bis 138 endoprothetische Eingriffe pro 100.000 Versicherter durchgeführt, in Teilen Bayerns waren es für den gleichen Zeitraum etwa

172 bis 235 pro 100.000 Versicherter [Niethard et al. 2013]. Durch die regionalen Unterschiede bei der endoprothetischen Versorgung stellt sich die Frage, ob die Versorgungsrate in Deutschland angemessen ist [Niethard et al. 2013]. Wegweisend kann hierbei die Bestimmung der Varianz sein. Dabei wird die Region mit der höchsten Versorgungsrate durch die Region mit der niedrigsten Versorgungsrate geteilt und die Regionen mit den niedrigsten und höchsten Operationsraten werden miteinander verglichen. Für die Hüftgelenksendoprothetik liegt die Varianz bei 2,5, bei der Kniegelenksendoprothetik bei 1,8. Das deutet darauf hin, dass endoprothetische Eingriffe auf einer allgemein akzeptierten Indikation beruhen [Niethard et al. 2013].

Anderen Quellen ist zu entnehmen, dass es bislang keine geeigneten Untersuchungen gibt, die eine Aussage darüber zulassen, ob die Versorgungshäufigkeit angemessen ist und woher die regionalen Häufigkeitsunterschiede bezüglich der endoprothetischen Versorgung rühren [Haas et al. 2013]. Die Indikationen zur primären Implantation einer Hüftendoprothese sind neben der Coxarthrose, die mit 60% als häufigste Indikation gilt, die primär chronische Polyarthritits, Schenkelhalsfrakturen, avaskuläre Nekrosen und andere Ursachen [Haas et al. 2013]. Bei der primären Implantation der Kniegelenkendoprothese gelten neben der Gonarthrose die rheumatoide Arthritis sowie die posttraumatische Arthrose als Indikationen [Triebts et al. 2011].

1.1.2. Revision/ Wechsel bei Endoprothesen

Die Zahl der Revisionen der Hüftendoprothesen nahm bis 2009 zu und danach wieder ab, wohingegen die Zahl der Knieendoprothese-Revisionen von 2006 bis 2011 stetig zunahm (Abbildung 2). Der prozentuale Anteil der Hüft-Revisionen an den gesamten Eingriffen der Hüftendoprothetik betrug 2011 knapp 6%, der prozentuale Anteil der Knie-Revisionen an den gesamten Eingriffen der Knieendoprothetik betrug 2011 knapp über 6%. Die Vielzahl der Revisionen ist einmal darauf zurückzuführen, dass Patienten heute eine höhere Lebenserwartung haben und bei Erstimplantationen jünger sind als noch vor einigen Jahren [Philpott et al. 2014]. Laut Studien aus den USA und Europa kommt es innerhalb von 10 Jahren bei 88 bis 94% der Implantate zu einer Lockerung von Endoprothesen mit anschließender Revision [Krenn et al. 2013].

In 72% wurden diese wegen einer aseptischen Prothesenlockerung und in 9% wegen einer septischen Prothesenlockerung durchgeführt. Frakturen waren in 8%, Instabilität

in 5% und „Schmerzen“ in 2% die Ursache für eine Revision. Bei weiteren 4% gab es andere Gründe für eine Indikationsstellung zur Revision [Philpott et al. 2014].

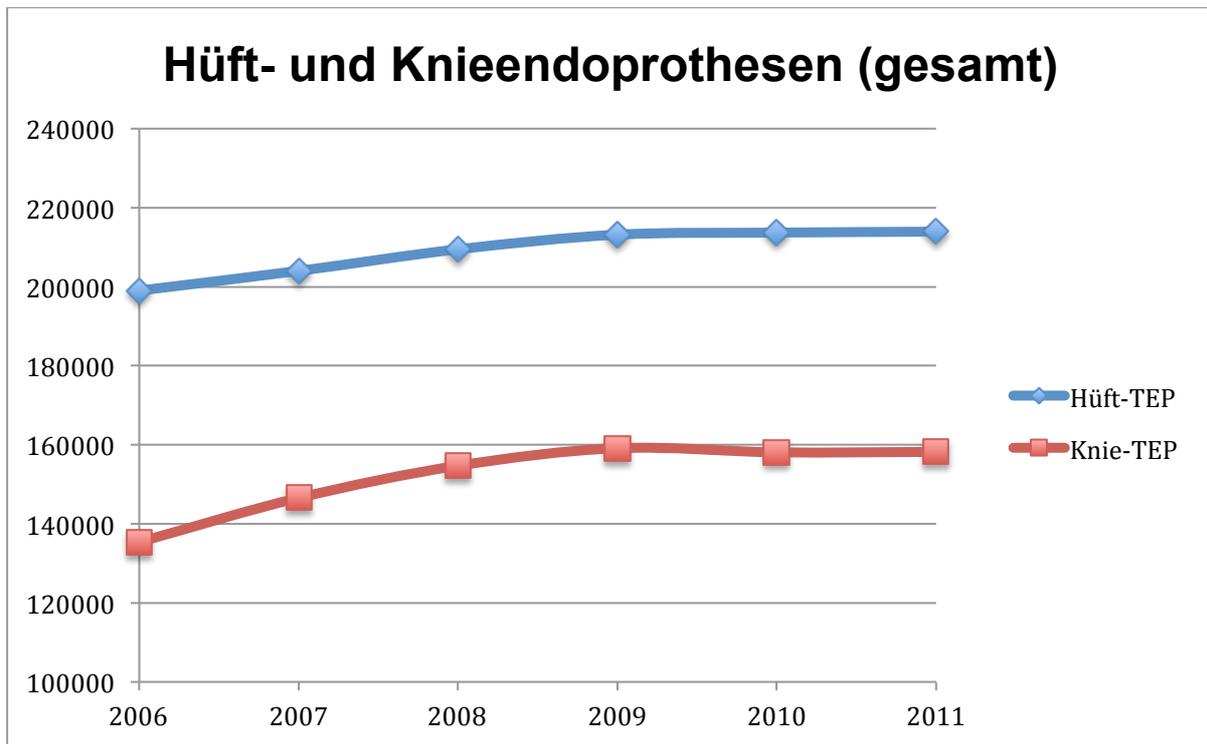


Abbildung 1: Entwicklung der Anzahl von Hüft- und Knie-Endoprothesen in Deutschland von 2006-2011; eigene Zusammenstellung, Zahlen aus Statistischem Bundesamt 2007-2012 und Braun et al. (2013)

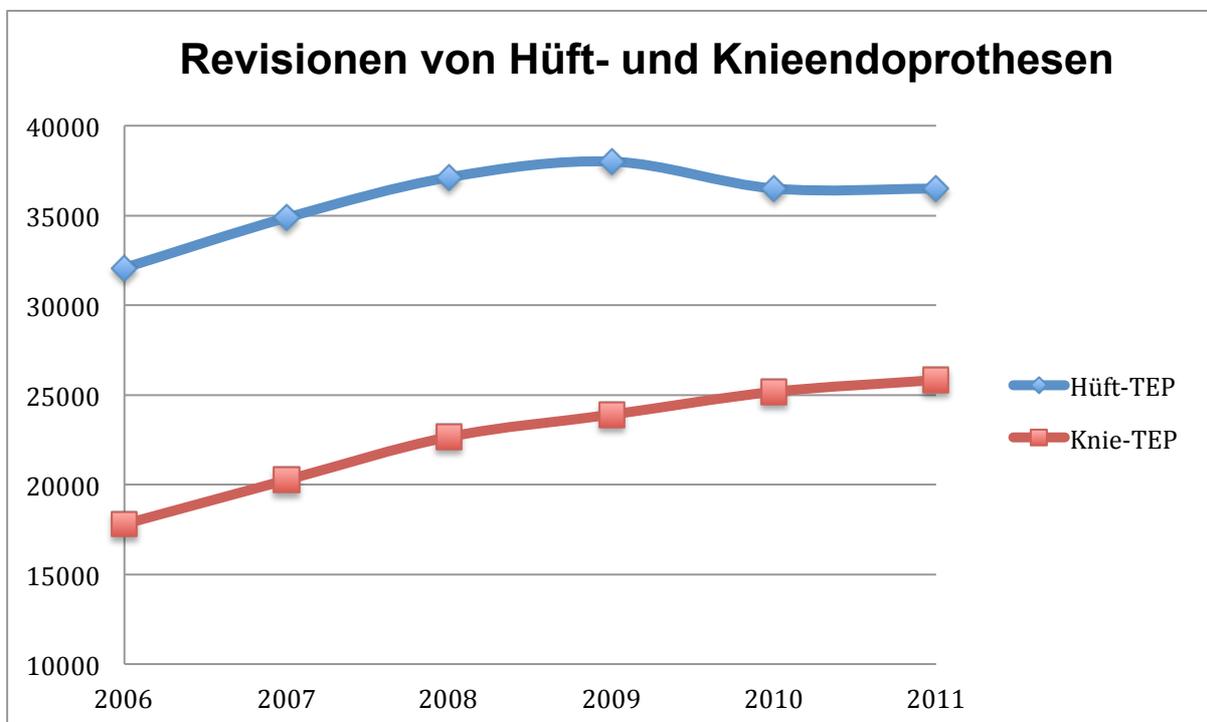


Abbildung 2: Entwicklung der Anzahl von Hüft- und Knie-Endoprothesen-Revisionen in Deutschland von 2006-2011; eigene Zusammenstellung, Zahlen aus Statistischem Bundesamt 2007-2012 und Braun et al. (2013)

1.2. Bedeutung der Endoprothetik für die Gesellschaft

Durch die hohe Zahl der durchgeführten Gelenk-Endoprothese-Implantationen muss neben der Verbesserung der Lebensqualität durch die Operation noch auf die Auswirkung der Endoprothetik auf das Gesundheitssystem eingegangen werden. Als letztes wird noch kurz die Bedeutung von sektorübergreifenden Zentren in diesem Zusammenhang dargestellt.

1.2.1. Einfluss auf die Lebensqualität

Der operative Eingriff zum Ersatz von Hüft- und Kniegelenk durch eine Endoprothese ist in Bezug auf die Verbesserung der Lebensqualität und der Kosteneffizienz sehr erfolgreich [Norman-Taylor et al. 1996, Ethgen et al. 2004]. Nach Implantation eines künstlichen Hüftgelenks beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate über 95%, die 25-Jahres-Überlebensrate beträgt 80% [Shan et al. 2014]. Nach Kniegelenkersatz zeigen sich ähnliche Werte. Nach Angaben einer kürzlich veröffentlichten Studie, die sich mit der Langzeitprognose nach dem Wechsel von Hüftendoprothesen befasste, liegt die 10-Jahres-Überlebensrate nach einer Revision bei über 80% [Philpott et al. 2014]. Abgesehen von der hohen Überlebensrate wurde eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität nach der Operation im Gegensatz zum präoperativen Gesundheitszustand festgestellt [Norman-Taylor et al. 1996, Ethgen et al. 2004, Shan et al. 2014]. Bei einigen Studien wurde der „Rosser Index“ verwendet, bei dem neben der körperlichen Einschränkung auch der Leidensdruck der Patienten erfasst wird [Norman-Taylor et al. 1996]. In einer dieser durchgeführten Studien zeigten alle Patienten postoperativ eine signifikante Verbesserung der Lebensqualität. Patienten profitieren unabhängig von Alter und Geschlecht besonders dann von einem künstlichen Gelenk, wenn die präoperative Lebensqualität besonders niedrig war [Norman-Taylor et al. 1996]. Jedoch zeigt sich diesbezüglich ein Unterschied bei dem eingesetzten Gelenk. Patienten erreichen nach Ersatz des Hüftgelenks eine Lebensqualität, die noch näher an der altersentsprechenden Lebensqualität liegt als Patienten, bei denen das Kniegelenk endoprothetisch versorgt wurde [Ethgen et al. 2004]. Bei beiden Gelenken ist die Verbesserung der Lebensqualität nach Revisionseingriff nicht so hoch wie nach der Erstoperation [Norman-Taylor et al. 1996, Ethgen et al. 2004]. Nach durchgeführten Revisionsoperationen haben Patienten, bei

denen aufgrund einer aseptischen Prothesenlockerung ein Prothesenwechsel indiziert war, eine bessere Prognose als Patienten, bei denen ein Prothesenwechsel aufgrund einer bakteriellen Infektion durchgeführt wurde [Philpott et al. 2014].

1.2.2. Bedeutung für die Medizin und das Gesundheitssystem

Die Bedeutung der Endoprothetik für das Gesundheitssystem muss man im Zusammenhang mit dem demographischen Wandel sehen.

Unter demographischem Wandel versteht man die Beschreibung von Tendenzen der Bevölkerungsentwicklung. Er spielt für die Medizin insofern eine Rolle, als es zu Veränderungen bezüglich der Altersstruktur zugunsten älterer Menschen kommt [Nowossadeck et al. 2012]. In den vergangenen zehn Jahren stieg das Durchschnittsalter von 41 auf 43 Jahre an und der Anteil der 65-Jährigen an der Gesamtbevölkerung stieg von knapp 17% auf knapp 21%. Verschiedene Krankheiten wie z.B. die Coxarthrose und Gelenkverletzungen sind altersassoziiert und kommen vor allem bei älteren Patienten vor. Die vorwiegende Indikation des Hüftendoprothesenersatzes ist die Coxarthrose.

Es wird deutlich, dass wir bei weiterem demographischen Wandel zugunsten älterer Menschen und den damit assoziierten Erkrankungen mit steigenden Kosten zur äquivalenten medizinischen Versorgung der Patientenjahrgänge 1943-1944 rechnen müssen sowie der damit bedingten finanziellen Belastung des Gesundheitssystems [Nowossadeck et al. 2012]. Die oben genannte Häufigkeit des operativen Eingriffs und die damit verbundenen Kosten zeigen die große gesundheitsökonomische Bedeutung der endoprothetischen Versorgung [Niethard et al. 2013, Haas et al. 2013].

1.2.3. „EndoProthetikZentrum“

Durch die gesundheitsökonomische Bedeutung der endoprothetischen Versorgung stellt sich die Frage, inwieweit man die Qualität der Patientenversorgung bei gleichzeitiger Kosteneffizienz sichern kann. In diesem Zusammenhang ist die international beobachtete Tendenz zur Zentrenbildung zu erwähnen. Durch sektorübergreifende Vereinigungen zu sogenannten „Zentren“, (z.B. „Traumazentrum“, „Darmzentrum“, „Krebszentrum“) ist eine messbare Verbesserung in Hinsicht auf die Qualität der medizinischen Versorgung wie auch der ökonomischen Effizienz zu

erreichen [Haas et al. 2013]. Darüber hinaus verbessert ein abteilungsübergreifendes Zentrum zusätzlich die interdisziplinäre Forschung.

Es wird eine bisher unregelmäßige Versorgungsstruktur durch ein sektorübergreifendes Modell ersetzt, in dem medizinische Qualität, Patientenorientierung und wirtschaftliche Effizienz angestrebt werden. Interdisziplinäre Behandlungsprozesse, Begleitung der Patienten während der gesamten Behandlungsdauer, Fortbildung für Ärzte sowie die Teilnahme an externen Qualitätssicherungsverfahren zur regelmäßigen Zertifizierung sind nach Empfehlung von Straub und Müller (2007) für die Einrichtung von „EndoProthetikZentren“ zu gewährleisten [Haas et al. 2013].

1.2.3.1. Anforderungen an ein „EndoProthetikZentrum“

Bestimmte Anforderungen, die sich auf Struktur- und Prozessqualität beziehen, sind als Voraussetzung für eine Zertifizierung zum „EndoProthetikZentrum“ zu erfüllen.

Zu diesen Anforderungen zählt unter anderem, dass eine bestimmte Leistungsmenge in einem Krankenhaus vorhanden sein muss, da es einen Zusammenhang zwischen Fallzahlen und Ergebnisqualität gibt [Haas et al. 2013].

Als weiterer Punkt wird ein strukturiertes „Qualitätsmanagement QM-System“ angeführt, dessen Aufgabe es ist, Tätigkeiten und Zielsetzungen in einem einheitlichen System zusammenzuführen [Haas et al. 2013]. Des Weiteren ist für die Zertifizierung zu einem „EndoProthetikZentrum“ eine Prozessqualität zu gewährleisten, bei der Patienten mit einer bestimmten Erkrankung standardisiert behandelt werden. Zuletzt ist noch die Sicherung der Ergebnisqualität zu nennen. Dabei ist nicht nur die subjektive Patientenzufriedenheit nach dem Eingriff gemeint, sondern auch eine standardisierte Erfassung der Bewertungen des Implantats (hinsichtlich Standzeit und Komplikationen), der Häufigkeit der Komplikationen und der dadurch bedingten weiteren Behandlungen [Haas et al. 2013].

1.2.3.2. Endoprothesenregister (EPRD)

Im Jahr 2012 stand das deutsche Endoprothesenregister (EPRD), gegründet durch die Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC), vor der Einführung. Damit wurde europaweit die größte Datenbank zur Registrierung der bundesweiten Anzahl der implantierten Hüft- sowie Kniegelenke geschaffen [Meißner et al. 2011].

1.3. Die Endoprothesenpathologie

Nach einer Gelenkendoprothesen-Implantation stehen für den Pathologen ursächlich drei Erkrankungen im Vordergrund, die zu einer Prothesenlockerung führen können [Morawietz et al. 2004, 2006]:

1. die aseptische Lockerung (periprotetische Partikelerkrankung)
2. die septische Lockerung (Infektionen)
3. die Arthrofibrose.

1.3.1. Histopathologische Klassifikation von Gelenkendoprothesen-assoziierten Erkrankungen

Erst vor kurzem erschien die „Erweiterte Konsensusklassifikation der Endoprothesenpathologie“ [Krenn et al. 2013]. Mit Hilfe dieser Klassifikation können die Endoprothese-assoziierten Erkrankungen durch gut reproduzierbare histopathologische Kriterien nach der Ätiologie klassifiziert werden.

1.3.1.1. Die periprotetische Membran

Bei der periprotetischen Membran handelt es sich um einen bindegewebsartigen Saum zwischen Knochen und Prothese (Abbildung 3, rote Struktur). Bei einer Prothesenlockerung ist dieser bindegewebsartige Saum im Gegensatz zur suffizienten Prothese verdickt und er weist Osteolysen auf [Morawietz et al. 2004, 2006]. Im englischen Sprachraum wird die periprotetische Membran auch als „synovial-like-interface membrane „ (SLIM) bezeichnet [Pap et al. 2001].

Die Neosynovialis (Abb. 3., blaue Struktur) bildet die Begrenzung des Gelenkraumes. Sie hat zwar Kontakt zum künstlichen Gelenk, jedoch nicht zum Knochen.

Im Gegensatz zur Neosynovialis kann die periprotetische Membran aufgrund ihrer Lage nicht zu diagnostischen Zwecken im Rahmen einer Arthroskopie biopsiert werden. Eine histologische Untersuchung der periprotetischen Membran kann folglich nur bei Entnahme des künstlichen Gelenks, wie etwa im Rahmen einer Revisionsoperation erfolgen. In der Literatur wird beschrieben, dass die periprotetische Membran und Neosynovialis miteinander kommunizieren, sodass sich zur histologischen Diagnostik beide Gewebe eignen [Bos 2001].



Abbildung 3: Periprothetische Membran und Neosynovialis bei der radiologischen Darstellung eines Hüftgelenks.

Abbildung von: Krenn et al.
Histopathologische Diagnostik in der Endoprothetik. Orthopäde
2009;38:520-530

1.3.1.2. Die Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006]

Wie in Abbildung 4 dargestellt, wird die periprothetische Membran bzw. Neosynovialis aufgrund der histopathologischen Befunde in vier Typen eingeteilt. Diese vier Typen repräsentieren das histopathologische Bild der Prothesenlockerung. (Die histologischen Kriterien sind im Material- und Methoden-Teil aufgeführt.)

Typ I wird als „Abriebtyp“ bezeichnet. Partikel, die sich von der Prothese lösen, werden hier als Ursache für die Prothesenlockerung gesehen. Je nachdem, welche histologischen Veränderungen noch zu finden sind, kann man bei Typ I auch auf eine Implantatallergie oder Nekrose als Ursache für die Prothesenlockerung rückschließen [Krenn et al. 2013]. Bei Typ II, der als „Infektiöser Typ“ bezeichnet wird, liegt ursächlich eine Infektion vor. Eine Kombination aus Typ I und Typ II liegt bei Typ III nach der Konsensusklassifikation [Morawitz et al. 2006] vor. Er wird deshalb als „Kombinierter Typ“ oder „Mischtyp“ bezeichnet. Bei Typ IV ist die Ursache der Prothesenlockerung noch nicht genau geklärt, er wird daher als „Indifferenten Typ“ bezeichnet [Morawietz et al. 2006]. Aufgrund histologischer Auffälligkeiten, wie z.B. einer vorliegenden Fibrose, lässt sich hier eine Arthrofibrose als Ursache für die Protheseninsuffizienz vermuten. Typ II und Typ III der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006] werden zu einem Kollektiv zusammengefasst, das histopathologisch als positiv für eine Infektion gilt. Typ I und Typ IV der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006] sind histopathologisch negativ für eine Infektion.

Die nicht infektiösen, aseptischen Ursachen der Protheseninsuffizienz sind häufiger als die infektiösen, septischen Ursachen, sodass die vier Typen der Konsensusklassifikation in unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen [Krenn et al. 2009].

Typ I und IV nach Konsensusklassifikation sind zusammen für etwa 70% der Prothesenlockerungen bei unzementierten Prothesen verantwortlich. Die restlichen 30% der Prothesenlockerungen bei den unzementierten Prothesen werden durch Typ II und III nach Konsensus verursacht. Die Reproduzierbarkeit der Einteilung nach der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006] anhand der histologischen Befundung betrug 95%. Die histologische Auswertung wurde von zwei Pathologen durchgeführt, die bei 232 von 245 Fällen zum gleichen Ergebnis kamen, ohne dass ihnen die klinische Diagnose bekannt war. Die standardisierte histopathologische Begutachtung ist deswegen so wichtig, da sie therapeutische Konsequenzen nach sich zieht [Krenn et al. 2009]. Abgesehen von den histologischen Kriterien kann auch die Prothesenstandzeit einen Hinweis darauf geben, um welchen Typ der Konsensusklassifikation es sich handelt. Bei Typ I ist eine mittlere Prothesenstandzeit (=mPS) von 12 Jahren, bei Typ II von 2,5 Jahren, bei Typ III von 4,2 und bei Typ IV von 5,5 Jahren errechnet worden [Morawietz et al. 2006].

1.3.1.3. Die erweiterte Konsensusklassifikation [Krenn et al. 2013]

Im Gegensatz zu der im Jahr 2004 auf nationaler und im Jahr 2006 auf internationaler Ebene vorgestellte Konsensusklassifikation der periprothetischen Membran bzw. Neosynovialitis ist bei der erweiterten Konsensusklassifikation das gesamte ätiologische Spektrum der Endoprothesen-assoziierten Erkrankungen erfasst [Morawietz et al. 2006, Krenn et al. 2013, Krenn et al. 2012, Krenn et al. 2009]. Im Gegensatz zur vorherigen Konsensusklassifikation beinhaltet die erweiterte Klassifikation neben der Arthrofibrose auch die ossären Pathologien der Prothesenlockerung [Krenn et al. 2013, Krenn et al. 2009]. Zu letzteren werden die periprothetische Ossifikation, der Bruch des Implantatlagers, die Osteonekrose und Osteomyelitis gezählt [Krenn et al. 2013].

Die erweiterte Konsensusklassifikation leistet einen großen Beitrag zur standardisierten Diagnostik der Prothesenlockerung.

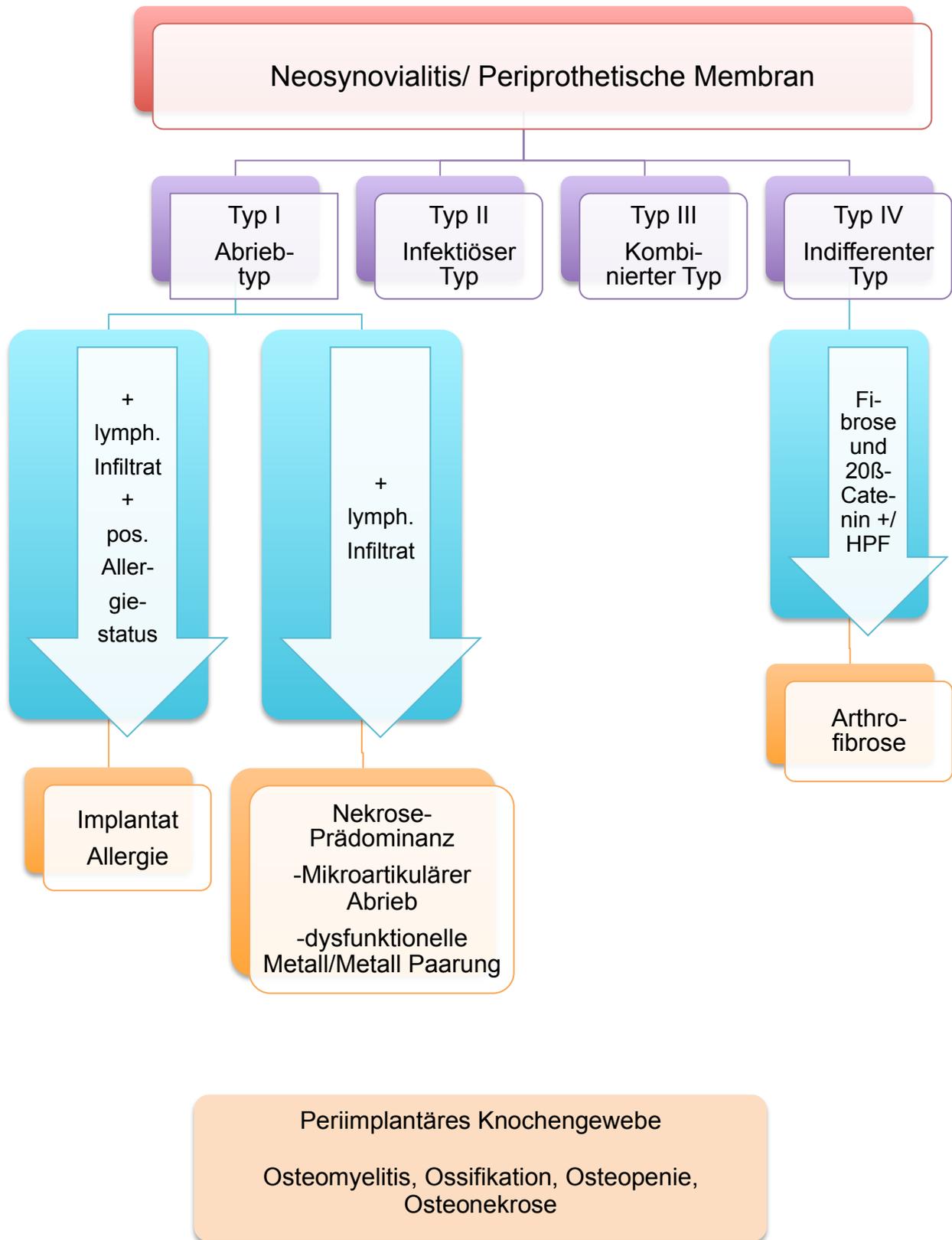


Abbildung 4: Erweiterte Konsensusklassifikation der Endoprothesenpathologie [Morawietz et al. 2006, Krenn et al. 2013]

1.4. Diagnostik der periprothetischen Gelenkinfektion

Bei den septischen Lockerungen liegt also eine periprothetische Gelenkinfektion vor. Um eine periprothetische Gelenkinfektion zu diagnostizieren, muss diese erst einmal definiert werden.

1.4.1. Definition der periprothetischen Gelenkinfektion

Auch wenn die periprothetische Gelenkinfektion zu einer häufigen Komplikation nach einer Gelenkendoprothesen-Implantation gehört, gab es lange keine einheitliche Definition des periprothetischen Gelenkinfekts. Eine Arbeitsgruppe aus der „Musculoskeletal Infection Society“ hat sich zusammengetan, um einen „Goldstandard“ zur Definition der periprothetischen Gelenkinfektion zu evaluieren [Parvizi et al. 2011]. Nach der neuesten Veröffentlichung von Zmistowski et al. ist eine periprothetische Gelenkinfektion vorhanden, wenn folgende Kriterien erfüllt sind [Zmistowski et al. 2014]:

- zwei positive mikrobiologische Kulturen, die aus der periprothetischen Membran stammen und in denen der gleiche Erreger nachgewiesen wurde, oder
- eine vorhandene Fistelbildung zwischen Gelenk und der Epidermis oder
- drei der folgenden „minor“ Kriterien müssen erfüllt sein:
 - erhöhtes Serum C-reaktives Protein (CRP) und erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)
 - Synovialflüssigkeit mit erhöhter Anzahl weißer Blutkörperchen oder positiver Leukozyten-Esterase-Test
 - erhöhter prozentualer Anteil an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN%)
 - positiver histologischer Befund von periprothetischem Gewebe
 - eine positive Kultur

Um anhand dieser Kriterien eine akute von einer chronischen periprothetischen Infektion zu unterscheiden, werden verschiedene Grenzwerte für CRP, BSG, den prozentualen Anteil der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten sowie der Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der Synovialflüssigkeit verwendet.

Zu berücksichtigen ist, dass bei einer Infektion mit niedrig virulenten Keimen (z.B. *Propionibacterium acnes*) eine periprothetische Gelenkinfektion vorliegen kann, obwohl

die oben aufgeführten Diagnosekriterien nicht erfüllt sind. Dadurch wird deutlich, dass diese Kriterien nicht zwingend bei einer klinisch diagnostizierten „Low-Grade-Infektion“ sind [Zmistowski et al. 2014, Parvizi et al. 2011].

1.4.2. Gegenüberstellung der Aussagekraft der angewandten Diagnostik bei der Detektion der periprothetischen Gelenkinfektion

Da die chronische Infektion im Vergleich zur akuten Infektion des periprothetischen Gelenks aufgrund der nicht so eindeutigen klinischen Symptome schwerer zu diagnostizieren ist, stellt sich die Frage, welche diagnostischen Maßnahmen besonders hilfreich bei der Diagnosestellung der chronischen periprothetischen Gelenkinfektion sind. Bei einer 2012 veröffentlichten Studie wurde untersucht, welche Aussagekraft eine intraoperativ im Rahmen einer Revisionsoperation durchgeführte Synovialbiopsie im Gegensatz zu einer präoperativen Gelenkpunktion und dem im Blut gemessenen C-reaktiven Protein (CRP) bei der Diagnose einer periprothetischen Gelenkinfektion der Hüfte hat [Fink et al. 2013]. Wird lediglich das CRP als einziges Kriterium für die Diagnostik herangezogen, beträgt die Sensitivität 64%, die Spezifität 75%, um einen periprothetischen Infekt diagnostizieren zu können [Fink et al. 2013] (Tabelle 12). Das CRP kann aufgrund mangelnder Spezifität nicht als alleiniges Kriterium für die Diagnosestellung herangezogen werden [Zmistowski et al. 2014]. Viele infektiöse und auch nicht infektiöse (z.B. Arteriosklerose) Entzündungsprozesse im Körper gehen mit einer CRP-Erhöhung einher, sodass CRP nur in Kombination mit einer erhöhten Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) eine Aussagekraft bei der Diagnosestellung der periprothetischen Gelenkinfektion hat [Zmistowski et al. 2014, Fink et al. 2013]. Die präoperative Gelenkpunktion (Aspiration) zur Gewinnung einer Zytologie bietet die Möglichkeit, durch präoperative Keimbestimmung eine geeignete Antibiotikatherapie anzuwenden. Jedoch ist die Aspiration bei alleiniger angewandter Diagnostik mit einer Sensitivität von 64% und einer Spezifität von 96% nicht so aussagekräftig bei der Detektion eines Infektes wie die intraoperativ durchgeführte Sinovialbiopsie mit einer Sensitivität von 82% und einer Spezifität von 98%. Letzteres wird für die Aufarbeitung einer histologischen Probe sowie für eine bakteriologische Untersuchung herangezogen [Fink et al. 2013].

Die histologische Untersuchung hat im Vergleich zu allen anderen hier aufgeführten diagnostischen Methoden mit 100% die höchste Spezifität. Die Sensitivität beträgt 62%. Durch die Kombination verschiedener diagnostischer Verfahren wie der präoperativen CRP-Bestimmung, der Gelenkaspiration und der Synovialbiopsie wird eine Sensitivität von 84% und eine Spezifität von 87% erreicht, um einen periprothetischen Gelenkinfekt diagnostizieren zu können [Fink et al. 2013].

Die höchste Aussagekraft bei der Diagnose des periprothetischen Gelenkinfekts der Hüfte hat somit die intraoperativ durchgeführte Synovialbiopsie durch die Kombination aus bakteriologischer und histopathologischer Untersuchung [Fink et al. 2013], (Abbildung 12).

Dass die intraoperativ durchgeführte Synovialbiopsie im Vergleich zur Gelenkaspiration und der Bestimmung des CRPs einen größeren Stellenwert hat, gilt auch für die Detektion des periprothetischen Gelenkinfekts des Knies [Fink et al. 2008].

1.4.2.1. Die Gelenkpunktion

Bei der Gelenkpunktion (Aspiration) wird, wie bereits erwähnt, eine Zytologie gewonnen. Es werden die Anzahl weißer Blutkörperchen und der prozentuale Anteil an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN%) bestimmt.

Diese Diagnostik gilt als einfach durchzuführender Test, bei dem im Idealfall zwischen aseptischer und septischer Ursache der Prothesenlockerung unterschieden werden kann [Trampuz et al. 2004]. Einer Studie zufolge ist darüber hinaus die Sensitivität dieses Tests nicht durch eine bereits begonnene antibiotische Behandlung beeinträchtigt. Entscheidend ist die Festlegung des Grenzwertes, um zu definieren, wann es sich um eine periprothetische Gelenkinfektion handelt.

Trampuz et al. veröffentlichten 2004 eine Studie, bei der er einen prozentualen Anteil von 65% neutrophilen Granulozyten vorschlug. Bei diesem Grenzwert weist die Gelenkaspiration eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 98% auf, eine periprothetische Infektion des Knies zu diagnostizieren [Trampuz et al. 2004].

2012 wurde eine Studie veröffentlicht, in der verschiedene Grenzwerte aus verschiedenen Arbeiten einander gegenübergestellt wurden. Auch hier wurde der prozentuale Anteil von neutrophilen Granulozyten mit 65% an den Gesamtleukozyten als optimaler Grenzwert zur richtigen Diagnosestellung angesehen. Für die Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen wurden 1590 Zellen/ μ l als optimaler Grenzwert festgelegt

[Dinneen et al. 2013]. Aus der Literatur geht hervor, dass bei einem höher gewählten Grenzwert, ob bei der Anzahl an Leukozyten oder auch beim prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten an den Gesamtleukozyten, die Spezifität des Diagnostikums steigt, die Sensitivität hingegen jedoch abnimmt [Trampuz et al. 2004, Dinneen et al. 2013].

Bei erhöhten Werten des C-reaktiven Proteins sowie der Blutsenkungsgeschwindigkeit scheint der Grenzwert von 3000 Leukozyten/ml und der prozentuale Anteil von >80% an neutrophilen Granulozyten die beste Aussagekraft bei der präoperativen Diagnostik der periprothetischen Gelenkentzündung zu haben [Schinsky et al. 2008].

Diese Grenzwerte wurden in der neuesten Publikation der „Definition eines periprothetischen Gelenkinfekts“ von Zmistowski et al. verwendet [Zmistowski et al. 2014].

1.4.2.2. Die intraoperativ durchgeführte Synovialbiopsie

Wie bereits oben beschrieben, werden aus der intraoperativ im Rahmen einer Revisionsoperation gewonnenen Synovialbiopsie nicht nur mehrere Proben für eine bakterielle Untersuchung entnommen, zusätzlich wird auch eine Gewebeprobe für die histopathologische Begutachtung entnommen. Um histopathologisch einen periprothetischen Gelenkinfekt zu diagnostizieren, ist vor allem die Quantität der neutrophilen Granulozyten von herausragender Bedeutung. Sowohl die Anzahl der neutrophilen Granulozyten, also die Festlegung eines Grenzwertes in verschiedenen HPFs, wie auch die diagnostische Methodik (unter anderem die verwendete Färbung), um histopathologisch einen periprothetischen Infekt diagnostizieren zu können, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Morawietz et al. veröffentlichten 2009 eine Arbeit, in der gezeigt wurde, dass ab einer Anzahl von 23 detektierten neutrophilen Granulozyten in 10 High Power Fields (HPF) eine periprothetische Gelenkinfektion vorliegt [Morawietz et al. 2009]. Verglichen mit dem mikrobiologischen Befund führt dieser diagnostische Test unter Verwendung des oben aufgeführten Grenzwertes mit einer Spezifität von 95% und Sensitivität von 73% zur richtigen Diagnosestellung (area under the curve 0,881). Verglichen mit der klinischen Diagnose ergeben sich eine Spezifität von 97% und eine Sensitivität von 77% (area under the curve 0,891) [Morawietz et al. 2009] (Abbildung 12). Die mikrobiologische Befundung und die Klinik werden zur Berechnung der Spezifität und Sensitivität und damit zur diagnostischen Aussagekraft von 23

positiven NG in 10 HPF als Goldstandard benutzt. In jedem HPF werden die neutrophilen Granulozyten gezählt und letztendlich die Anzahl aus allen 10 HPF addiert. Werden in einem HPF mehr als 10 NG gefunden, werden diese nicht beachtet, sodass man nach Analyse aller HPF auf einen Maximalwert von 100 NG kommt. Bei einer lokalisierten Entzündung kann somit niemals ein einziges HPF zur Diagnosestellung genügen. Intravasal gelegene neutrophile Granulozyten werden nicht mitgezählt [Morawietz et al. 2009]. Unter Verwendung einer immunhistochemischen Färbung mittels Anti-CD15-Antikörpern können die neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur PAS- (Periodic acid-Schiff reaction) Färbung besser dargestellt werden [Morawietz et al. 2009].

Der angedachte Grenzwert, der dazu dient, eine periprothetische Gelenkinfektion zu diagnostizieren und somit zwischen einer septischen und aseptischen Prothesenlockerung unterscheiden zu können, variiert in verschiedenen Arbeiten stark. Er reicht von einem neutrophilen Granulozyt in 10 HPF [Athanasou et al. 1997] über zwei neutrophile Granulozyten in 10 HPF [Pandey et al. 1999] und fünf neutrophile Granulozyten in 10 HPF [Feldmann et al. 1995] bis hin zu zehn neutrophilen Granulozyten in 10 HPF [Banit et al. 2002, Lonner et al. 1996]. Wegen der hohen Sensitivität und Spezifität dieses diagnostischen Tests und der daraus resultierenden hohen diagnostischen Güte gelten die Methode von Morawietz et al. als Standardverfahren zur histopathologischen Diagnose des periprothetischen Gelenkinfekts in Deutschland.

2. Fragestellung der Arbeit

Eine Vielzahl korrelativer, an unterschiedlich großen Kollektiven unterschiedlich durchgeführte Analysen hat gezeigt, dass die Quantifikation von neutrophilen Granulozyten einen Beitrag zur bakteriellen Infektionsdiagnostik leistet, die in Sensitivität und Spezifität variieren. Diese Analysen basieren auf der Quantifizierung von neutrophilen Granulozyten in unterschiedlich vielen „High-Power-Fields“ (HPFs) und unterschiedlichen Methoden der Granulozyten-Detektion. In den meisten Analysen wurden als Basis mehrere „High-Power-Fields“ (bis zu 10HPFs) herangezogen. Die Granulozytendetektion wurde mehrheitlich morphologisch und enzymhistochemisch durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Analysen war es, einen neuen infektionspathologischen Quantifizierungs-Modus zu entwickeln:

1. Durch die Quantifizierung von CD15 positiven neutrophilen Granulozyten in einem einzigen Gesichtsfeld sollte ein „Score“ entwickelt werden, welcher zeitnah zu einer Infektionsdiagnose mit hoher diagnostischer Güte führt.
2. Um den zeitkonsumierenden Prozess des mikroskopischen Zellauszählens zu reduzieren, sollte eine morphometrische Software entwickelt werden, welche eine eindeutige automatische Quantifizierung ermöglicht.

Mit diesem immunhistochemisch und softwarebasierten und automatischen CD15-Quantifizierungsmodus sollte ein „Diagnose-Tool“ mit geringem Zeitaufwand, hoher Spezifität und Sensitivität, geringer Inter- und Intraobserver Variabilität erarbeitet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsmaterial und Patienten

Es wurde eine retrospektive Studie durchgeführt. Die Gewebeproben stammen von 91 Patienten. Die Entnahme erfolgte intraoperativ im Rahmen einer endoprothetischen Revisionsoperation, die im Zeitraum von Januar 2012 bis Januar 2014 an Hüfte oder Knie erfolgte. Die Probeentnahme dient der histopathologischen Diagnostik, welche zur Abklärung der Ursache des Prothesenversagens beiträgt. Bei allen Patienten, bei denen der Verdacht auf eine Infektion vorlag, wurden intraoperativ drei bis sechs Proben für eine mikrobiologische Untersuchung entnommen. Ein mikrobiologischer Befund gilt in der hier vorliegenden Arbeit als positiv, wenn durch die Kultivierung in mindestens zwei Proben der gleiche Erreger nachgewiesen wurde. Bei 47 Patienten wurde in mindestens zwei Proben der gleiche Keim nachgewiesen. Insgesamt wurden 15 verschiedene Keime isoliert. Bei den meisten Patienten (n=16) war *Staphylococcus epidermidis* für die Infektion verantwortlich. Bei fünf Patienten fand man *Propionibacterium acnes*, bei drei *Escherichia coli*. Bei jeweils zwei der Patienten konnte man *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus haemolyticus* oder *Enterococcus faecalis* finden. Bei jeweils einem Patienten war der Abstrich positiv auf *Staphylococcus aureus*, einem Vertreter der Streptokokken der Gruppe A, *Korynebakterium*, *Gemella haemolysans* oder *Bacillus pumillus*. Bei sechs der Patienten war der mikrobiologische Befund positiv und es bestand der Verdacht auf einen hoch virulenten Erreger (Tabelle 7). Bei den restlichen 4 Patienten wurde eine Mischinfektion diagnostiziert. An diesen Mischinfektionen war immer *Staphylococcus epidermidis* in Kombination mit *Moraxella osloensis* oder *Parvimonas micra* oder *Staphylococcus pettenkoferi* oder *Staphylococcus capitis* beteiligt.

Das Vergleichs-Kollektiv setzte sich aus 44 Patienten zusammen, bei denen der mikrobiologische Befund negativ ist. Die mikroskopische Befundung wurde mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (DM 2500, Leica, Wetzlar) an vollautomatisch gefärbten Hämatoxylin-Eosin (HE), PAS- sowie immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparaten durchgeführt. Die Präparate sind im Durchmesser in der maximalen Ausdehnung 32 mm groß. Bei der immunhistochemischen Färbung wurden Anti-CD15-Antikörper eingesetzt. Diese dienen der Detektion von Entzündungszellen, die CD15 als Oberflächenmerkmal exprimieren. Die histologische Befundung ergab, dass es sich entsprechend der Konsensusklassifikation bei 31 Proben um periprothetische

Membranen des Infektösen Typs (Typ II-Membran) handelt. Bei zehn liegt eine periprothetische Membran des Kombinierten Typs (Typ III-Membran), bei 31 liegt eine periprothetische Membran vom Abriebtyp (Typ I-Membran) vor. Bei den restlichen 13 ist eine periprothetische Membran vom Indifferenztyp (nicht-abriebinduziert, nicht-infektiös, Typ IV-Membran) diagnostiziert worden. Zur Auszählung der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten mit Hilfe des „CD15 Quantifiers“ wurden insgesamt 19 Schnitte herangezogen.

3.2. Aufarbeitung der Gewebeproben

Die Gewebeproben stammten aus dem Routine-Eingangsmaterial des Medizinischen Versorgungszentrums für Histologie, Zytologie und molekulare Diagnostik, Trier. Die Proben wurden vor der histopathologischen Diagnostik anonymisiert. Die gesamten histochemischen und immunchemischen Methoden und Gewebeprozesse wurden in einem zertifizierten und akkreditierten Rahmen durchgeführt. Der Qualitätsstandard erfolgte nach der DIN ISO/IEC 17020.

3.2.1. Anfertigung der histologischen Präparate

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Anfertigung der histologischen Präparate erläutert. Bei den nun folgenden Abschnitten handelt es sich um eine persönliche Mitteilung.

3.2.1.1. Fixierung und Paraffineinbettung

Das zu untersuchende Gewebe wird in 4%-igem gepuffertem Formalin eingesendet und in 0,5 cm dicke Gewebeproben geschnitten. Daraufhin folgt eine weitere Fixierung in Formalin. Durch die Fixierung werden einzelne Eiweißmoleküle miteinander vernetzt. Formalin ist die wässrige Lösung des Formaldehyds (HCHO). Formalin ist als 30-40%ige Lösung erhältlich und es wird dann eine 4%-Lösung hergestellt, die für etwa 24-48 Stunden auf das Gewebe einwirkt und die optimal zur Aufbewahrung geeignet ist. Das pH-Optimum liegt bei 6-8. Eine zu hohe Formalinkonzentration führt dazu, dass das Gewebe zu hart und die Kernfärbung schlecht wird. Die Entwässerung findet in einem geschlossenen Entwässerungsgerät statt (Vakuumentwässerer, Peloris SOP 8204, Leica, Wetzlar). Durch die Entwässerung schrumpft das Gewebe, was zu einer Verdichtung und Härtung führt. Um das Zerreißen des Gewebes zu vermeiden, erfolgt

die Entwässerung stufenweise mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96% und absoluter Alkohol). Wichtig ist, dass die Alkohole öfters gewechselt werden, da das verschleppte Wasser die Konzentration verändert. Es stehen mehrere Entwässerungsmittel zur Verfügung, jedoch ist Ethanol kostengünstig, nicht toxisch, wirkt rasch entwässernd und mischt sich in allen Volumenverhältnissen mit Wasser. Der Nachteil ist, dass ein Lösungsvermittler benötigt wird, wie z.B. Benzol, um die Präparate in Paraffin zu bringen. Die Gewebsentwässerung dient zwei Zwecken: Einerseits wird das Gewebe gehärtet durch Konsistenzvermehrung und andererseits mischt sich das Einbettungsmittel nicht mit Wasser. Einige Einbettungsmedien lösen sich nur schwer in Alkohol, deswegen ist es sinnvoll, ein Intermedium zwischenschalten. In den meisten Fällen wird hierfür Xylol (bzw. Xylen) verwendet. Als nächstes erfolgt das Durchtränken des Gewebes mit heißem Paraffin. Wie lange die Durchtränkung dauert, richtet sich nach der Größe und Dichte des Materials. Nach dem Paraffineinschluss beträgt die Originalgröße des Schnittes nur noch etwa 20-40%. Länger als 48 Std. sollte deswegen kein Paraffineinschluss dauern, da das Gewebe sonst zu sehr schrumpft. Nach der Infiltration befindet sich das Gewebe in flüssigem Paraffin. Nun müssen die Proben in einen Block aus Paraffin gegossen werden, dazu werden Ausgießförmchen aus Metall oder Kunststoff verwendet. Diese werden mit heißem Paraffin gefüllt und das Gewebestück mit der Schnittfläche nach unten in das Einbettungsgefäß gelegt. Das verwendete Paraffin hat einen sehr hohen Schmelzpunkt bei etwa 60° C, damit die Blöcke bei Raumtemperatur genug Festigkeit erhalten. Die Blöcke werden dann in einen Kühlschrank gelegt; sind sie erstarrt, werden sie aus den Rahmen genommen.

3.2.1.2. Anfertigung der Paraffinschnitte und Entparaffinierung

Zunächst erfolgt das Anschneiden des Blocks, es muss so viel Paraffin weggeschnitten werden, bis die vollständige Oberfläche des Gewebes erscheint. Dann werden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Hyrax M40, Zeiss, Oberkochen, Messer A35, Feather, Osaka, Japan) feine Schnitte des Gewebes angefertigt, die etwa 1-3 µm dick sind. Mit Hilfe einer Pinzette wird der Schnitt in ein warmes Wasserbad (37°C) gelegt, damit bewirkt man, dass sich der Schnitt noch mehr streckt. Am Schnitt werden eine glänzende Unter- und eine matte Oberseite unterschieden. Die glänzende Seite wird auf den entfetteten, unbeschichteten Objektträger (Objektträger Superfrost entfettet und geschnitten, Menzel, Braunschweig) aufgezogen. Danach kommen die Objektträger für

etwa 15 min. bei 90°C in den Brutschrank (function line, Firma Heraeus, Hanau), damit das Paraffin für die Färbung etwas flüssiger gemacht wird. Die meisten Farbstoffe werden in wässriger oder alkoholischer Lösung aufgebracht. Da Paraffin alkoholunlöslich ist, wird dadurch der Zugang der Farbstoffe zum Gewebe erschwert. Deshalb erfolgen vor der Färbung eine Entparaffinierung und eine Rehydrierung der Schnitte. Zunächst kommen die Schnitte für kurze Zeit (etwa 3 min.) in Xylol, sodass das Paraffin herausgelöst wird. Danach werden sie durch eine absteigende Alkoholreihe (Alkohol 100%, 96%, 90%, 80%, 60%) in Aqua dest. übergeführt. Die Schnitte sollten in jeder dieser Lösungen einige Minuten bleiben.

3.2.2. Färbungen der Schnitte für die histologischen Untersuchungen

3.2.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die Färbung erfolgt im Färbeautomat ST 4040 der Marke Leica.

Es folgen 19 Arbeitsschritte, in denen unterschiedliche Reagenzien wenige Minuten auf die Schnitte einwirken. Als Übersichtsfärbung gilt die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) nach Ehrlich. Zunächst werden die Objektträger viermal für jeweils 2 Minuten in Hämatoxylin nach Harris (Hämatoxylin nach Harris, Surgipath, Richmond, Illinois, USA) getaucht. Danach folgt eine 2-minütige Behandlung in 70%-igem Ethanol und 25%-iger Salzsäure und eine anschließende Spülung mit Leitungswasser.

Bei niedrigem pH ist der Farbstoff Hämatoxylin positiv geladen und färbt dann basophile (negativ geladene) Strukturen, wie etwa die DNA des Kerns sowie die RNA des Endoplasmatischen Retikulums blau an. Zur Gegenfärbung wird der negativ geladene Farbstoff Eosin (Eosin Y, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) verwendet. Auch hier werden die Schnitte viermal für 2 Minuten in die Farbe getaucht. Eosin färbt die übrigen Strukturen „Azidophil“, also in verschiedenen rötlichen Tönen. Zunächst werden die Schnitte in Xylol, dann für wenige Minuten in eine absteigende Ethanolreihe (siehe oben) getaucht. Dazwischen folgt immer eine kurze Spülung unter Fließwasser. Es folgt die Tränkung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (Alkohol 60%, 80%, 90%, 96%, 100%), wobei die Schnitte in jeder Lösung wenige Minuten verbleiben sollten. Danach folgt eine Xylol-Behandlung. Zum Schluss werden die Schnitte in einem Eindeckautomaten (CV5030, Leica, Wetzlar) mit Hilfe eines Eindeckmittels (Fixogum

Fotokleber) eingedeckt. Diese Harz-ähnliche Substanz führt dazu, dass der Schnitt nicht austrocknet und die Farbe verliert. Danach wird ein Deckglas auf dem Schnitt positioniert. Zwischen dem Deckglas und dem Objektträger befindet sich die Harz-ähnliche Substanz.

3.2.2.2. PAS (*Periodic-Acid-Schiff*)-Färbung

Die Färbung erfolgt im gleichen Automaten wie die HE-Färbung. Diese Art der Färbung wird angewandt, um Polysaccharide, Mukopolysaccharide sowie Mukoproteine, Glykoproteine, Phospholipide und Glykolipide anzufärben. Zuerst werden die Schnitte mit Xylol, dann mit Alkohol einer absteigenden Ethanolreihe behandelt (siehe oben), wobei die Schnitte in jeder Lösung wenige Minuten verbleiben. Durch die Vorbehandlung mit Perjodsäure werden die Glykole zur Aldehydgruppe oxidiert. Die rote Farbreaktion ist dann durch die Reaktion der Aldehyde mit dem Schiff'schen Reagenz zu erklären. Danach werden die Schnitte mit Hämalaun nach Mayer angefärbt, wodurch die dunkle Färbung der Zellkerne zu erklären ist. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgt immer eine Spülung mit Fließwasser. Zum Schluss werden die Schnitte für etwa 10 min. in 96%igem Isopropanol fixiert.

3.2.2.3. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie, auch Immunhistologie genannt, ist eine in der Medizin angewandte Methode, bei der mit Hilfe von markierten Antikörpern z.B. Proteine sichtbar gemacht werden können [Lodish et al. 2001].

Die folgende Beschreibung bezieht sich speziell auf die Färbung von CD15 positiven Oberflächenantigenen. Die immunhistochemische Färbung erfolgt in einem vollautomatisierten Färbesystem (BenchmarkXT, ICH Slide Stainer der Marke Roche, Ventana Medical Solutions). Pro Durchlauf, der etwa 3,5 Stunden dauert, können 30 Schnitte immunhistochemisch gefärbt werden. Im MVZ für Histologie, Zytologie und molekulare Diagnostik in Trier stehen fünf solcher Färbesysteme, sodass an einem Arbeitstag insgesamt 300 Schnitte immunhistochemisch gefärbt werden können.

Wenn die Schnitte mit einem Barcode versehen wurden, werden sie in die Kassette des Automaten gelegt. Zur Färbung wird über der Kassette das Färbekit (I-VIEW DAB Färbekit, Ventana Medical Solutions, Tucson, USA) positioniert. Unter den Schnitten befinden sich verschiedene Lösungen, die mit Hilfe eines Zerstäubers auf die Schnitte gesprüht werden. Bei der immunhistochemischen Anfärbung von CD 15 werden

insgesamt 84 Einzelschritte durchgeführt. Auf die wichtigsten Schritte werde ich im Folgenden eingehen. Zunächst werden die Objektträger für 4 Minuten auf 75° C erhitzt und es erfolgt eine Entparaffinierung mit Hilfe von *EZ Prep*. Bei *EZ Prep* handelt es sich um eine wässrige Lösung, die als Xylol-Ersatz dient und speziell für dieses Färbesystem verwendet wird. *EZ Prep* wird dreimal auf die Objektträger aufgetragen und danach wieder abgewaschen, bis die Schnitte vollständig entparaffiniert sind. Die Objektträger werden für 4 Minuten auf 76°C erhitzt und ein hitzebeständiges Öl wird auf den gesamten Objektträger aufgetragen. Bei diesem Öl handelt es sich um *ULTRA LCS (Predilute)*, auch *ULTRA liquid covership* genannt. Das Öl verhindert, dass Teile der Reagenzien verdampfen oder dass die Gewebprobe schrumpft. Danach folgen mehrere Schritte, in denen *Cell-Conditioning 1 (CC1)* aufgetragen wird. Bei *CC1* handelt es sich um einen Puffer (pH7.8), der zur Vorbehandlung der Antigen-Demaskierung verwendet wird. Zunächst erfolgt eine Zellkonditionierung, die bei 95°C über 8 Minuten wiederholt durchgeführt wird. Danach wird eine milde Zellkonditionierung über 30 Minuten durchgeführt. Neben *CC1* wird auch immer *ULTRA liquid covership* aufgetragen. Als nächstes wird die Objektträger-Heizung ausgeschaltet, die Objektträger werden gewaschen, mit einem Reaktionspuffer gespült und es wird nochmals *ULTRA liquid covership* aufgetragen. Im Folgenden werden die Objektträger auf 37°C erwärmt.

Die eigentliche immunhistochemische Markierung erfolgt in folgenden Schritten (zur Übersicht, Abbildung 5):

- Inkubation der Schnitte mit H_2O_2
- Inkubation mit einer „Blocking“-Lösung zur Reduktion unspezifischer Markierungen
- Inkubation mit dem primären Antikörper (=Ak, bindet direkt an CD15)
- Inkubation mit dem sekundären Antikörper (bindet an den primären Ak)
- Inkubation mit dem Enzym Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (setzt die Farbreaktion um), Streptavidin ist ein bakterielles Avidin (Eiweiß), welches Biotin bindet. Peroxidasen gehören zu den Enzymen, die Wasserstoffperoxid als Substrat verwenden. $R_{red.} - H_2 + H_2O_2 \rightarrow R_{ox.} + 2 H_2O$
- Vorinkubation mit 3,3 Diaminobenzidin (DAB), ein Farbreagenz, das die Peroxidase-Aktivität anfärbt.
- Zugabe von H_2O_2 (das Substrat der Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase)

- „Metall Enhancer“, damit der Schnitt seine typische Färbung erhält

Zwischen den einzelnen, nun folgenden Schritten folgt immer eine zweimalige Spülung der Schnitte mit Reaktionspuffer und die Verwendung von *ULTRA liquid covership*.

1. Es wird 1 Tropfen (0,1ml) I-VIEW INHIBITOR (3% Hydrogen Peroxyd H_2O_2) aufgetragen. Dadurch wird die endogene Peroxidase gehemmt, die für eine unspezifische Hintergrundreaktion mit verantwortlich ist.
2. Dann wird 1 Tropfen (0,1ml) ANTI-CD15 (Anti-CD15, mouse monoclonal primary antibody, Klon MMA, Roche, Basel, Schweiz) auf dem Schnitt verteilt und für 32 Minuten inkubiert. Bei ANTI-CD15 handelt es sich um den primären Antikörper (Anti- CD15-Antikörper).
3. Danach wird 1 Tropfen (0,1ml) I-VIEW BIOTIN Ig aufgetragen und für 8 Minuten inkubiert. Dabei handelt es sich um einen sekundären Antikörper.
4. Als nächstes wird I-VIEW SA-HRP aufgetragen und für 8 Minuten inkubiert. Es handelt sich dabei um eine Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase, die an den sekundären AK bindet und die Farbreaktion umsetzt.
5. Des Weiteren wird 1 Tropfen (0,1ml) I-VIEW DAB und
6. 1 Tropfen I-VIEW (0,1ml) H_2O_2 aufgetragen und 8 Minuten inkubiert.
7. Zum Schluss kommt noch 1 Tropfen (0,1ml) I-VIEW COPPER auf die Schnitte und wird für 4 Minuten inkubiert. Es handelt sich dabei um einen „Metall-Enhancer für DAB“. Er ist verantwortlich für die rot-braune Färbung des Schnittes.

Zur Gegenfärbung wird Hämatoxylin (nach Harris, Surgipath, Richmond, Illinois, USA) verwendet. Die Schnitte werden nochmals mit Reaktionspuffer gespült und *ULTRA liquid covership* wird aufgetragen. Es folgt die Tränkung in eine aufsteigende Ethanolreihe (Alkohol 60%, 80%, 90%, 96%, 100%), wobei die Schnitte in jeder Lösung wenige Minuten verbleiben sollten. Danach folgt eine Xylol-Behandlung. Anschließend werden die Schnitte eingedeckt.

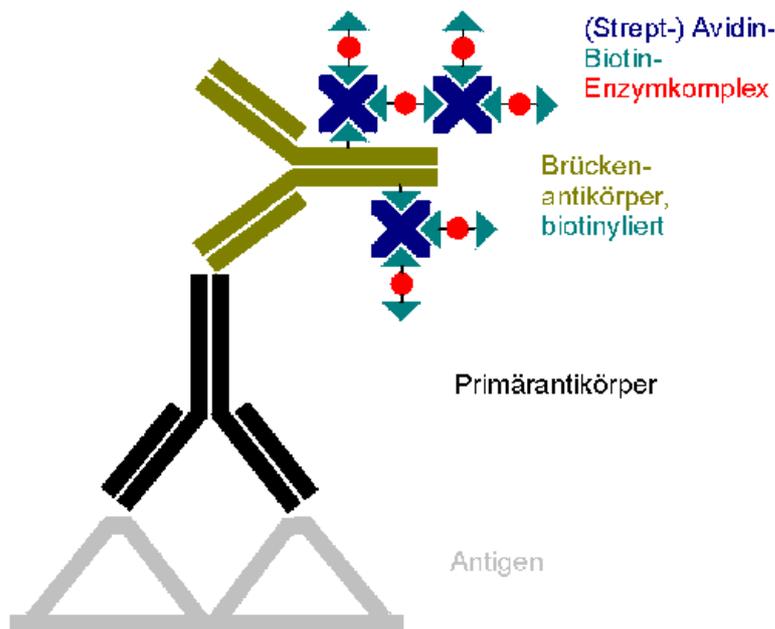


Abbildung 5: (Strept-) Avidin-Biotin-Complex (ABC)

Quelle: Pathologie Online.<http://www.pathologie-online.de/methoden/immunhistologie>

Bei einem Präparat (Eingangsnummer: H/13/25565), wurde eine Negativkontrolle (Abbildung 21) angefertigt. Dabei wird die Inkubation mit dem primären Antikörper, in diesem Fall, ANTI-CD15 (Anti-CD15, mouse monoclonal primary antibody, Klon MMA, Roche, Basel, Schweiz) weggelassen. Alle anderen Schritte werden wie beschrieben durchgeführt. Bei dem gleichen Präparat erfolgte auch eine immunhistochemische Färbung mit Hilfe von ANTI-CD68-Antikörpern (Anti-CD68, mouse monoclonal primary antibody, Klon KP-1, Roche, Basel, Schweiz), (Abbildung 22). Bei der immunhistochemischen Färbung wurde nur ein anderer primärer Antikörper verwendet, alle anderen Schritte unterscheiden sich nicht von den oben aufgeführten.

3.3. Die Endoprothesenhistopathologie

In der Einleitung bin ich bereits auf die Endoprothesenpathologie eingegangen. Hier folgen nun die histopathologische Klassifikation und die Auflistung der histopathologischen Diagnosekriterien bei den verschiedenen Formen der Endoprothesenlockerung.

3.3.1. Aseptische und septische Prothesenlockerung

Die aseptische Lockerung ist die häufigere von beiden. Sie ist für etwa 70% aller Hüftendoprothesenlockerungen und für über 40 % der Knieendoprothesenlockerungen verantwortlich. Ursächlich werden mehrere Pathomechanismen diskutiert [Otto et al. 2008]. Zum einen kommt es zu einer Akkumulation von Abriebpartikeln, die z.B. aus Polyethylen (PE), Keramik, Metallen oder Zement bestehen und dadurch zu einer Makrophagenaktivierung [Gentzsch et al. 2002]. Dies führt dann zur Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren. Dieser aseptische Entzündungsprozess kann letztendlich zu periprothetischen Osteolysen führen [Morawietz et al. 2004, Krenn et al. 2013]. Die kumulative Zytokinaktivität, die zur Knochenresorption führt, ist mit der Anzahl an aktivierten Makrophagen gleichzusetzen [Rader et al. 1999]. Der resorbierte Knochen wird dann durch Bindegewebe ersetzt und der Knochen entfernt sich zunehmend von der Oberfläche der Prothesenverankerung [Gentzsch et al. 2002]. Zum anderen kommt es bei Prothesen, die nicht stabil genug implantiert sind, zu einer vorzeitigen Prothesenlösung. Patienten, bei denen der radiologische Befund eine deutliche femorale Verschiebung nach implantierter Hüft-Endoprothese zeigt, klagen über stärkere Schmerzen als Patienten, bei denen nach der radiologischen Befundung nur eine geringe Gelenkverschiebung diagnostiziert wird [Liebs et al. 2014]. Die Revisionsrate ist hier signifikant höher als bei den restlichen Prothesen, bei denen kurz nach der Implantation radiologisch keine Spaltvergrößerung zwischen Pfanne und Kopf diagnostiziert werden konnte [Krismer et al. 1996].

Bei der septischen Lockerung liegt ursächlich eine bakterielle Infektion des periprothetischen Gewebes vor. Zum einen kann dies durch eine primäre Kontamination der Prothese mit Keimen bei der Erstimplantation bedingt sein [Krenn et al. 2013, Krukemeyer et al. 2009]. Hier unterscheidet man nach dem klinischen Verlauf eine akute floride Infektion von einer zeitlich verzögert auftretenden chronischen Infektion. Der unterschiedliche klinische Verlauf ist auf einen unterschiedlichen Pathomechanismus und eventuell auf die Beteiligung unterschiedlicher Keimqualitäten zurückzuführen [Krenn et al. 2009].

Neben der primären Keimkontamination der Prothese gilt die sekundäre Infektion, wie sie beispielsweise bei einer Bakteriämie auftreten kann, als weitere Ursache für eine septische Prothesenlockerung [Krenn et al. 2013] (Abb. 26).

3.3.2. Histologische Kriterien für die jeweiligen Typen der erweiterten Konsensusklassifikation

In der Einleitung bin ich bereits auf die „erweiterte Konsensusklassifikation der Prothesenpathologie“ eingegangen. Hier möchte ich nun auf die einzelnen diagnostischen Kriterien der Histologie eingehen, nach denen eine Typisierung der vorliegenden Neosynovialitis bzw. periprothetischen Membran erfolgt.

3.3.2.1. Abriebinduzierter Typ (Typ I)

Das Bindegewebe ist durchsetzt von Makrophagen und multinukleären Riesenzellen, wobei sich größere Abriebpartikel von über $5\mu\text{m}^2$ eher in den multinukleären Riesenzellen und kleinere Partikel eher in den Makrophagen befinden [Krenn, Kretzer et al. 2013]. Der Anteil an Makrophagen und multinukleären Riesenzellen sollte zusammen zumindest 20% der Fläche der Membran einnehmen [Morawietz et al. 2004]. Der histologische Befund variiert je nach Quantität, Qualität und Größe der Abriebpartikel. Polyethylenpartikel (PE-Partikel) sind länglich und bizarr geformt. Sie sind bei Anwendung von polarisationsoptischen Methoden stark doppelbrechend. Sie sind darüber hinaus mit Hilfe von Öl-Rot-Färbung darstellbar. Sind die Partikel sehr klein, sind die durch die erläuterte Diagnostik nicht darstellbar und dichte Ansammlungen von Makrophagen, die aufgrund der Öl-Rot-Färbung bläulich schimmern, sind zu erkennen.

Metallische Partikel (z.B. Titan, Eisen, Kobalt, Chrom) stellen sich meist als kleine schwarze scharfkantige Strukturen dar. Größere Partikel können das gesamte Gewebe schwarz verfärben. Nur Eisenpartikel im Sinne von Blutungsresiduen (Hämosiderin) können mit Hilfe einer Berlin-Blau-Reaktion nachgewiesen werden. Hämosiderin kann sich intra- wie auch extrazellulär ablagern.

Größere Knochenzementfragmente (Polymethylmethacrylat, PMMA) werden bei der histologischen Aufarbeitung öfters herausgebrochen. Kleinere Fragmente sind nach Zugabe von Kontrastmittelpartikeln aus Zirkondioxyd darstellbar und dann oft traubenförmig angeordnet [Bos 2001].

Keramikpartikel werden nur selten in periprothetischen Membranen gefunden. Sie weisen variable Größen auf, sie sind doppelbrechend. Charakteristisch ist eine braune bis schwarze Färbung.

Insbesondere feine Abriebpartikel können fibrinoide Nekrosen induzieren. Wenn polarisationsoptische Methoden aufgrund der geringen Größe der Partikel versagen, kann eine Öl-Rot-Färbung hilfreich sein, um die winzigen Partikel in den Nekrosen zu identifizieren. Das Ausmaß der Nekrose sollte durch die prozentuale Angabe der Nekrosefläche an der Gesamfläche angegeben werden. Die Abgrenzung zu Granulomen mit verkäsender Nekrose (Granulom vom Tuberkulose-Typ) ist histopathologisch möglich [Krenn et al 2009].

Die Hypersensitivitätsreaktion (Typ IV-Reaktion) auf Implantatmaterial ist nicht eindeutig geklärt, da es bislang keine sicheren Kriterien gibt, mit denen man eine hypererge periimplantäre Reaktion diagnostizieren kann. Als Hinweis hierfür dienen bislang diffus angeordnete interstitielle perivaskuläre lymphozytäre Infiltrationen [Krenn et al. 2012]. Bei einer stark ausgeprägten lymphozytären Infiltration sollte diese im Zusammenhang mit der beschriebenen Klinik interpretiert werden [Krenn et al. 2013, Krenn et al. 2012, Krenn, Kretzer et al. 2013] .

3.3.2.2. Infektiöser Typ (Typ II)

Die septische Prothesenlockerung entspricht dem histologischen Korrelat der periprothetischen Membran vom Infektiösen Typ.

Histologisch kann zwischen einer Low-Grade-Infektion und einer High-Grade-Infektion unterschieden werden. Bei der Low-Grade-Infektion ist eine uncharakteristische, chronisch granulierende Entzündung mit Fibroblasten, Gefäßproliferationen, einem chronischen Ödem und einem entzündlichen Infiltrat aus neutrophilen Granulozyten, Plasmazellen, Lymphozyten vorzufinden. Bei einer hohen Anzahl neutrophiler Granulozyten im Gewebe lagern diese sich oft zusammen an und bilden dann Mikroabszesse. Vereinzelt sind Makrophagen zu finden [Morawietz et al. 2006, Krenn et al. 2013, Krenn et al. 2012, Krenn et al. 2009].

Die größte diagnostische Bedeutung kommt der Quantität der neutrophilen Granulozyten zu. Die Auszählung lässt sich nach angewandter CD15 Immunhistochemie verbessern. Wie bereits oben beschrieben, gab es lange Zeit keine einheitlichen Diagnosekriterien zur Auszählung der neutrophilen Granulozyten in der periprothetischen Membran. Nach einer veröffentlichten Arbeit von Morawietz et al. wurde der dort veröffentlichte Schwellenwert verwendet. Sind mindestens 23

neutrophile Granulozyten in 10 HPF vorhanden, ist die Diagnose einer periprothetischen Entzündung zu stellen.

3.3.2.3. Kombiniertes Typ, Mischtyp (Typ III)

Bei diesem Typ ist kennzeichnend, dass bei der histologischen Befundung Abriebpartikel sowie entzündliche Veränderungen des Gewebes vorzufinden sind. Es handelt sich hierbei um eine Kombination der Kriterien von Typ I und Typ II der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006, Krenn et al. 2013, Krenn et al. 2012, Krenn et al. 2009].

3.3.2.4. Indifferentes Typ (Typ IV)

Bei diesem Typ ist weder eine nennenswerte Menge an Abriebpartikeln noch eine bedeutende entzündliche Infiltration vorzufinden. Neutrophile Granulozyten sind nur vereinzelt im Bereich der Fibrinauflagerung vorzufinden. Man sieht ein zellarmes, kollagenfaserreiches Bindegewebe. Die Ätiologie dieses Membrantyps ist noch nicht vollständig geklärt. Neben primär mechanischer Instabilität und Fragilität des Implantatlagers wie etwa bei Osteoporose wird eine nicht optimale Implantatposition diskutiert [Morawietz et al. 2006, Krenn et al. 2013, Krenn et al. 2012, Krenn et al. 2009].

3.4. Histopathologische Auswertung:

Durch die histopathologische Auswertung der HE-, PAS- sowie immunhistochemisch-gefärbten Schnitte ist die Unterteilung in die oben aufgeführten Typen der erweiterten Konsensusklassifikation der Endoprothesenpathologie möglich. Für die Fragestellung dieser Arbeit ist insbesondere die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte, in denen CD15 positive Zellen angefärbt werden, von großer Bedeutung.

3.4.1. Histopathologische Auswertung der HE- und PAS-Schnitte

Die HE- und PAS-gefärbten Schnitte werden mittels Durchlichtmikroskopie und mit Hilfe von polarisationsoptischen Methoden analysiert. Zur Beurteilung werden vor allem die Areale herangezogen, bei denen ausgeprägte Veränderungen vorhanden sind.

Analysiert wird Folgendes:

- 1) Allgemein entzündliche Veränderungen (Fibroblasten, Gefäßproliferation) oder nekrotische Veränderungen
- 2) Leukozytäre Infiltrationen. Diese werden, wenn auch nur orientierend, an den PAS-gefärbten Schnitten beurteilt.
- 3) Quantität und Qualität vorhandener Abriebpartikel werden besonders mit polarisationsoptischen Methoden beurteilt. Bei der Quantität erfolgt eine Abstufung folgendermaßen: 0=kein
1=wenig (weniger als 10% des Flächeninhaltes)
2=viel (mehr als 10% des Flächeninhaltes)

3.4.2. Histopathologische Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte

Wie bereits oben beschrieben, ist bei der Fragestellung dieser Arbeit besonders die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte von Bedeutung. Durch die Färbung ist zweifelsfrei die Identifikation von CD15 positiven Zellen möglich, welche rot-bräunlich angefärbt sind. Bei der Auswertung der Schnitte wird zunächst das Areal gesucht, in dem die meisten CD15 positiv gefärbten Zellen vorzufinden sind. Dieses Areal der maximalen Ausprägung wird als Fokus bezeichnet. Die Einstellung des Fokus erfolgt unter Verwendung des 20er Objektivs. Das betrachtete Gesichtsfeld ist somit 200-fach vergrößert (Okularfaktor x Tubusfaktor x Objektiv). Die Auszählung erfolgt mittels digital gestützter interaktiver morphometrischer Analyse unter Verwendung eines Mikroskops der Marke Leica DM2500 nach den Standards microsystems framework 2007. Das am Mikroskop eingestellte Gesichtsfeld wird also auf den PC übertragen und auf dem Bildschirm erfolgt die Auszählung. Das Bildfeld am PC entspricht einem Präparatausschnitt von 0,6 x 0,5 mm (0,3 mm²). Die Ausmessung erfolgt am Bildschirm mittels eines Morphometrieprogramms. Bevor man mit der Auszählung der CD15 positiven Zellen beginnt, ist wichtig, dass das komplette Bildfeld am PC mit Gewebe dargestellt ist. Der Rand des Schnittes darf nicht auf dem Bildfeld zu sehen sein. Des Weiteren ist die richtige Abgrenzung der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten im Gegensatz zu den CD15 positiv Makrophagen von großer Bedeutung. Die neutrophilen Granulozyten weisen eine intensive, grobe granuläre Reaktivität mit einer Überdeckung von Zellkern und Zytoplasma auf. Die Makrophagen sind nicht so intensiv gefärbt wie

die neutrophilen Granulozyten. Sie weisen eine schwächere bräunliche Reaktivität ohne vollkommene Überdeckung von Zellkern und Zytoplasma auf.

Der Auszählungsmodus wurde wie folgt durchgeführt:

Man teilt die Bildschirmfläche in zwei Hälften und zählt bei der ersten Bildschirmhälfte von links oben nach rechts unten die Zellen. Danach werden die Zellen auf der zweiten Bildschirmfläche ausgezählt und die Zellzahlen von beiden Bildschirmhälften werden addiert. Es werden sowohl die intra- wie auch extra-vaskulär lokalisierten neutrophilen Granulozyten in die Auswertung mit einbezogen. Neutrophile Granulozyten, die in Fibrininsudationen und Fibrinpräzipitaten liegen, werden nicht bewertet.

Für die Ermittlung des „CD15 Fokus Score“ wird ein neuer Quantifizierungsmodus angewendet, der hier nochmals zusammengefasst dargestellt wird.

- Mikroskopisches Aufsuchen der maximalen CD15 Infiltration („worst area grading“)
- Mikroskopische Einstellung des Fokus unter Verwendung des 20er Objektivs
- Auszählung mittels digital gestützter Morphometrie (Auszählung am PC: Bildfeld entspricht Größe von 0,6 mm x 0,5 mm / 0,3 mm²)
- Bildfeld völlig mit Gewebe ausgefüllt
- Auszählungsmodus:
Halbierung der Bildschirmflächen. Sequentielle manuelle Auszählung.
- Folgendes wird gezählt:
 - ✓ CD15 positive neutrophile Granulozyten (Zur Differenzierung zu Makrophagen siehe oben.)
 - ✓ Intravaskulär sowie extravaskulär liegende neutrophile Granulozyten (Neutrophile Granulozyten in Fibrininsudationen und Fibrinpräzipitaten werden nicht bewertet.)

3.5. Mikrobiologische Untersuchung

Vor der intraoperativen Entnahme von periprothetischen Gewebekulturen soll eine mögliche Antibiotikagabe mindestens eine Woche präoperativ gestoppt werden [Robert Koch Institut Berlin, 2013]. Auch die intraoperativ verabreichte prophylaktische Antibiotikagabe soll erst nach der Probeentnahme erfolgen. Es sind drei bis maximal

sechs Gewebeproben zu entnehmen. Bei jeder Probe ist ein frisches Instrumentenset zu verwenden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden [Atkins et al. 1998]. Gewebeabstriche sowie Kulturen aus oberflächlichen hautnahen Wunden sollen vermieden werden [Laffer et al. 2006]. Nach der Probeentnahme soll der Transport zum Labor nicht länger als vier Stunden brauchen. Dort werden die Proben bei -70°C gelagert [Caselitz et al. 1969]. Es erfolgt die Inkubation der Proben mit verschiedenen Nährmedien, dem Hirn-Herz-Glucose Agar (brain-heart infusion broth), von bio Mérieux Deutschland, dem TVLS-Medium (halbflüssiges Kombinationsmedium) sowie dem Columbia Blutagar (aerob, 5% CO₂) und dem Brucella Agar (anaerob) [Lodenkämper et al. 1956, Ince et al. 2004]. Die Inkubation der Proben erfolgt für einen Zeitraum von 14 Tagen. Der mikrobiologische Befund gilt als positiv, wenn mindestens bei zwei Proben der gleiche Erreger nachgewiesen werden kann [Zmistowski et al. 2014]. Wird bei nur einer Probe ein Erreger nachgewiesen, gilt der mikrobiologische Befund als negativ [Spanghel et al. 1999]. Organismen derselben Spezies gelten als nicht unterscheidbar, wenn sie die gleiche Koloniemorphologie aufweisen sowie die gleichen biochemischen Eigenschaften besitzen [Atkins et al. 1998].

3.6. Der „CD15-Quantifier“

3.6.1. Softwareentwicklung für den „CD15-Quantifier“

Die Voraussetzung für die automatische Auswertung von digitalen Bildern ist das Zusammenfassen von benachbarten Bildpixeln zu bedeutungsvollen Objekten (z.B. Zellen, Zellkernen), dies nennt man Segmentierung. Für die computergestützte Auswertung von CD15 wurde in Partnerschaft mit der VMscope GmbH (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin) ein kürzlich publiziertes Verfahren auf Basis der *CognitionMaster*-Plattform adaptiert [Wienert et al. 2013]. Dabei wird zunächst das Immuno-Signal (braun) mittels Color Deconvolution aus dem Farbbild extrahiert. In diesem Intensitäts- (bzw. Graustufen-) Bild werden anschließend Objekte (d.h. Zellen) detektiert, wobei hauptsächlich der Intensitäts-Gradient verwendet wird, um die jeweils lokal prominenteste Kontur zu bestimmen, was in etwa der visuellen Wahrnehmung entspricht [Ruifrok et al. 2011]. Abschließend werden die detektierten Zellen mittels eines Schwellwerts in „Zelle“ und „Hintergrund“ klassifiziert

und gezählt. Um die Ergebnisse des „CD15-Quantifiers“ vergleichbar zu machen, muss die Anzahl der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten in irgendeiner Form im Verhältnis zur zugrunde liegenden Fläche gesetzt werden. Bei dieser Problematik orientierte man sich an einem erst vor kurzem durchgeführten Projekt, bei dem Tumor infiltrierende Lymphozyten (TIL) in einer Gewebeprobe histopathologisch unter Anwendung einer Computer gestützten Software untersucht werden [Denkert et al. 2014, Denkert et al. 2010]. Es wurde dort so gelöst, dass der Prozentsatz der Fläche der durch die Lymphozyten belegt ist als Score verwendet wurde. Dabei wird natürlich auch berücksichtigt, dass zwischen den Lymphozyten noch ein Zwischenraum vorhanden sein muss. Es gibt also praktisch ein TILs Score von 100% wenn praktisch die gesamte Fläche mit Lymphozyten ausgefüllt ist und nicht mehr hinpassen würden. Da es sich bei Lymphozyten wie auch bei neutrophilen Granulozyten um Leukozyten handelt scheint der Anwendungsmodus als optimal und wurde deshalb auch für den „CD15-Quantifier“ verwendet.

3.6.2. Anwendung des „CD15 Quantifier“

In Trier wurde mit Prof. Krenn eine Auswahl an Präparaten getroffen, die zur Validierung des „CD15 Quantifiers“ in Berlin bei VMscope GmbH (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin) verwendet wurden. Das Kollektiv enthielt sowohl „einfache“ wie auch „schwierige“ Präparate. Präparate, die einen höheren Schwierigkeitsgrad aufweisen, waren durch folgende Veränderungen gekennzeichnet: technisch bedingte Artefakte wie Schnittdehiszenzen, Spaltraumbildungen, Überlagerung von Schnittpräparatanteilen, unspezifische Hintergrundreaktionen und partielle Ablösung der Gewebeprobe sowie vorhandene Makrophagen. Der Fokus für die manuelle Auszählung der neutrophilen Granulozyten im „CD15-Fokus-Score“ wurde markiert. Bei VMscope GmbH wurde versucht, den exakt gleichen Fokus einzustellen, der bereits zuvor unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores ausgezählt wurde. Dieser wurde fotografiert. Die fotografierten Präparatausschnitte wurden dann mit Hilfe der Software des „CD15 Quantifiers“ ausgewertet. In Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Inf. Stephan Wienert (VMscope GmbH, Charitéplatz 1, 10117 Berlin) wurde die Vorgehensweise des „CD15 Quantifiers“ analysiert und optimiert. Anschließend wurden die Ergebnisse des „CD15-Quantifiers“ sowie die benötigte Zeit in einer Tabelle zusammengefasst.

VMscope wurde ein Trainingsdatensatz, bestehend aus 31 Bildern inklusive Markierungen von zu zählenden Zellen und nicht zu zählenden Zellen, zur Verfügung gestellt.

3.7. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit SPSS 17 (IBM, SPSS, Chicago, USA). Es wurden unter anderem Boxplots erstellt. Die Box entspricht einem Rechteck, das durch den Median zweigeteilt ist. Die beiden äußeren Kanten entsprechen dem ersten und dritten Quartil. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Die Länge der Box entspricht dem Interquartilabstand. Dieser ist ein Maß für die Streuung der Daten. Die Länge der „Whisker“ („Antennen“) werden aus der Länge des Interquartilabstands und aus den Datenwerten bestimmt. Ihre Enden repräsentieren die maximalen und minimalen Werte, die noch zum Datensatz gehören. Alle Werte außerhalb der „Whisker“ werden als Ausreißer bezeichnet. Werte, die mehr als das 1,5-fache des Abstands zwischen Q1 und Q3 von der Boxkante entfernt sind, werden als „milde Ausreißer“ bezeichnet. Bei extremen Ausreißern steigt der Wert auf das 3-fache an.

Zur deskriptiven Statistik wurden Häufigkeiten sowie Mittel-, Median-, Minimal- und Maximalwert, Standardabweichung, Spannweite, oberes und unteres Quartil und der daraus resultierende Interquartilabstand bestimmt. Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten in verschiedenen Kollektiven signifikant ist, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Die Sensitivität wurde als Quotient der Anzahl der durch den Test (CD15 Fokus-Score) richtig positiv erkannten Individuen und der Anzahl der durch den Goldstandard als positiv festgelegten Individuen des Datensatzes bestimmt.

Die Spezifität wurde als Quotient der Anzahl der durch den Test (CD15 Fokus-Score) richtig negativ erkannten Individuen und der Anzahl der durch den Goldstandard als negativ festgelegten Individuen des Datensatzes bestimmt.

Die positiv und negativ prädikativen Werte wurden nach dem Satz von Bayes aus Spezifität und Sensitivität, sowie der Prävalenz berechnet.

Die Accuracy ist der Prozentsatz der durch den Test richtig erkannten Individuen des Datensatzes.

Die ROC (Receiver Operating Characteristics)-Kurve bzw. Grenzwertoptimierungskurve entsteht, indem für jeden möglichen Schwellenwert die Sensitivität des zugehörigen

Tests gegen das Komplement seiner Spezifität aufgetragen wird. Wobei als Komplement einer Spezifität die Zahl $1 - \text{Spezifität}$ bezeichnet wird.

Zur Anwendung der ROC-Kurve muss ein Goldstandard festgelegt werden. In der Medizin wird unter Goldstandard der maßgebende Standard verstanden, der den Grundstock bildet, an dem sich jedes neue Verfahren messen muss [Timmermans et al. 2003]. Die Zahl AUC (area under the curve) bezeichnet den Inhalt der Fläche unter der ROC-Kurve.

Ein Maß für die Güte eines diagnostischen Tests wird unter anderem durch die Summe aus Sensitivität und Spezifität bei dem verwendeten Schwellenwert sowie durch die AUC und Accuracy bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Patientenkollektiv

4.1.1. Alter, Geschlecht und Häufigkeitsverteilung

In der vorliegenden Arbeit wurden 91 Patienten, bei denen ein Endoprothesenversagen des Hüft- oder des Kniegelenks vorlag, für die Studie herangezogen. Bei 47 der Patienten (entspricht 52% am Gesamtkollektiv) wurde durch die Kultivierung der intraoperativ entnommenen Proben ein Keim nachgewiesen.

Bei 29 dieser Patienten wurde ein niedrig virulenter bakterieller Erreger gefunden und bei 14 Patienten wurde ein hoch virulenter bakterieller Erreger für die Infektion verantwortlich gemacht. Dieser hoch virulente Erreger wurde in acht Fällen definitiv nachgewiesen, bei sechs Fällen war der mikrobiologische Befund definitiv positiv und es bestand der Verdacht auf einen hoch virulenten bakteriellen Erreger. Bei den restlichen vier Patienten mit einer positiven Mikrobiologie wurden zwei bakterielle Erreger nachgewiesen, es handelt sich um Mischinfektionen. Die Probeentnahme stammt in 60% (n=28) aus dem Hüft- und in 40% (n=19) aus dem Kniegelenk. Von den Patienten mit einem positiven mikrobiologischen Befund sind 49% (n=23) weiblichen und 51% (n=24) männlichen Geschlechts.

Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs 67 Jahre (45-88 Jahre). Die Prothesenstandzeit konnte in nur 12 Fällen ermittelt werden und beträgt im Durchschnitt fünf Jahre. Die minimal erfasste Standzeit beträgt sechs Monate, die maximal erfasste Standzeit 13 Jahre.

Das Vergleichs-Kollektiv setzt sich aus 44 Patienten (entspricht 48% am Gesamtkollektiv) zusammen. Bei diesen Patienten konnte durch die Kultivierung der intraoperativ entnommenen Proben kein Erreger nachgewiesen werden, der mikrobiologische Befund ist somit negativ. Die Gewebeprobe stammt in 70% (n=31) aus dem Hüft- und in 30% (n=13) aus dem Kniegelenk. 43% (n=19) der Patienten sind weiblichen und 57% (n=25) der Patienten sind männlichen Geschlechts.

Das mittlere Alter dieser Patienten betrug zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs 67 Jahre (47-84 Jahre). Die Prothesenstandzeit konnte hier bei nur zwei Patienten ermittelt werden und beträgt im Durchschnitt neun Jahre.

4.2. Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten in der immunhistochemischen Auswertung bei mikrobiologisch positivem und negativem Befund.

4.2.1 Deskriptive Statistik, Mittelwerte

Bei der histologischen Begutachtung der periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden des Patientenkollektivs mit einem positiven mikrobiologischen Befund (n=47) wurden im Durchschnitt 112,5 CD15 positive neutrophile Granulozyten pro Fokus gefunden. Bei den Patienten des Kontroll-Kollektivs (n=44), bei denen der mikrobiologische Befund negativ war, wurden bei der histopathologischen Auswertung der periprothetischen Membranen im Durchschnitt 21,9 CD15 positive neutrophile Granulozyten pro Fokus gezählt (Abbildung 6). Die Differenz der durchschnittlichen Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus zwischen den beiden Kollektiven beträgt 91.

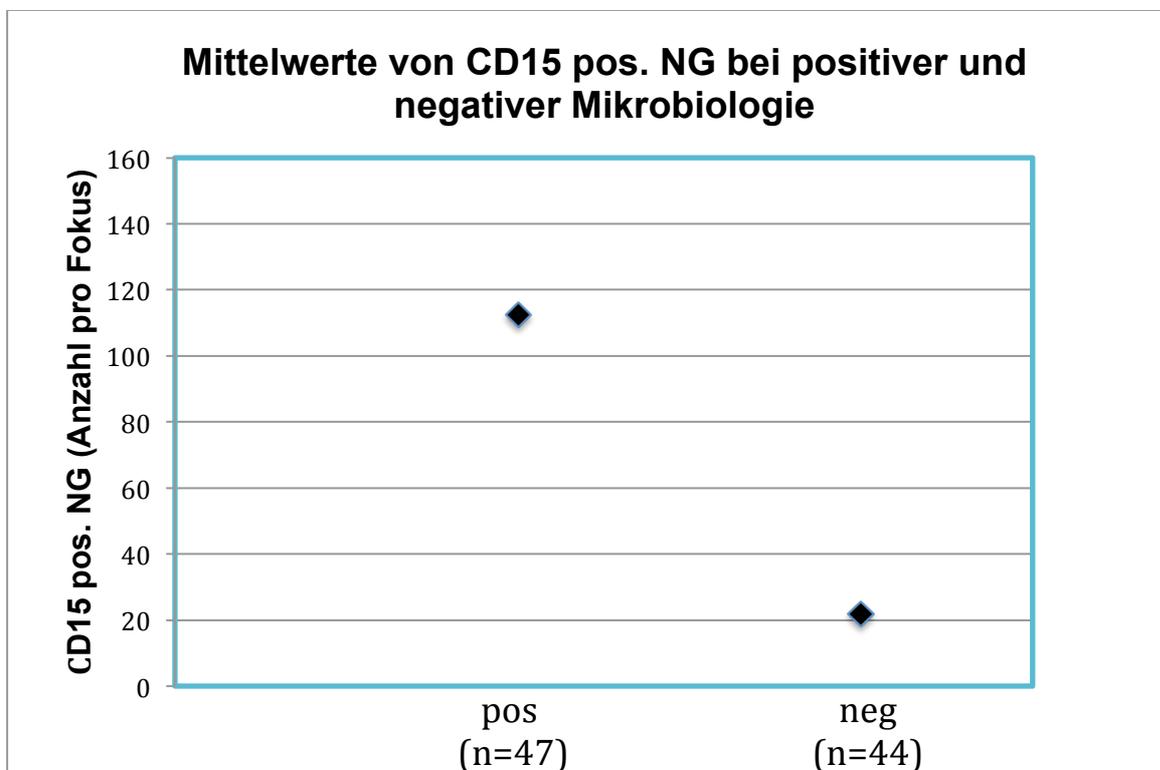


Abbildung 6: Mittelwerte von CD15 positiven neutrophilen Granulozyten bei positivem und negativem mikrobiologischen Befund.

4.2.2. Deskriptive Statistik, Boxplots

Die deskriptive statistische Auswertung ergibt einen höchst signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$ Mann-Whitney-U-Test) zwischen den beiden Patientenkollektiven, bezogen auf die Anzahl der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus, die mittels digital gestützter Morphometrie ausgezählt wurden. In den periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden des Patientenkollektivs mit einem positiven mikrobiologischen Befund ($n=47$) wurden somit signifikant ($p < 0,0001$ Mann-Whitney-U-Test) mehr CD15 positive neutrophile Granulozyten pro Fokus detektiert als in den periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden des Kontroll-Kollektivs ($n=44$).

Bei den Patienten mit einem positiven mikrobiologischen Befund (Abbildung 7, linke Box) ist der Interquartilabstand mit 108,0 sowie die Spannweite mit 289,0 größer als bei den Patienten des Kontroll-Kollektivs (Abbildung 7, rechte Box). Beim Kontroll-Kollektiv beträgt der Interquartilabstand 23,75 und die Spannweite 125.

Der Median trennt den Datensatz der Patienten mit positivem mikrobiologischen Befund innerhalb der Box nicht symmetrisch. Der größere Teil des Datensatzes in der Box liegt im oberen Quartil, der geringere Teil des Datensatzes liegt im unteren Quartil. Für das Kontroll-Kollektiv gilt das gleiche.

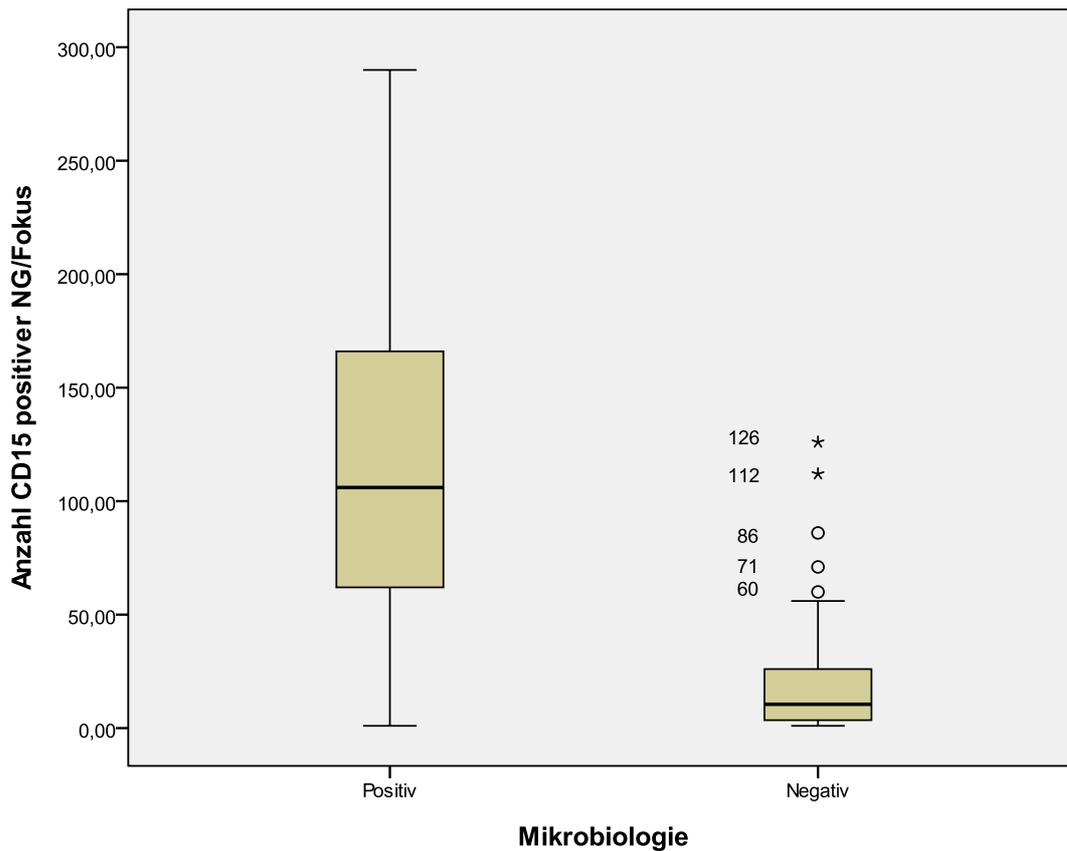


Abbildung 7: CD15 positive neutrophile Granulozyten bei positivem und negativem mikrobiologischem Befund (Boxplots)

Bei dem linken Boxplot sind keine Ausreißer vorhanden, dort entsprechen Maximal- und Minimalwert dem Ende der „Whisker“. Die Grenzwerte sind in Tabelle 1 dargestellt. Bei dem rechten Boxplot (Kontroll-Kollektiv) sind drei „milde“ und zwei „extreme“ Ausreißer nach oben zu sehen. Die Beschriftung der Ausreißer gibt die Anzahl der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten an. Die Ausreißer sind tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 2).

Ein-gangs-nummer	Ge-schl.	Alter	Loka-lisation	Histopathologischer a)Bericht b)Nachbericht	Mikro-biologischer Befund	CD15 Fokus-Score
H/13/10476	m	54	Hüft-TEP	a)Typ III b)CD15 pos. Zellen, 10 HPF ≤ 23NG	In 2 von 5 Proben pos. auf Propionibacterium acnes	1
H/13/25931	w	74	Knie-TEP	a)Typ IV b)CD15 pos. Zellen, 10 HPF ≤ 23NG	Staph. epidermidis	3
H/13/50441	m	67	Knie-TEP	a)Typ I b)CD15 pos. Zellen, 10 HPF ≤ 23NG	Staph. epidermidis, Moraxella osloensis	7
H/13/19672	w	73	Hüft-TEP	a)Typ II b)CD15 pos. Zellen, 10 HPF ≤ 23NG	Staph. haemolyticus	3

Tabelle 1: „Randwerte“ bei dem Kollektiv mit positivem mikrobiologischen Befund

Ein-gangs-nummer	Ge-schl.	Alter	Loka-lisation	Histopathologischer a)Bericht b)Nachbericht	Mikro-biologischer Befund	CD15 Fokus-Score
H/13/74533	m	70	Hüft-TEP	a)Typ III b)CD15 pos. Zellen, pro 10 HPF: 60	negativ	86
H/13/46618	w	57	Hüft-TEP	a)Typ III b)CD15 pos. Zellen, pro 10 HPF: 40	negativ	60
H/13/63200	m	73	Knie-TEP	a)Typ III b)CD15 pos. Zellen, pro 10 HPF: 50	negativ	126
H/13/27761	m	80	Hüft-TEP	a)Typ I b)CD15 pos. Zellen, 10 HPF ≤ 23NG	negativ	71
H/13/21093	m	75	Hüft-TEP	a)Typ II a)Typ II b)CD15 pos. Zellen, 10 HPF ≥ 23NG	negativ	112

Tabelle 2: Ausreißer bei dem Kollektiv mit negativem mikrobiologischen Befund

Die deskriptive statistische Auswertung (siehe Tabelle 3) ergab bei der Patientengruppe mit positiver Mikrobiologie (n=47) einen Medianwert von 112,5, die Standardabweichung beträgt 72,9. Der Wert für das obere Quartil beträgt 167, der für das untere 59. Der Maximalwert beträgt 290, der Minimalwert 1. Bei den restlichen Patienten (n=44), bei denen der mikrobiologische Befund negativ war, beträgt der Medianwert 10,5, die Standardabweichung 29,3. Der Wert für das obere Quartil beträgt 167 und der für das untere Quartil 3,3. Der Maximalwert beträgt 126, der Minimalwert 1.

Mikrobiologischer Befund	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Min.	Max.	oberes Quartil	unteres Quartil	n
positiv	112,5	72,9	106,0	1,0	290,0	167,0	59,0	47
negativ	21,9	29,3	10,5	1,0	126,0	27,0	3,3	44

Tabelle 3: Deskriptive Statistik bei positivem und negativem mikrobiologischen Befund

4.3. Anzahl der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten in der immunhistochemischen Auswertung nach den Kriterien der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006, 2009]

4.3.1. Kollektivbeschreibung und Kollektivdefinition

Das oben beschriebene Gesamtkollektiv wurde histologisch gemäß der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2009, Krenn et al. 2013] begutachtet und in zwei Kollektive eingeteilt, die auf der histopathologischen Diagnose basieren. Für diese Untersuchung wurden Typ II und Typ III der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006, 2009, Krenn et al. 2013] zu einem Kollektiv zusammengefasst, das histopathologisch als positiv für eine Infektion gilt. Typ I und Typ IV der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006, Krenn et al. 2013] sind histopathologisch negativ für eine Infektion.

Das Kollektiv, welches histopathologisch als positiv für eine Infektion gilt, setzte sich aus 48 Patienten (53% des Gesamtkollektivs) zusammen, bei denen in den periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden entzündliche Veränderungen gefunden

wurden. Bei 32 dieser Patienten (35%) wurde eine periprothetische Membran vom infektiösen Typ (Typ II) diagnostiziert. Bei 16 Patienten (18%) lag eine periprothetische Membran vom Kombinierten Typ (Typ III) vor. Die Gewebeprobe stammt in 67% (n=32) aus dem Hüft- und in 33% (n=16) aus dem Kniegelenk. 46% (n=22) der Patienten sind weiblichen und 54% (n=26) der Patienten sind männlichen Geschlechts. Das mittlere Alter dieser Patienten betrug zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs 67 Jahre. Bei elf Patienten konnte eine Prothesenstandzeit ermittelt werden, sie beträgt im Durchschnitt etwa fünf Jahre. Die minimal erfasste Standzeit beträgt sechs Monate, die maximal erfasste Standzeit 13 Jahre.

Das Kollektiv, das histopathologisch als negativ für eine Infektion gilt, besteht aus 43 Patienten (47% des Gesamtkollektivs). Bei der Untersuchung der periprothetischen Membranen wurden keine entzündlichen Veränderungen gefunden. Bei 30 dieser Patienten (33%) wurden die periprothetischen Membranen histologisch als Abriebinduzierter Typ (Typ I) klassifiziert. Bei den verbleibenden 13 Patienten (14%) lag eine periprothetische Membran vom Indifferenten Typ (Typ IV) vor. Die Gewebeprobe stammt in 63% (n=27) aus dem Hüft- und in 37% (n=16) aus dem Kniegelenk. 47% (n=20) der Patienten sind weiblichen und 53% (n=23) der Patienten sind männlichen Geschlechts. Das mittlere Alter dieser Patienten betrug zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs 67 Jahre. Bei drei der Patienten konnte die Prothesenstandzeit ermittelt werden, sie beträgt im Durchschnitt etwa sechs Jahre. Die minimal erfasste Standzeit beträgt ein Jahr, die maximal erfasste Standzeit beträgt 14 Jahre.

4.3.2. Deskriptive Statistik, Mittelwerte

Bei der histopathologischen Begutachtung der periprothetischen Membranen/ Neosynovialitiden der Typen II und III werden im Durchschnitt 117,2 CD15 positive neutrophile Granulozyten pro Fokus gefunden. Bei den Typen I und IV, die als Kontroll-Kollektiv gelten, sind es im Durchschnitt 14,2 CD15 positive neutrophile Granulozyten pro Fokus (Abbildung 8). Bei dem Patientenkollektiv mit einer periprothetischen Membran vom Typ II oder III sind im Durchschnitt etwa 103 mehr CD15 positive neutrophile Granulozyten pro Fokus gezählt worden als bei den Patienten, bei denen die histopathologische Untersuchung einen Typ I oder Typ IV nach den Kriterien der Konsensusklassifikation definierte.

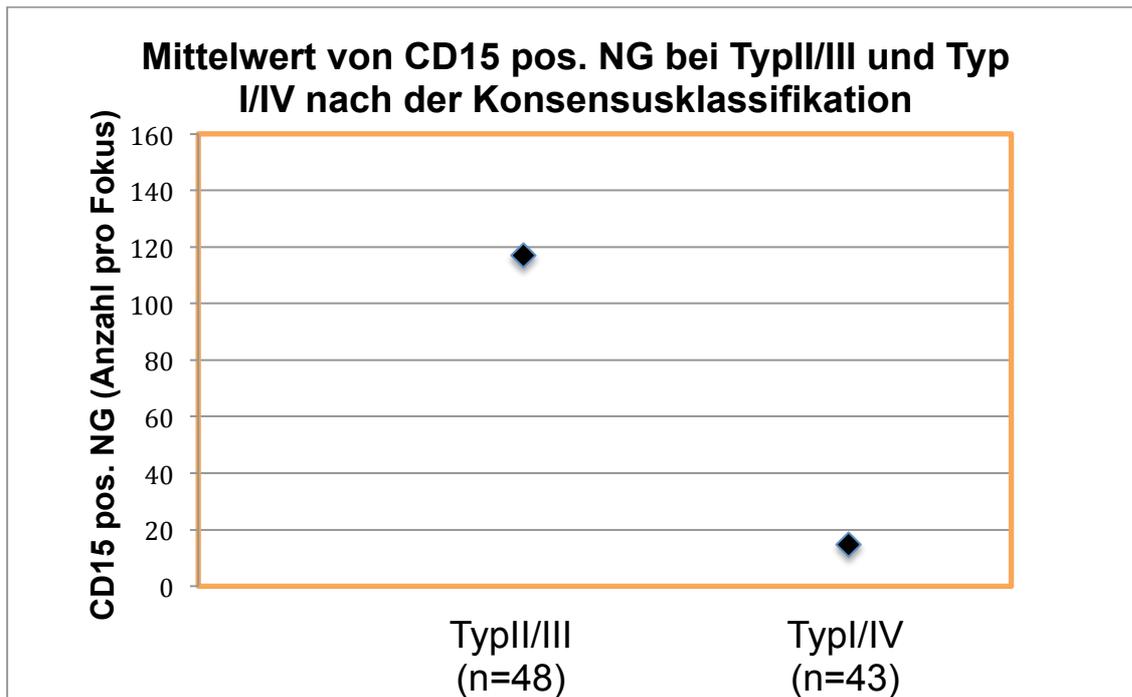


Abbildung 7: Mittelwerte von CD15 positiven neutrophilen Granulozyten bei Kollektiven, die histopathologisch positiv und negativ für eine Infektion sind

4.3.3. Deskriptive Statistik, Boxplots

Bei der morphometrisch gestützten Auszählung besteht ein höchst signifikanter Unterschied ($p < 0,001$ Mann-Whitney-U-Test) bei der Anzahl an CD15 positiven Granulozyten pro Fokus zwischen den periprothetischen Membranen/ Neosynovialitiden der Typen II/III ($n=48$) im Vergleich zu den periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden der Typen I/IV ($n=43$). In den periprothetischen Membranen/ Neosynovialitiden vom Typ II/III ($n=48$) sind höchst signifikant ($p < 0,001$ Mann-Whitney-U-Test) mehr CD15 positive neutrophile Granulozyten pro Fokus vorhanden als bei den periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden der Typen I und IV ($n=43$).

Betrachtet man die beiden Boxplots, die zu den Kollektiven erstellt wurden, so sieht man, dass bei den Patienten der Typen II/III (Abbildung 9, linke Box) der Interquartilabstand mit 101,2, sowie die Spannweite mit 289 größer ist als bei den Patienten der Typen I/IV (Abbildung 9, rechte Box). Bei den zuletzt genannten Typen beträgt der Interquartilabstand 15, die Spannweite 70.

Der Median trennt in der linken Box (TypII/TypIII) oberes und unteres Quartil in zwei fast symmetrische Hälften. Ein größerer Teil des Datensatzes befindet sich im oberen Quartil und ein etwas geringerer Teil des Datensatzes im unteren Quartil. Für den rechten Boxplot (Typ I/TypIV) gilt das gleiche.

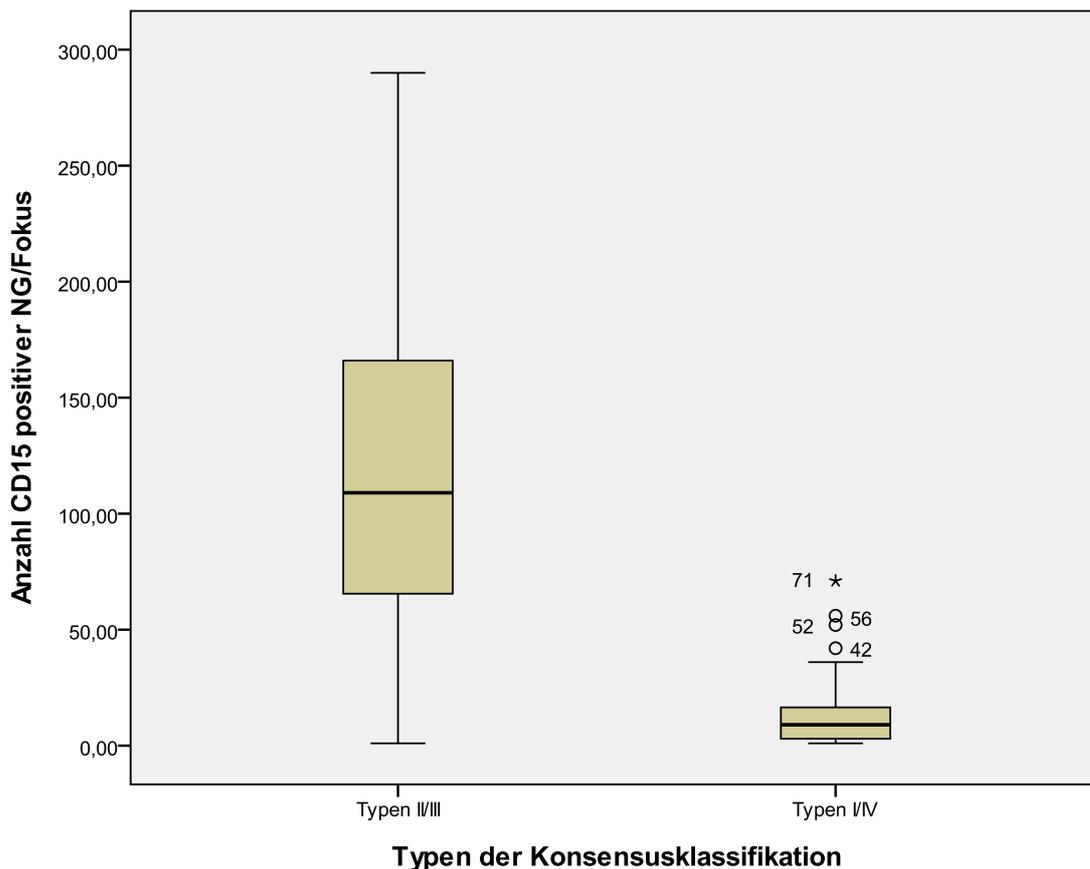


Abbildung 8: CD15 positive neutrophile Granulozyten bei Kollektiven, die histopathologisch positiv und negativ für eine Infektion sind (Boxplot)

Bei dem rechten Boxplot (Kontroll-Kollektiv) sind drei „milde“ und ein extremer Ausreißer nach oben zu sehen. Diese Ausreißer sind in Tabelle 4 aufgeführt. Bei dem linken Boxplot sind keine Ausreißer vorhanden, dort entsprechen Maximum und Minimum dem Ende der „Whisker“.

Ein- gangs- nummer	Ge- schl.	Alter	Loka- lisation	Histopathologischer a)Bericht b)Nachbericht	Mikro- biologischer Befund	CD15 Fokus- Score
H/13/ 71745	w	60	Knie- TEP	a)Typ I b)CD15 pos. Zellen, pro 10 HPF: 20	Propionibac- terium acnes	52
H/12/ 27761	m	80	Hüft- TEP	a))Typ I b)CD15 pos. Zellen, 10 HPF ≤ 23NG	negativ	71
H/13/ 27232	w	57	Knie- TEP	a)Typ I b)CD15 pos.Zellen, 10 HPF≤23 NG	negativ	42
H/13/ 59184	m	66	Hüft- TEP	a)Typ I b)CD15 pos. Zellen, 10 HPF ≤ 23NG	negativ	56

Tabelle 4: Ausreißer bei dem Kollektiv, das histopathologisch als negativ für eine Infektion gilt

Die deskriptive statistische Auswertung (siehe Tabelle 5) ergibt bei der Patientengruppe Typ II/III (n=48) einen Medianwert von 109,0 die Standardabweichung beträgt 68,3. Der Wert für das obere Quartil beträgt 166,5, der für das untere Quartil 65,3. Der Maximalwert beträgt 290, der Minimalwert 1.

Bei den restlichen Patienten, bei denen histopathologisch ein Typ I oder IV diagnostiziert wurde (n=43), beträgt der Medianwert 9,0, die Standardabweichung 16,3. Der Wert für das obere Quartil beträgt 18,0 und der für das untere Quartil 3,0. Der Maximalwert beträgt 71, der Minimalwert 1.

„Konsensus- klassifikation“	Mittel- wert	Standard- abweichung	Median	Min.	Max.	oberes Quartil	unteres Quartil	n
Typen II und III	117,2	68,3	109,0	1,0	290,0	166,5	65,3	48
Typen I und IV	14,7	16,3	9,0	1,0	71	18,0	3,0	43

Tabelle 5: Deskriptive Statistik bei Kollektiven, die histopathologisch positiv und negativ für eine Infektion sind

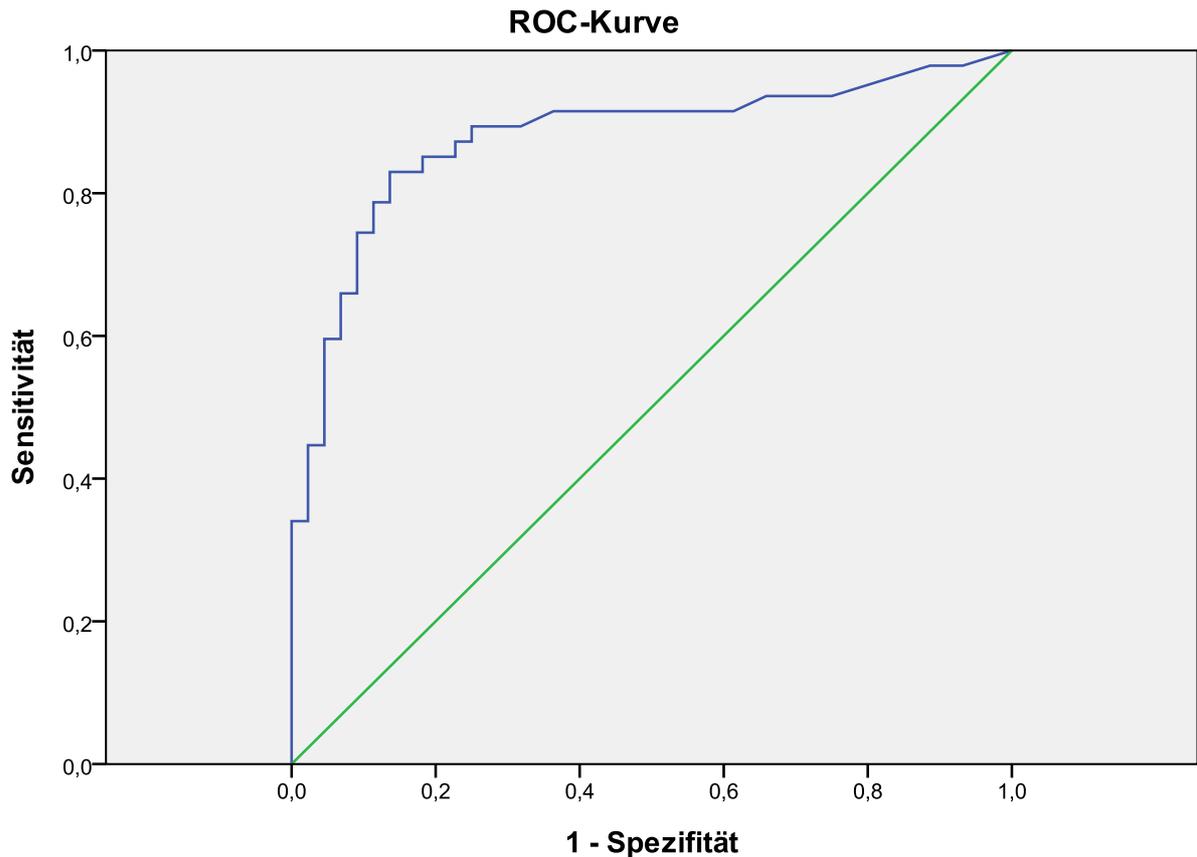
4.4. Grenzwertermittlung. Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus, um einen periprothetischen Gelenkinfekt zu diagnostizieren.

4.4.1. Mikrobiologie als Goldstandard

Zur Ermittlung der diagnostischen Wertigkeit des CD15-Fokus-Scores unter Verwendung eines Schwellenwertes bei der Diagnosestellung des periprothetischen Gelenkinfekts wurde zunächst die Mikrobiologie als Goldstandard herangezogen. Bei der Berechnung des Schwellenwertes werden keine Werte, wie etwa Ausreißer ausgeschlossen. Der volle Datensatz (n=91) wurde zur Untersuchung herangezogen. (Kollektivbeschreibung siehe oben unter Überschrift 4.1.)

Im Folgenden sind alle aus unserem Kollektiv stammenden Schwellenwerte und die damit verbundenen Sensitivitäten und Spezifitäten, einen periprothetischen Spätinfekt zu diagnostizieren, in einer ROC-Kurve dargestellt (Abbildung 10). Je höher der Grenzwert gewählt wird, umso höher ist die Spezifität und umso geringer ist die Sensitivität. Bei einem hoch gewählten Schwellenwert, wie z.B. 100 CD15 positiven neutrophile Granulozyten, beträgt die Sensitivität 0,55 (55%) und die Spezifität 0,96 (96%) für das Diagnostikum. Wählt man beispielsweise 30 CD15 positiven neutrophile Granulozyten als Grenzwert, beträgt die Sensitivität 0,87 (87%), die Spezifität 0,77 (77%). Die maximale Summe aus Sensitivität und Spezifität ergibt sich bei einem Schwellenwert von 50 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus. Die Sensitivität beträgt dann 0,83 (83%) und die Spezifität 0,864 (86%). Die Summe aus beiden beträgt 1,694. Der positiv prädikative Wert beträgt 0,87 und der negativ prädikative Wert 0,83 (Tabelle 6).

Die Accuracy beträgt 0,846, die AUC (area under the curve) beträgt 0,878.



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

Abbildung 9: ROC-Kurve mit Mikrobiologie als Goldstandard

4.4.2. Die histopathologischen Kriterien der Konsensusklassifikation [Morawietz et al 2006] als Goldstandard

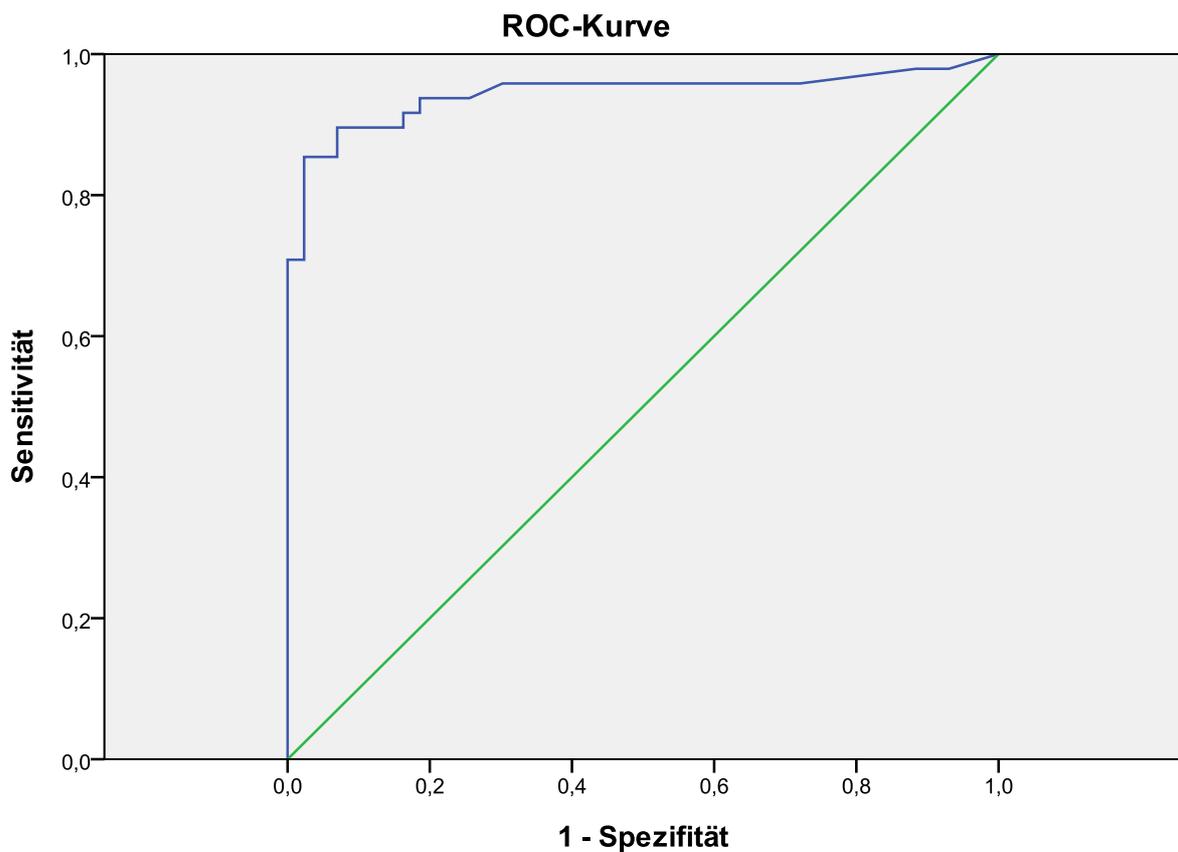
Zur Ermittlung der diagnostischen Wertigkeit des „CD15-Fokus-Scores“ unter Verwendung eines Schwellenwertes bei der Diagnosestellung des periprothetischen Gelenkinfekts wurden hier die Kriterien der Konsensusklassifikation [Morawitz et al. 2009] als Goldstandard herangezogen. (Kollektivbeschreibung siehe oben unter Überschrift 4.3.)

Im Folgenden sind alle möglichen Schwellenwerte und die damit verbundenen Sensitivitäten und Spezifitäten, einen periprothetischen Spätinfekt zu diagnostizieren, in einer ROC-Kurve dargestellt. Definiert man einen Schwellenwert mit den Kriterien der Konsensusklassifikation als Goldstandard, so ist die Summe aus Sensitivität und

Spezifität bei einem Schwellenwert von 57 am höchsten. Die Sensitivität beträgt 0,854 (85%), die Spezifität 0,977 (98%) und die Summe aus beiden beträgt 1,83.

Der oben als optimal ermittelte Schwellenwert von 50 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten weist hier eine Sensitivität von knapp 0,875 (88%) und eine Spezifität von 0,93 (93%) auf. Die Summe aus Sensitivität und Spezifität beträgt 1,805 (Tabelle 6).

Die Accuracy beträgt 0,901, die AUC beträgt 0,944.



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

Abbildung 10: ROC-Kurve mit Histopathologie als Goldstandard

Anzahl an CD15 pos. NG	Sensitivität	Spezifität	Positiv prädikativer Wert	Negativ prädikativer Wert	Summe aus Sens.+ Spez.
50 (Mikrobio.als GS)	0,83	0,864	0,87	0,83	1,694
50 (Konsensus. als GS)	0,875	0,93	0,93	0,87	1,805

Tabelle 6: Deskriptive Statistik bei 50 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten als Grenzwert für einen periprothetischen Infekt

4.5. Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten in der immunhistochemischen Auswertung bei einem unterschiedlichen bakteriellen Erregerspektrum

4.5.1. Kollektivbeschreibung

Für diese Untersuchung wurden die periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden von dem oben genannten Patientenkollektiv mit einem positiven mikrobiologischen Befund herangezogen. Dieses Kollektiv wurde nochmals in zwei Kollektive eingeteilt. Bei 14 (33%) der Patienten wurde durch die Kultivierung der intraoperativ entnommenen Probe ein hoch virulenter bakterieller Erreger nachgewiesen, bzw. es bestand Verdacht auf einen hoch virulenten bakteriellen Erreger. Die Probeentnahme stammt in 43% (n=6) aus dem Hüft- und in 57% (n=8) aus dem Kniegelenk. Bei diesem Kollektiv sind 50% (n=7) weiblichen und 50% (n=7) männlichen Geschlechts. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs etwa 71 Jahre. Die Prothesenstandzeit konnte bei fünf Patienten ermittelt werden und beträgt im Durchschnitt ein Jahr und sechs Monate. Die minimal ermittelte Standzeit beträgt 6 Monate, die maximale ermittelte Standzeit beträgt drei Jahre.

Das Vergleichs-Kollektiv setzt sich aus 29 Patienten zusammen. Dies entspricht 67% des Gesamtkollektivs. Bei diesen Patienten wurde durch die Kultivierung der intraoperativ entnommenen Probe ein niedrig virulenter bakterieller Erreger nachgewiesen.

In 66% (n=19) wurde die Probe aus dem Hüft- und in 34% (n=10) aus dem Kniegelenk entnommen. 45% (n=13) sind weiblichen und 55% (n=16) sind männlichen Geschlechts. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs etwa 67 Jahre. Die Prothesenstandzeit konnte bei sechs Patienten ermittelt werden und beträgt im Durchschnitt etwa 8 Jahre. Die minimal ermittelte Standzeit beträgt ein Jahr, die maximal ermittelte Standzeit beträgt 13 Jahre. Isolierte und klar definierte Erreger, die kultiviert werden konnten, sind in Tabelle 7 dargestellt. Zu diesen Erregern kommen sechs weitere Fälle hinzu, bei denen der mikrobiologische Befund definitiv positiv ist und der Verdacht auf einen hoch virulenten bakteriellen Erreger vorliegt.

Hoch virulente bakterielle Erreger				
Gattung	Bsp. aus dieser Arbeit	Gram-Färbung	Aerob/Anaerob	Mittelwert an CD15 pos. NG/Fokus
Koagulase-positive Staphylokokken	<i>Staphylococcus aureus</i>	gram +	fakultativ anaerob	105 (n=1)
Streptokokken	<i>Streptokokken der Gruppe A</i>	gram +	fakultativ anaerob	135 (n=1)
Enterokokken	<i>Enterococcus faecalis</i>	gram+	fakultativ anaerob	157 (n=2)
Enterobabacter	<i>E. coli</i>	gram -	fakultativ anaerob	161 (n=3)
Gamella	<i>Gamella haemolysans</i>	gram +	fakultativ anaerob	212 (n=1)
Niedrig virulente bakterielle Erreger				
Koagulase-negative Staphylokokken	<i>Staph. epidermidis</i> <i>Staph. capitis</i> <i>Staph. caprae</i> <i>Staph. haemolysans</i>	gram +	fakultativ anaerob	95 (n=22)
Propionibakterien	<i>Propionibacterum acnes</i>	gram +	anaerob	50 (n=5)
Korynebakterien		gram +	fakultativ anaerob	65 (n=1)
Bazillus	<i>Bacillus pumilus</i>	gram +	aerob	36 (n=1)

Tabelle 7: Hoch und niedrig virulente bakterielle Erreger

4.5.2. Deskriptive Statistik, Mittelwerte

Bei der histopathologischen Begutachtung der periprothetischen Membranen /Neosynovialitiden des Patientenkollektivs, bei denen ein hoch virulenter bakterieller Erreger (n=14) definitiv nachgewiesen wurde bzw. der Verdacht darauf bestand, beträgt der Durchschnitt an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus 168,4. Bei dem Kontroll-Kollektiv (n=29), bei dem niedrig virulente bakterielle Erreger nachgewiesen wurden, sind es im Durchschnitt 84,1 CD15 positive neutrophile Granulozyten pro Fokus. Die Differenz der Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus zwischen den beiden Kollektiven beträgt 84,3 (Abbildung 12).

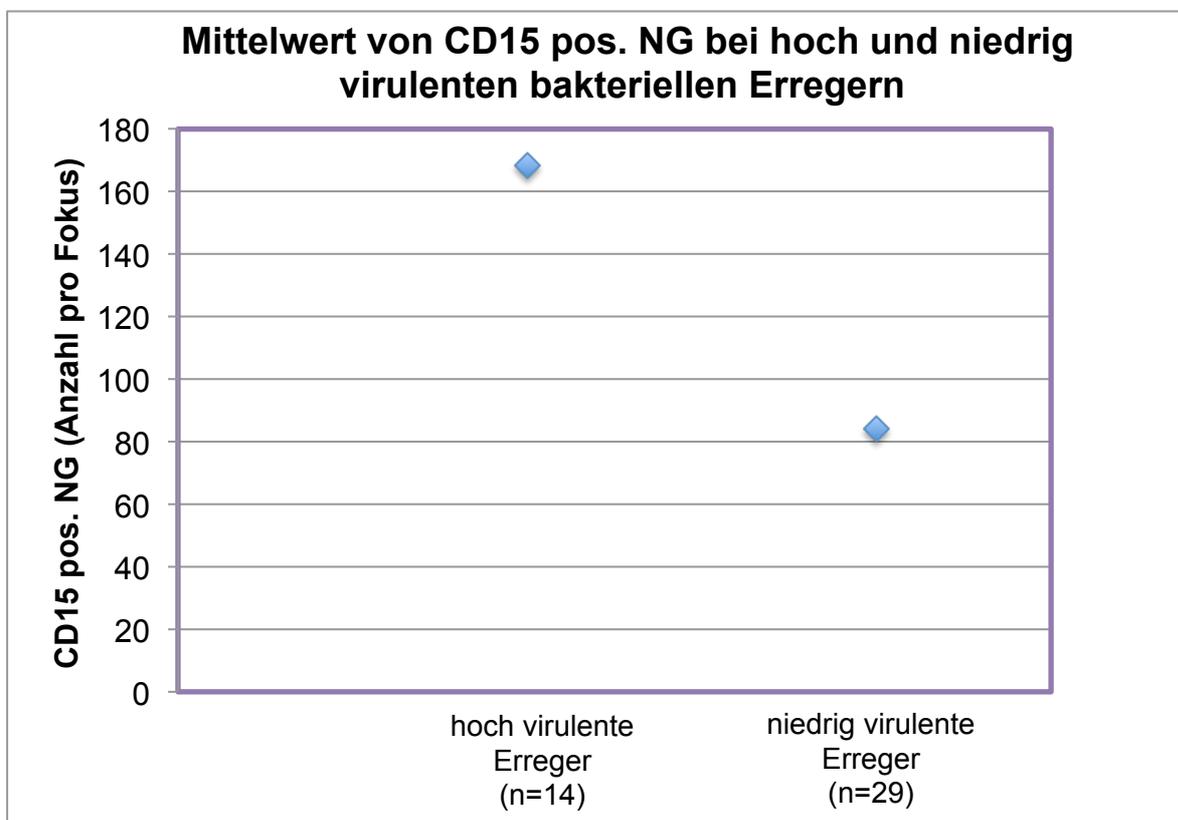


Abbildung 11: Anzahl von CD15 positiven neutrophilen Granulozyten bei hoch und niedrig virulenten bakteriellen Erregern

4.5.3. Deskriptive Statistik, Boxplots

Die deskriptive statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$ Mann-Whitney-U-Test) bei der morphometrisch gestützten quantitativen Auszählung von CD15 positiven Granulozyten pro Fokus zwischen den beiden Kollektiven. In den periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden des Kollektivs, bei denen ein hoch virulenter bakterieller Erreger vermutet bzw. nachgewiesen wurde ($n=14$), weisen signifikant ($p < 0,001$ Mann-Whitney-U-Test) mehr CD15 positive neutrophile Granulozyten pro Fokus auf als die periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden des Kontroll-Kollektivs ($n=29$), bei denen niedrig virulente bakterielle Erreger isoliert wurden.

Bei dem Kollektiv mit hoch virulenten bakteriellen Erregern (Abbildung 13, linker Boxplot) ist der Interquartilabstand mit 97,3 größer als bei dem Kontrollkollektiv, welches einen Interquartilabstand von 78,0 aufweist. Die Spannweite ist jedoch bei dem Kontrollkollektiv (niedrig virulente bakterielle Erreger, Abbildung 13, rechter Boxplot) mit 252,0 größer als bei dem Kollektiv mit hoch virulenten bakteriellen Erregern, bei welchem die Spannweite 145,0 beträgt.

Betrachtet man die Lage des Medians der beiden Boxplots, so fällt auf, dass die Verteilung des Datensatzes innerhalb der Box nicht symmetrisch ist. Der größere Teil des Datensatzes der hoch virulenten bakteriellen Erreger liegt im unteren Quartil, der größere Teil des Datensatzes der niedrig virulenten Erreger liegt im oberen Quartil. Bei dem linken Boxplot ist ein „extremer“ Ausreißer nach oben zu sehen. Die Beschriftung der Ausreißer gibt die Anzahl der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten an. Diese periprothetische Membran/Neosynovialitis wurde aus dem Hüftgelenk einer 77-jährigen weiblichen Patientin entnommen. Die mikrobiologische Kultivierung ergab eine Besiedlung mit *Staphylococcus epidermidis*. Im CD15-Fokus-Score wurden 253 neutrophile Granulozyten gezählt.

Bei dem rechten Boxplot sind keine Ausreißer vorhanden, dort entsprechen Maximal- und Minimalwert dem Ende der „Whisker“.

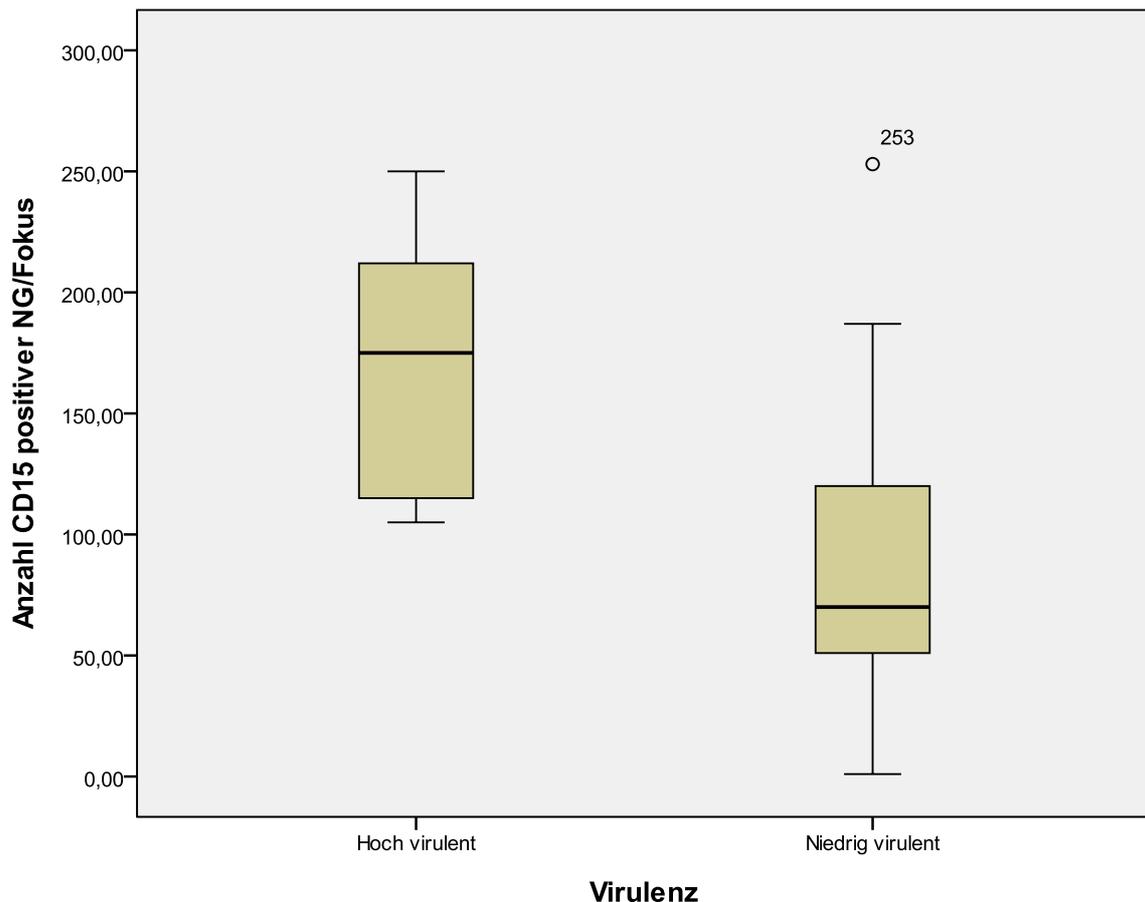


Abbildung 12: CD15 positive neutrophile Granulozyten bei hoch und niedrig virulenten bakteriellen Erregern

Die deskriptive statistische Auswertung (siehe Tabelle 8) ergibt bei dem Patientenkollektiv mit hoch virulenten bakteriellen Erregern (n=14) einen Medianwert von 175,0, die Standardabweichung beträgt 50,1. Der Wert des oberen Quartils beträgt 212,3, der des unteren Quartils beträgt 115,0. Der Maximalwert beträgt 250, der Minimalwert 105.

Bei dem Kontroll-Kollektiv mit niedrig virulenten bakteriellen Erregern (n=29) beträgt der Medianwert 70,0, die Standardabweichung 60,3. Der Wert für das obere Quartil beträgt 121,5 und der für das untere Quartil 43,5. Der Maximalwert beträgt 253, der Minimalwert 1.

Virulenz der Erreger	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Min.	Max.	oberes Quartil	unteres Quartil	n
hoch	168,4	50,1	175,0	105,0	250,0	212,3	115,0	14
niedrig	84,1	60,3	70,0	1,0	253,0	121,5	43,5	29

Tabelle 8: Deskriptive Statistik bei hoch und niedrig virulenten bakteriellen Erregern

4.6. Grenzwertermittlung. Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus, um hoch virulente von niedrig virulenten bakteriellen Erregern zu unterscheiden.

4.6.1. Kollektivbeschreibung

Zur Ermittlung des Schwellenwertes wurden die Kollektive wie oben beschrieben zur Untersuchung herangezogen. Ausreißer wurden nicht ausgeschlossen.

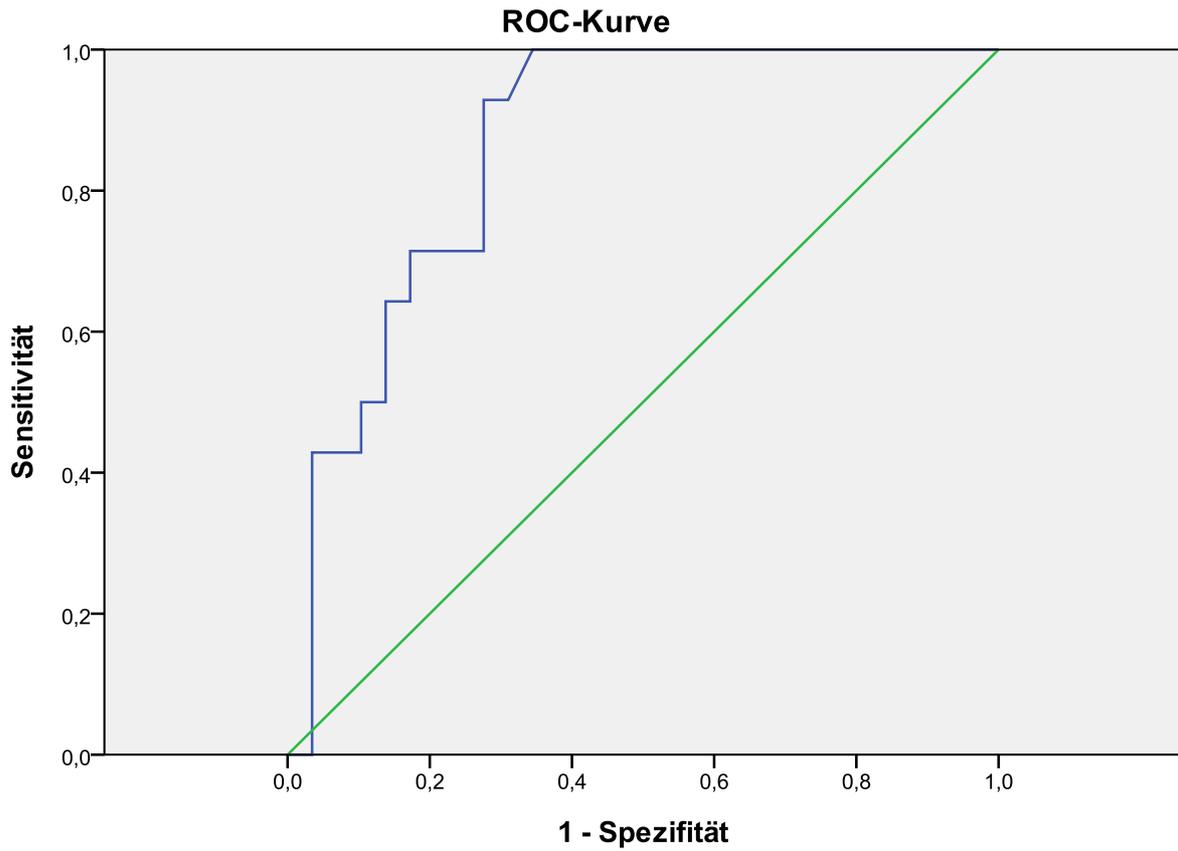
Zur Ermittlung eines Schwellenwertes, um unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores zwischen hoch und niedrig virulenten bakteriellen Erregern zu unterscheiden, wurde die Einteilung der Kollektive nach der Virulenz als Goldstandard herangezogen.

(Kollektivbeschreibung siehe 4.4.)

Im Folgenden sind alle möglichen Schwellenwerte und die damit verbundenen Sensitivitäten und Spezifitäten, einen periprothetischen Infekt zu diagnostizieren, in einer ROC-Kurve dargestellt. Je höher der Grenzwert gewählt wird, umso höher ist die Spezifität und umso geringer ist die Sensitivität. Bei einem hoch gewählten Grenzwert, wie z.B. 176 CD15 positiven NG beträgt die Sensitivität nur 0,5 (50%) und die Spezifität knapp 0,90 (90%) für das Diagnostikum. Wählt man z.B. 65 CD15 positive neutrophile Granulozyten als Grenzwert, so beträgt die Sensitivität 1,0 (100%), die Spezifität beträgt 0,55 (55%).

Die maximale Summe aus Sensitivität und Spezifität ergibt sich bei einem Schwellenwert von 100 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus. Die Sensitivität beträgt 1,0 (100%) und die Spezifität 0,66 (66%). Die Summe aus beiden beträgt 1,655. Der positiv prädikative Wert beträgt 0,587 der negativ prädikative Wert beträgt 1,0 (Tabelle 9).

Die Accuracy beträgt 0,767, die AUC (area under the curve) beträgt 0,863.



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

Abbildung 13: ROC-Kurve bei hoch und niedrig virulenten Erregern

Anzahl an CD15 pos. NG	Sensitivität	Spezifität	Positiv prädikativer Wert	Negativ prädikativer Wert	Summe aus Sens.+ Spez.
100	1,0	0,66	0,587	1,0	1,66

Tabelle 9: Deskriptive Statistik bei 100 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten als Schwellenwert, um zwischen hoch und niedrig virulenten bakteriellen Erregern zu unterscheiden.

4.7. Vergleich des unterschiedlichen Erregerspektrums bei den histopathologischen Typen II und III der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2004, Morawietz et al. 2006, Morawietz et al. 2009]

4.7.1. Beschreibung des Kollektivs

Für diese Beobachtung wurden die periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden herangezogen, bei denen histopathologisch ein Infektiöser (Typ II) oder Kombiniertes Typ (Typ III) nach der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006] diagnostiziert wurde. Es wurde die Verteilung der hoch virulenten und niedrig virulenten bakteriellen Erreger sowie die der Mischinfektionen analysiert. In manchen Fällen war der mikrobiologische Befund definitiv negativ, auch diese Fälle wurden beachtet. Aus Tabelle 10 kann man die Kollektivzusammensetzung entnehmen.

Typ der Konsensusklassifikation	Anzahl (n=)	Anteil am Gesamtkollektiv (%)	Alter (Jahre, Durchschnitt)	Geschlecht (n=)	Lokalisation d. Probenentnahme (n=)
<i>Typ II</i>	32	67	67	w=16 m=16	Hüfte=21 Knie=11
<i>Typ III</i>	16	33	67	w=6 m=10	Hüfte=11 Knie=5
<i>Gesamt</i>	48	100			

Tabelle 10: Kollektivbeschreibung bei unterschiedlichem Erregerspektrum bei Typen, die histopathologisch als positiv für eine Infektion gelten.

4.7.2. Ergebnisbeschreibung

Aus den Abbildungen 15 und 16 ist zu entnehmen, dass bei den periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden vom Infektiösen Typ (Typ II) der prozentuale Anteil mit 36% an hoch virulenten Erregern größer ist als bei periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden des Kombinierten Typs (Typ III) mit 12%. Bei letzterem ist der Anteil an niedrig virulenten Erregern (56%) sowie an Mischinfektionen (13%) größer als bei periprothetischen Membranen vom Infektiösen Typ (53% niedrig virulente Erreger, 3% Mischinfektionen).

Der prozentuale Anteil einer negativen Mikrobiologie ist mit 19% bei den periprothetischen Membranen vom Typ III größer als bei den periprothetischen Membranen vom Typ II, bei denen eine negative Mikrobiologie bei 6% vorliegt.

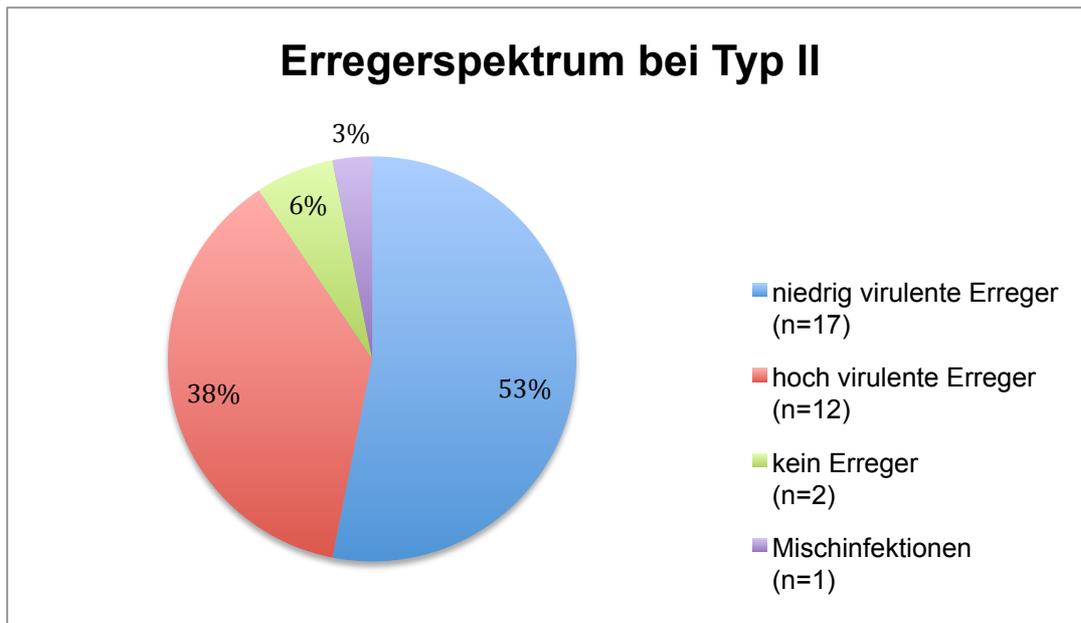


Abbildung 14: Erregerspektrum bei Typ II nach der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006]

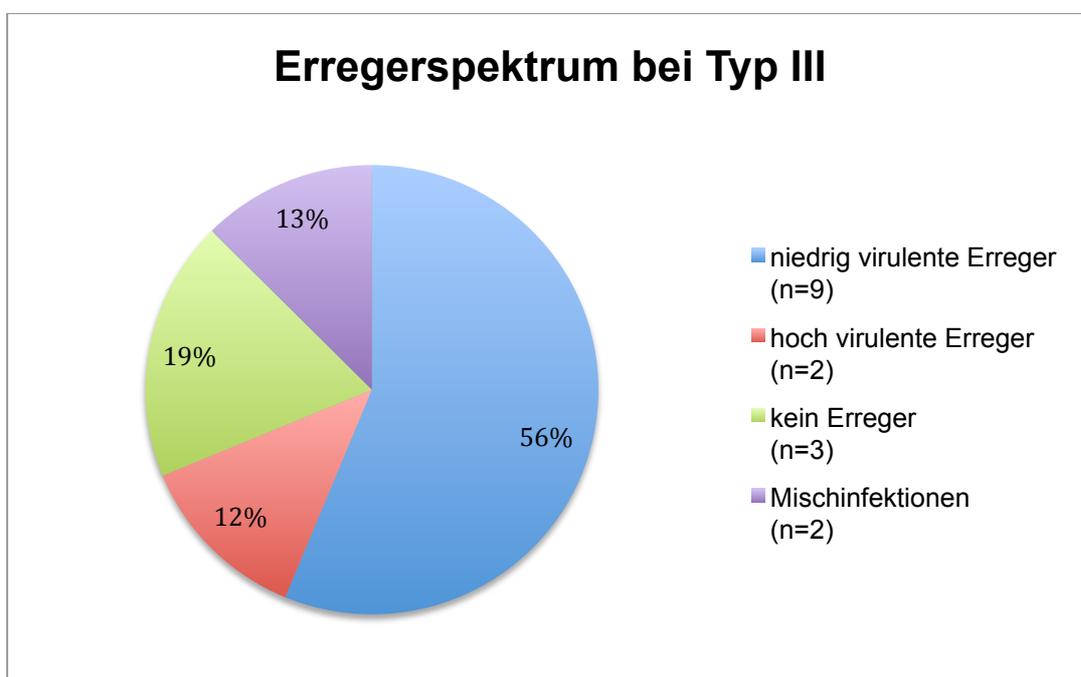


Abbildung 15: Erregerspektrum bei Typ III nach der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006]

4.8. Histologische Begutachtung immunhistochemisch gefärbter periprothetischen Membranen/ Neosynovialitiden

In allen Fällen handelt es sich um histopathologisch charakteristische Veränderungen von periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden aus unserem Untersuchungskollektiv. Bei den Bildern handelt es sich um Mikrophotographien. Zur immunhistochemischen Färbung wurden Anti-CD15-Antikörper verwendet. Bei einem Präparat wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Bei einem anderen Präparat erfolgte eine Färbung unter Verwendung von Anti-CD-68-Antikörpern. Alle Aufnahmen wurden unter der Verwendung eines 20er Objektivs gemacht. Bei dem Mikroskop handelt es sich um das Modell Leica DM2500.

Bei den folgenden Bildern ist eine spezifische CD15 Reaktivität der neutrophilen Granulozyten (NG) zu erkennen. Man erkennt die teilweise segmentierten Kerne ohne eine nennenswerte unspezifische Hintergrundreaktion.

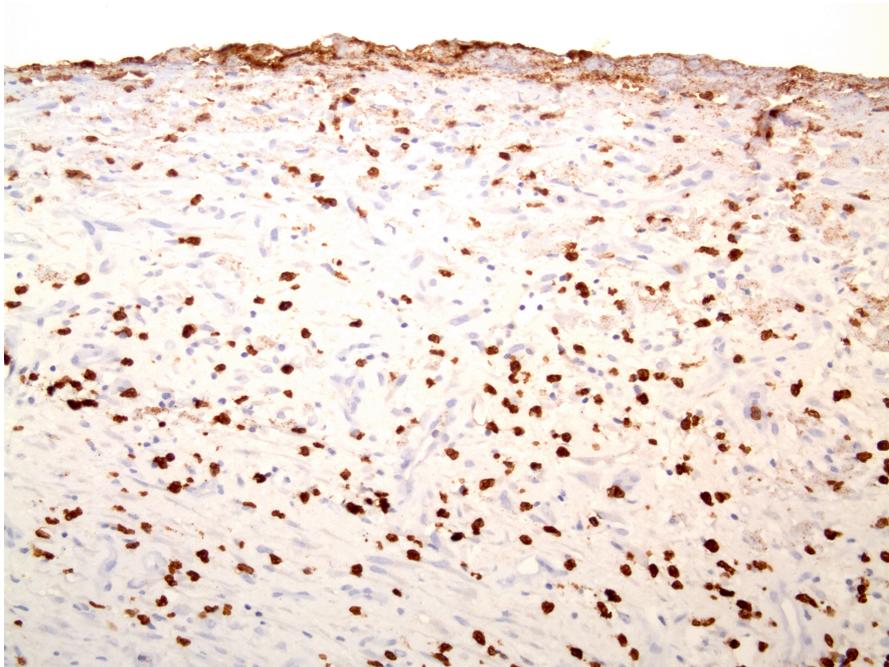


Abbildung 16: Periprothetische Membran vom Infektiösen Typ (Typ II)

Immunhistochemische Färbung (Anti-CD15-AK), positiver mikrobiologischer Befund: *Staph. epidermidis*, CD15-Fokus-Score: 125 NG, Vergrößerung: Original x 200. (Eingangsnummer: H/13/3379, ZHZMD Trier)

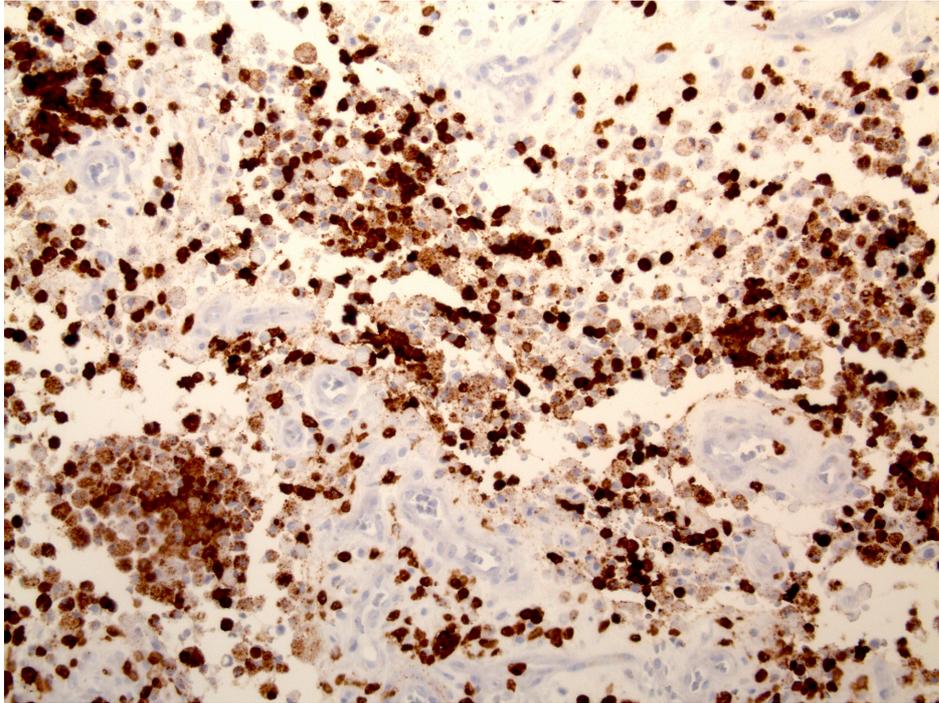


Abbildung 17: Periprothetische Membran vom Kombinierten Typ (Typ III)

Immunhistochemische Färbung (Anti-CD15-AK), positiver mikrobiologischer Befund: *Staph. epidermidis* und *Staph. pettenkoferi*, CD15-Fokus-Score: 219 NG, Vergrößerung: Original x 200. (Eingangsnummer: H/13/7791, ZHMD Trier)

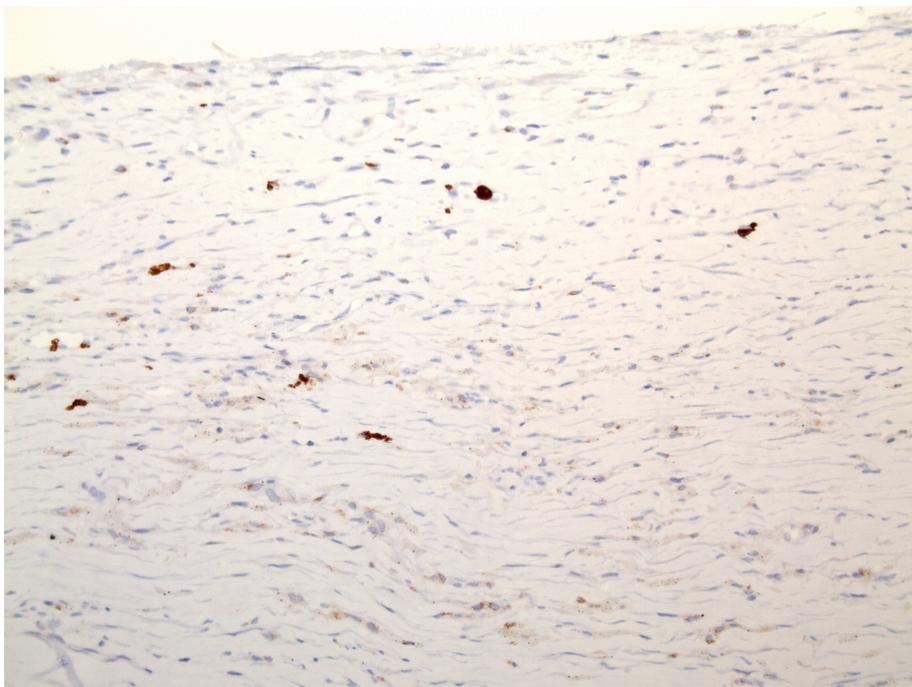


Abbildung 18: Periprothetische Membran vom Abrieb-Typ (Typ I)

Immunhistochemische Färbung (Anti-CD15-AK), negativer mikrobiologischer Befund, CD15-Fokus-Score: 11 NG, Vergrößerung: Original x 200. (Eingangsnummer: H/13/25565, ZHZMD Trier)

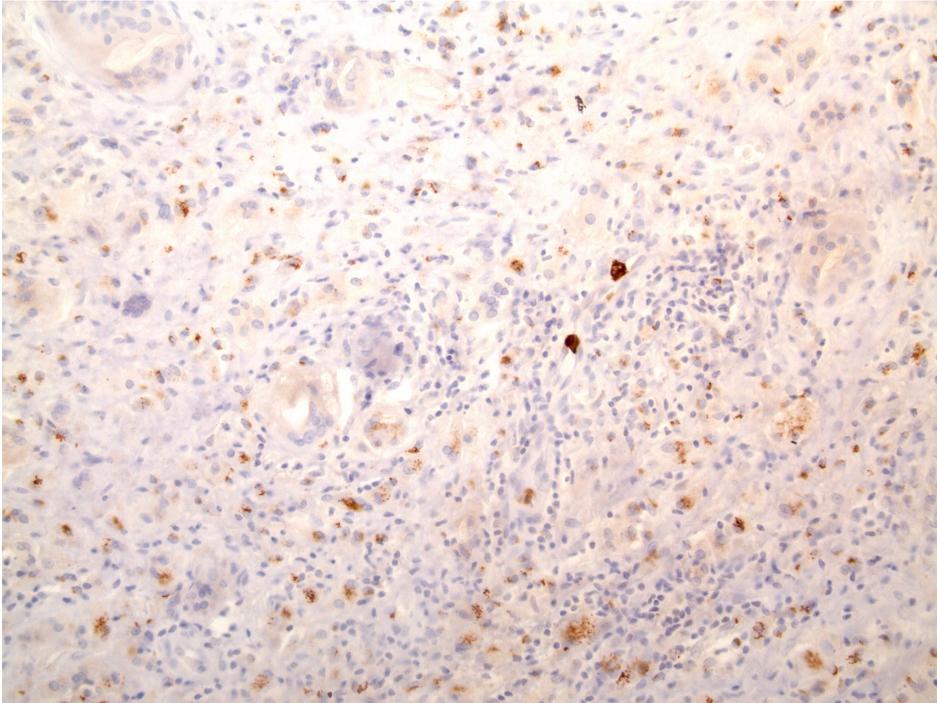


Abbildung 19: Periprothetische Membran vom Abrieb-Typ (Typ I)

Immunhistochemische Färbung (Anti-CD15-AK), positiver mikrobiologischer Befund: *Staph. epidermidis* und *Moraxella osloensis*, CD15-Fokus-Score: 2 NG, Vergrößerung: Original x 200. (Eingangsnummer: H/12/50441, ZHZMD Trier)

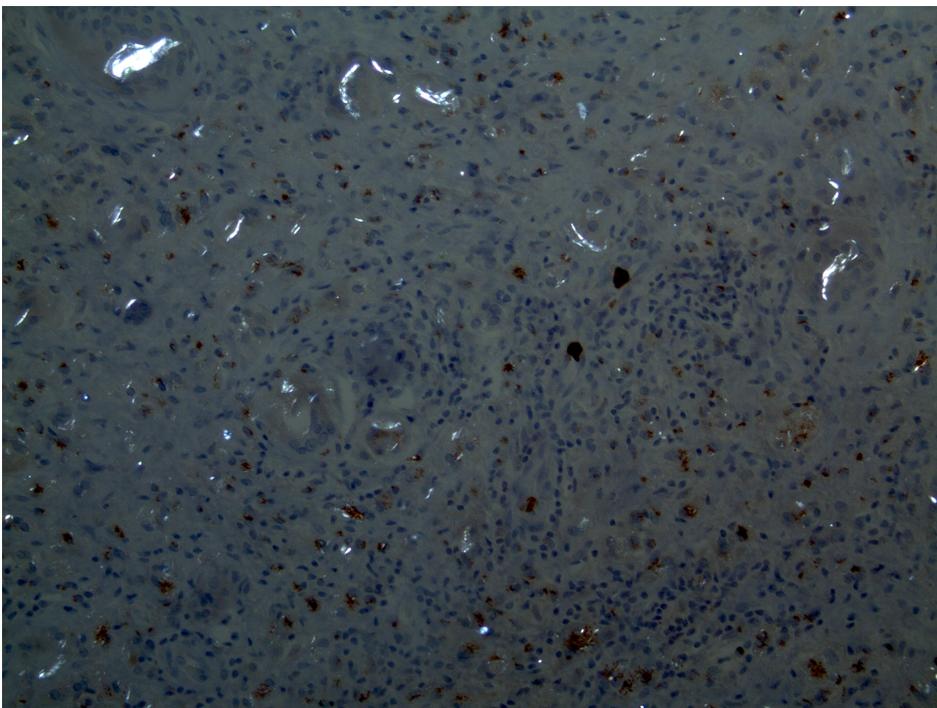


Abbildung 20: periprothetische Membran vom Abrieb-Typ (Typ I)

Immunhistochemische Färbung (Anti-CD15-AK), positiver mikrobiologischer Befund: *Staph. epidermidis* und *Moraxella osloensis*, CD15-Fokus-Score: 2 NG, Vergrößerung: Original x 200, mit Polarisationsoptik (Eingangsnummer: H/12/50441, ZHZMD Trier)

In den Abbildungen 19 und 20 weisen die neutrophilen Granulozyten eine intensive granuläre konfluente Reaktivität mit einer Überdeckung von Zellkern und Zytoplasma auf, wohingegen die Makrophagen eine schwache bräunliche Reaktivität ohne vollkommene Überdeckung von Zellkern und Zytoplasma aufweisen.

In Abbildung 20 sind durch die verwendete Polarisationsoptik doppelbrechende mikro- und makropartikuläre Polyethylenpartikel im Gewebe zu erkennen.

Bei den folgenden zwei Bildern wird die gleiche periprothetische Membran gezeigt. Bei Abbildung 21 wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Wie im Material- und Methoden-Teil beschrieben, wird dabei auf die Inkubation mit dem primären Antikörper verzichtet. In dem Präparat ist keine spezifische, lediglich eine schwache unspezifische Reaktivität der Makrophagen vorhanden. Bei Abbildung 22 wurde eine immunhistochemische Färbung mit Anti-CD68-Antikörpern durchgeführt. Dort ist eine spezifische CD68 Reaktivität der Makrophagen zu erkennen.

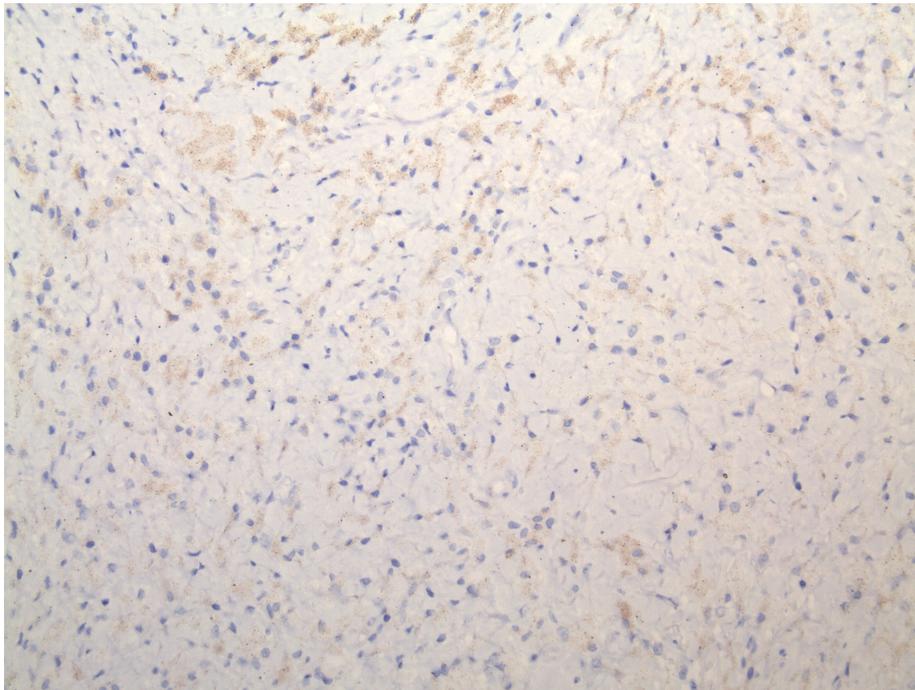


Abbildung 21: Periprothetische Membran vom Abrieb-Typ (Typ I), Negativkontrolle

Negativer mikrobiologischer Befund, Vergrößerung: Original x 200. (Eingangsnummer: H/13/25565, ZHZMD Trier)

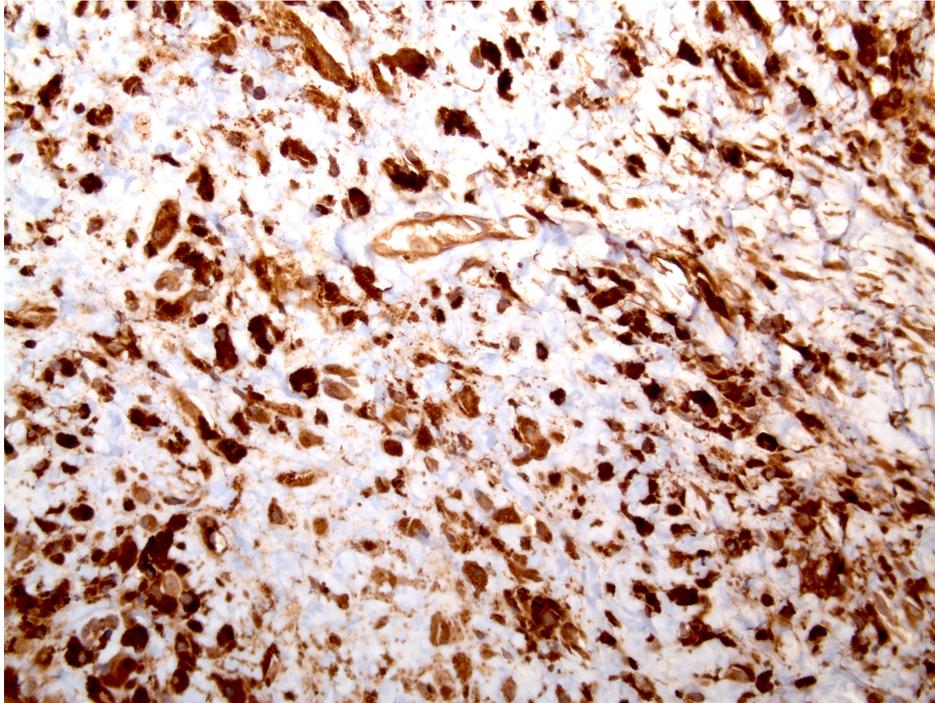


Abbildung 22: Periprothetische Membran vom Abrieb-Typ (Typ I)

Immunhistochemische Färbung (Anti-CD68-AK),
negativer mikrobiologischer Befund, Vergrößerung: Original x 200.
(Eingangsnummer: H/13/25565, ZHZMD Trier)

4.9. Vergleich der Ergebnisse der identifizierten CD15 positiven neutrophilen Granulozyten mittels CD15-Fokus-Score und mittels „CD15-Quantifier“.

4.9.1. Kollektivbeschreibung

Das Kollektiv für diese Untersuchung stammt nur teilweise aus dem oben genannten Kollektiv. Die periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden stammen von 19 Patienten. Bei der Kollektivzusammensetzung wurde darauf geachtet, dass die periprothetischen Membranen/Neosynovialitiden teilweise von Patienten mit einem positiven wie auch von Patienten mit einem negativen mikrobiologischen Befund stammen. Manche Schnitte weisen einen geringeren Schwierigkeitsgrad bei der Auszählung der Zellen auf, bei anderen Präparaten ist die korrekte Auszählung der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten aufgrund von Artefakten, Akkumulation von Zellen oder gleichzeitiger Anwesenheit von Makrophagen schwieriger.

Die Probeentnahme stammt in 68% (n=13) aus dem Hüft- und in 32 % (n=6) aus dem Kniegelenk. 58% (n=11) sind weiblichen und 42% (n=8) sind männlichen Geschlechts. Das mittlere Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme etwa 66 Jahre.

4.9.2. Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten beim CD15-Fokus-Score und „CD15-Quantifier“

Im Folgenden ist die Anzahl der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten, die mittels digital gestützter Morphometrie unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores sowie mit Hilfe des „CD15-Quantifiers“ ausgezählt wurden, tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 11). Aus der Tabelle kann man auch entnehmen, wie lange die Software benötigt, um die CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus auszuzählen. Wendet man den oben ermittelten Schwellenwert von 50 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus an, um einen periprothetischen Infekt zu diagnostizieren, so besteht nur bei einem Fall (0,05% am Gesamtkollektiv) eine Unstimmigkeit zwischen dem ermittelten Wert im CD15-Fokus-Score und dem „CD15-Quantifier“, der einen ausschlaggebenden Einfluss auf die Diagnosestellung hat. Eingangsnummer: 36268/13 wird nach dem CD15-Fokus-Score mit 19 Zellen als nicht infektiös eingestuft. Der „CD15-Quantifier“ ermittelte bei diesem Präparat 52 CD15 positive neutrophile Granulozyten (Abbildung 24), was nach dem oben berechneten Schwellenwert für eine Infektion spricht. Im Mittel weicht die Anzahl der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro gezähltem Fokus um 34 Zellen von dem ermittelten Wert des „CD15-Quantifiers“ ab.

Es wurde ein Mann-Whitney-U Test eingesetzt, um zu überprüfen, ob bei der Anzahl an CD15 positiven Granulozyten, die mit Hilfe des CD15-Fokus-Scores und des „CD15-Quantifiers“ ermittelt wurden, ein signifikanter Unterschied besteht. Dieser Test brachte jedoch kein signifikantes Ergebnis. Die Null-Annahme einer von den beiden Kollektiven unabhängigen Anzahl an CD15 positiven Granulozyten bleibt daher weiterhin bestehen. In Tabelle 11 ist die Zeit aufgelistet, die der Quantifier braucht. Je mehr neutrophile Granulozyten pro Präparat vorhanden sind, desto länger braucht der Quantifier, um die Zellzahl zu ermitteln. Bei diesem Datenkollektiv braucht der „CD15-Quantifier“ maximal 32,7 Sekunden, das untersuchte Gewebestück ist in Abbildung 25 dargestellt.

Eingangsnummer	CD15-Fokus-Score	„CD15-Quantifier“	Auswertungszeit des Quantifiers (in Sekunden)	Schwierigkeitsgrad, Anmerkungen
19413/13	3	1	18,2	1
2369/13	78	67	22,5	1
25565/13	15	8	18,6	1
2626/13	125	100	23,4	1
3089/13	277	167	27,0	1
33066/13	4	1	17,8	1
3379/13	125	115	20,1	1
36268/13	19	52	21,3	2
40575/13	213	275	32,7	2, Verklebungen
4395/13	195	156	25,7	1
46618/13	60	107	24,2	2, Makrophagen
5476/13	1	43	20,1	2, Makrophagen
56331/13	80	85	24,5	1
63200/13	126	171	29,2	1
7166/13	27	17	18,3	2
72845/13	185	202	28,0	1
73577/13	105	98	24,0	1
77154/13	57	160	28,7	2, Makrophagen
7791/13	109	227	31,9	1

Tabelle 11: CD15 positive neutrophile Granulozyten bei der manuellen Auszählung (CD 15-Fokus-Score) und mit Hilfe des "CD15-Quantifiers"

Im Folgenden sind zwei Mikrophotographien von zwei Präparaten dargestellt, die der „CD15-Quantifier“ bearbeitet hat. Alle Aufnahmen wurden unter der Verwendung eines 20er Objektivs gemacht. Vergrößerung: Original x 200. Bei dem Mikroskop handelt es sich um das Modell Leica DM2500.

Bei den blau umrandeten Strukturen handelt es sich um die vom „CD15-Quantifier“ als CD15 positiv erkannten neutrophilen Granulozyten (NG).

4.9.2.1. Präparatanalysen mittels „CD15-Quantifier“

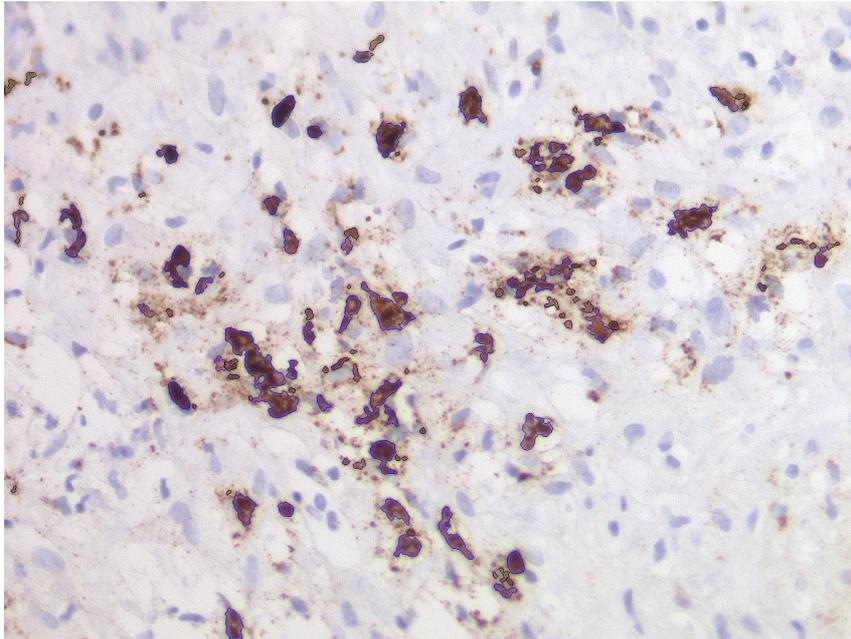


Abbildung 23: Periprothetische Membran vom Infektiösen Typ (Typ II)

immunhistochemische Färbung (Anti-CD15-AK), positiver mikrobiologischer Befund: *Staph. capitis*, „CD15-Quantifier“: 52 NG (blau umrandete Strukturen)
Vergrößerung: Original x 200. (Eingangsnummer: H/13/36268), VMscope Berlin

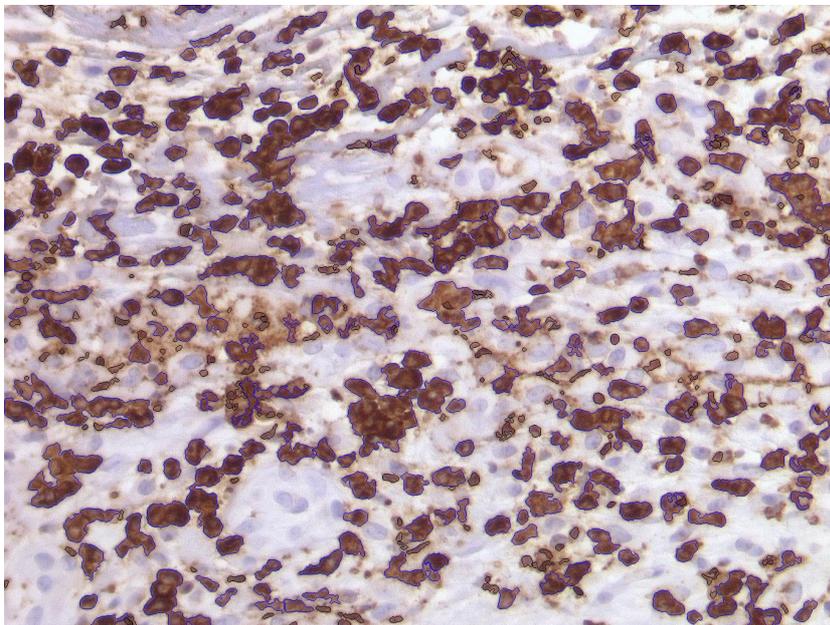


Abbildung 24: Periprothetische Membran vom Infektiösen Typ (Typ II)

Immunhistochemische Färbung (Anti-CD15-AK), positiver mikrobiologischer Befund: *E.coli*, „CD15-Quantifier“: 275 NG (blau umrandete Strukturen)
Vergrößerung: Original x 200. (Eingangsnummer: H/13/40575), VMscope Berlin

5. Diskussion

5.1. Einleitung

5.1.1. CD15, ein immunphänotypisches Oberflächenmerkmal.

CD15 (3-Fucosyl-N-Acetyl-Lactosamin) ist ein Antigen der „Cluster of Differentiation“ (abgekürzt: CD, Unterscheidungsgruppe). „Cluster of Differentiation“ beschreibt immunphänotypische Oberflächenmerkmale. Im Gegensatz zu den meisten anderen Molekülen der „Cluster of Differentiation“ handelt es sich bei CD15 nicht um ein Glykoprotein, sondern um eine Kohlenhydratverbindung. CD15 wird auch Lewis X (LeX) oder X-Hapten genannt. (Haptene sind Moleküle, die nur zusammen mit anderen Proteinen ein vollständiges Antigen bilden können). CD15 kommt auch in einer sialylierten Form vor, welche dann CD15s oder sLewisX (sLeX) genannt wird. Für die Umwandlung von sLeX in LeX ist ein Enzym aus der Familie der Neuraminidasen, die Sialidase verantwortlich. Sie kommt in der Zellmembran und im Zytosol vor und spaltet bei sLeX/CD15s die Sialinsäure vom Amino-Glykoprotein ab [Gadhoum et al. 2006]. sLeX kommt vorwiegend auf unreifen im Knochenmark ansässigen Zellen vor, wohingegen LeX auf reifen, differenzierten Zellen der myeloischen Reihe exprimiert wird [Gadhoum et al. 2006]. CD15 und seine sialylierte Form werden fast ausschließlich auf Zellen der myeloischen Reihe exprimiert [Knapp et al. 1989]. Bei den Granulozyten sind dies neben den neutrophilen auch die eosinophilen. Die basophilen Granulozyten exprimieren kein CD15 [Munro et al. 1992]. Außerdem exprimieren fast alle Monozyten bzw. Makrophagen CD15 als Oberflächenmerkmal und bis 40% der natürlichen Killerzellen. Einige Studien berichten, dass sogar in 10% der Fälle auch T-Lymphozyten CD15 positiv sind [Munro et al. 1992]. Auch einige maligne entartete Zellen tragen CD15 als Oberflächenantigen. Dazu gehören neben Sternberg-Reed-Zellen (beim Hodgkin-Lymphom) auch Zellen des B- und T-Zell-Lymphoms und Zellen der AML (Akuten myeloischen Leukämie) [Knapp et al. 1989].

5.1.1.1. CD15/LeX und CD15s/sLeX- Expression auf neutrophilen Granulozyten

CD15 wird unter anderem auf Glykolipiden und Glykoproteinen exprimiert [Albrechtsen et al. 1989]. Bei neutrophilen Granulozyten sind die CD15 tragenden Glykoproteine nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern auch intrazellulär auf der Oberfläche der Granula vorzufinden [Kerr et al. 1992]. Die CD15 tragenden Glykoproteine der

intrazellulär liegenden Granula sind für einen Großteil der immunhistochemischen Färbung der Zellen (mittels Anti-CD15-Ak) verantwortlich [Albrechtsen et al. 1989, Kerr et al. 1992]. Manche Glykoproteine, die auf der Zelloberfläche erst zu Beginn der Chemotaxis exprimiert werden, sind bis zu diesem Zeitpunkt in einem intrazellulären Reservoir gespeichert [Kerr et al. 1992]. CD15 besteht vermutlich hauptsächlich aus zwei Antigenfragmenten mit einer Größe von 165kDa und von 105kDa. Auf einem Zelloberflächenglykoprotein wurden zwei stickstoffhaltige Kohlenhydratverbindungen gefunden, dabei handelt es sich um LeX und sLeX. Sie können also beide gleichzeitig in einem Glykoprotein vorkommen. CD15 Antikörper reagieren nicht mit CD15 selber, sondern mit den Integrinen, auf denen es sich befindet. Bei CD15 spielen vor allem drei Integrine eine Rolle. Es handelt sich um drei Glykoproteine: LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1), Mac-1 (Macrophage-1 antigen), auch CR3 oder CD11b/CD18 genannt, und p150,95, das sowohl LFA-1 als auch Mac-1 beinhaltet. LFA-1 wird auf den meisten Leukozyten exprimiert, wohingegen Mac-1 und p150,95 vorwiegend auf Zellen der myeloischen Reihe exprimiert werden [Skubitz et al. 1987, Kerr et al. 1992]. Mac-1 ist vor allem auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert, die im Blut zirkulieren. P190,95 ist typischerweise auf Makrophagen exprimiert [Kerr et al. 1992]. Der größte Teil des 165kDa großen CD15 Fragments wird auf der α -Kette von Mac-1 und Teile des 105kDa großen Fragments werden auf der β -Kette desselben Integrins gefunden [Kerr et al. 1992].

5.1.1.2. Oberflächenantigenproduktion auf Monozyten/Makrophagen

Nach durchgeführter Immunfluoreszenz zur Detektion von CD15 Oberflächenantigenen wurden die Makrophagen zwar angefärbt, jedoch wurden diese in den meisten Fällen nicht so intensiv gefärbt wie die neutrophilen Granulozyten [Knapp et al. 1989]. CD68 ist ein Glykoprotein der „Cluster of Differentiation“, das typischerweise auf Monozyten und Makrophagen, jedoch nicht auf anderen Zellen der myeloischen Reihe exprimiert wird. Um Monozyten oder Makrophagen im Gewebe darzustellen, werden deshalb oft Anti-CD68 Antikörper verwendet [Knapp et al. 1989].

5.1.1.3. Entzündungsprozesse und die Bedeutung von CD15/ CD15s positiven neutrophilen Granulozyten und Makrophagen

An einer akuten Entzündung, die mit den Kardinalsymptomen Tumor, Rubor, Calor, Dolor und Functio laesa einhergeht, sind sowohl zelluläre als auch vaskuläre Reaktionen beteiligt [Böcker et al. 2009]. Zu den vaskulären Prozessen zählt neben der Vasodilatation, die vorwiegend durch Histamin, Serotonin, Prostaglandine, Kinine und PAF (Plättchen agglutinierender Faktor) vermittelt wird, die Permeabilitätssteigerung. Letzteres wird durch Histamin, PAF, Leukotriene und Kinine vermittelt und führt durch entstehende Endothellücken zu einem Ausstrom von proteinreicher Flüssigkeit (Exsudat) aus dem Blut ins Interstitium. Bei der zellulären Reaktion sind neben den Thrombozyten die Leukozyten von herausragender Bedeutung [Böcker et al. 2009]. Neutrophile Granulozyten schwimmen in der Abwesenheit einer Entzündung im axialen Strom der Gefäße [Witko-Sarsat et al. 2000]. Bei einer Entzündung kommt es zu einer Margination, das bedeutet, dass die Zellen an den Randstrom, also Richtung Endothel gedrängt werden. [Böcker et al. 2009, Witko-Sarsat et al. 2000]. Bei der primären Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen sind E-Selektin und P-Selektin beteiligt. Beide Selektine werden schon eine Stunde nach der Zellstimulation auf den Endothelzellen exprimiert. Sowohl CD15 wie auch sLeX haben eine Affinität für E- und P-Selektin [Siegenthaler et al. 2006, Witko-Sarsat et al. 2000]. Die Affinität von E-Selektin an sLeX ist jedoch höher als die von E-Selektin an LeX [Berg et al. 1991]. Neben neutrophilen Granulozyten binden E- und P-Selektin auch Monozyten, die CD15/CD15s erhalten [Witko-Sarsat et al. 2000]. Diese Bindungen der neutrophilen Granulozyten und Monozyten an das Endothel erfolgen sehr schnell, jedoch ist die Bindung nicht sehr stabil. Die gebundenen Leukozyten werden durch E- und P-Selektin im Blutfluss gebremst. Der Vorgang wird als „Rolling“ bezeichnet [Siegenthaler et al. 2006]. Dabei interagiert CD15 bzw. CD15s, welches auf der β -Kette von LFA-1 und Mac-1 lokalisiert ist, mit E- und P- Selektin [Forsyth et al. 1989, Witko-Sarsat et al. 2000]. Eine feste Bindung der neutrophilen Granulozyten an die Endothelzelle ist vermutlich CD15 unabhängig und vor allem auf die Aktivierung von Integrinen zurückzuführen [Witko-Sarsat et al. 2000]. Für diese Integrinaktivierung scheint das oben erklärte „Rolling“ notwendig zu sein. Dadurch, dass die neutrophilen Granulozyten vorher langsam über die Endothelzellen „rollen“, kommt es zu einer verstärkten Bindung

von LFA-1 zum Endothel [Forsyth et al. 1989]. Es kommt zur Interaktion von LFA-1 und Mac-1 mit ICAM-1 (Letzteres stammt aus der Immunglobulinen-Superfamilie) [Forsyth et al. 1989, Witko-Sarsat et al. 2000]. Dieser Prozess ist unabhängig von CD15 bzw. CD15s. Durch die feste Bindung der Leukozyten an das Endothel flachen diese ab und entziehen sich den Kräften des Blutstroms. Es folgt die Emigration (Diapedese) der Leukozyten durch die Kapillarwand in das entzündliche Gewebe [Böcker et al. 2008]. Dort findet die Phagozytose statt. Dabei kommt es zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch neutrophile Granulozyten [Knapp et al. 1989]. Die antimikrobielle Wirkung gegen *Staphylococcus aureus* wurde durch Inkubation mit Anti-CD15 Antikörpern gehemmt. Dies zeigt, dass auch Prozesse der Phagozytose von CD15 abhängig sind [Knapp et al. 1989]. Nach der Elimination der Noxe gehen die neutrophilen Granulozyten zu Grunde und es entsteht Eiter. Das Maximum der Zelleinwanderung in das entzündliche Gewebe wird von den neutrophilen Granulozyten nach 6-24 Std. und von den Monozyten nach 48 Std. erreicht [Forsyth et al. 1989]. In einer veröffentlichten Studie wurden im entzündlichen Gewebe 24-48 Std. nach Beginn des Entzündungsprozesses zahlreiche neutrophile Granulozyten und Makrophagen gefunden, die jedoch nicht alle sLeX exprimierten. Der prozentuale Anteil extravasaler Monozyten bzw. Makrophagen und neutrophiler Granulozyten, die sLeX exprimieren, war kleiner als der Anteil sLeX positiver Monozyten bzw. Makrophagen und neutrophiler Granulozyten im zirkulierenden Blut [Munro et al. 1992]. Dieses Phänomen ist dadurch zu erklären, dass nach Verlassen der Blutgefäße bei den genannten Zellen durch die Sialidase-Aktivität die Sialinsäure vom Amino-Glykoprotein abgetrennt wird [Gadhoum et al. 2008, Munro et al. 1992].

5.1.2. Die „High-Grade-Infektion“ und die „Low-Grade-Infektion“

Im Material- und Methoden-Teil wurde bereits auf die septische und die aseptische Prothesenlockerung eingegangen. In Abbildung 26 sind die Ursachen der septischen Prothesenlockerung dargestellt. Der akute Infekt wird von den Pathologen als „High-Grade-Infektion“ und der chronische als „Low-Grade-Infektion“ bezeichnet. Diese Infektformen sind weder was das zeitliche Auftreten noch was die Ätiologie oder die Abgrenzung zueinander betrifft eindeutig definiert [Krenn et al. 2012]. In verschiedenen Veröffentlichungen variiert das zeitliche Auftreten der „High-Grade-Infektion“ (auch Frühinfekt genannt) von vier Wochen [Walter et al. 2007] über sechs Wochen

[Zmistowski et al. 2014] bis zu drei Monaten [Lima et al. 2013, Laffer et al. 2006] postoperativ. Bei einer „High-Grade-Infektion“ kommt es aufgrund einer hohen Keimqualität, Keimpathogenität oder eines geschwächten Immunsystems des Patienten kurz nach dem durchgeführten Eingriff zu einer floriden, hoch infektiösen Entzündung im Bereich des betroffenen Gelenks. Diese Infektform geht mit eindeutigen klinischen Symptomen wie Schmerzen, Fieber, Rötung und Wundsekretion einher [Lima et al. 2013, Harrasser et al. 2012]. Auch bei der „Low-Grade-Infektion“, die auch verzögerte Infektion genannt wird, variiert das zeitliche Auftreten in der Literatur. In manchen Veröffentlichungen wird nach der vierten Woche [Walter et al. 2007] postoperativ, bzw. nach der sechsten Woche postoperativ [Zmistowski et al. 2014] von einer „Low-Grade-Infektion“ gesprochen. Anderen Veröffentlichungen zufolge tritt diese Infektform zwischen drei Monaten und einem Jahr postoperativ auf [Laffer et al. 2006], bzw. zwischen drei Monaten und zwei Jahren [Lima et al, 2013]. Eine „Low-Grade-Infektion“ entsteht meistens durch eine minimale bakterielle Kontamination der Endoprothese [Krenn et al. 2009]. Bei den beteiligten Mikroorganismen handelt es sich meistens um Bakterien von geringer Keimqualität oder Keimpathogenität. Sie sind in einem „Biofilm“ eingebettet [Kriegsmann et al. 2009, Laffer et al. 2006, Trampuz et al. 2005]. Dieser Biofilm entsteht an der Implantatoberfläche und besteht aus Wasser und extrazellulär polymeren Substanzen wie Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren [Trampuz et al. 2005]. Die Mikroorganismen sind in diesem Biofilm nicht nur geschützt, sie befinden sich auch in einem nur langsam wachsenden Zustand [Laffer et al. 2006]. Die „Low-Grade-Infektion“ ist weder klinisch noch histologisch leicht zu diagnostizieren [Krenn et al. 2009, Laffer et al. 2006]. Darüber hinaus führt der „Ruhezustand“, in dem die beteiligten Bakterien sich befinden, zu einer ausgeprägten Antibiotikaresistenz gegen wachstumsabhängige antimikrobielle Substanzen [Kriegsmann et al. 2009, Laffer et al. 2006]. Als dritte Ursache der septischen Prothesenlockerung gilt die späte Infektion, sie tritt nach einem Jahr [Laffer et al. 2006] bzw. nach zwei Jahren [Lima et al. 2013] postoperativ auf. Während die Keime bei der frühen und verzögerten Infektion vorwiegend exogener Ätiologie sind, tritt die späte Infektion meistens im Rahmen einer Septikämie auf [Laffer et al. 2006].

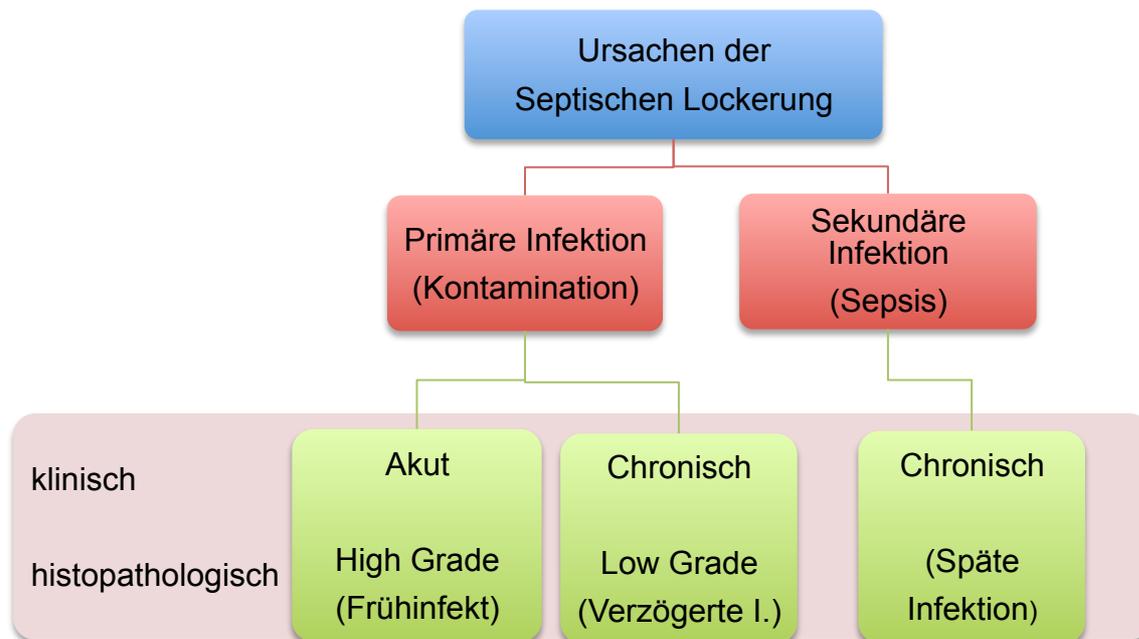


Abbildung 25: Ursachen der septischen Prothesenlösung

5.1.3. Erregerspektrum bei periprothetischen Infektionen

Das Erregerspektrum wird von Gram-positiven Bakterien dominiert [Aggarwal et al. 2014]. Am häufigsten treten Koagulase-negative Staphylokokken wie *Staphylococcus epidermidis* auf, bei den Koagulase-positiven Staphylokokken ist *Staphylococcus aureus* der häufigste Vertreter. Seltener können *Streptokokkus* spp., *Enterococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Bacteroides fragilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium* spp., *Corynebacterium* spp. oder andere Gram-negative Stäbchen isoliert werden [Krenn et al. 2013]. Es gibt keine einheitlich anerkannte Klassifikation der Erreger, die an einem periprothetischen Gelenkinfekt beteiligt sind. Die Einteilung der Erreger wird daher in zahlreichen Veröffentlichungen sehr unterschiedlich gehandhabt. In manchen Arbeiten werden die Erreger einfach aufgelistet [Trampuz et al. 2005, Kriegsmann et al. 2009, Fink et al. 2008]. In anderen Arbeiten erfolgt eine Einteilung in Aerobier und Anaerobier, oder man versucht die verschiedenen Erreger in den Zusammenhang mit dem zeitlichen Auftreten des Gelenkinfektes zu bringen [Lima et al. 2013]. In dieser Arbeit wurde eine Einteilung vorgenommen, bei der man aufgrund

des histopathologischen Befundes Rückschlüsse auf den Erreger ziehen kann. Dabei war die Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus (ausgewertet an immunhistochemisch gefärbten Präparaten) entscheidend. Die Einteilung erfolgte in hoch und niedrig virulente bakterielle Erreger. Unter Virulenz wird die Toxizität eines Erregers verstanden. Sie ist nicht als separate Keimeigenschaft anzusehen, sondern als Interaktion der Keimeigenschaft mit dem Immunsystem des Patienten [Casadevall et al. 2001]. Im Folgenden werde ich auf einige Erreger und ihre Bedeutung für die periprothetische Gelenkinfektion eingehen.

Aus Tabelle 7 ist die Einteilung unserer Erreger zu entnehmen sowie die durchschnittliche Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus. Da *Staphylococcus aureus* sowie Streptokokken, insbesondere *Streptokokken der Serogruppe A*, (z.B. *Streptococcus pyogenes*) zu der Gruppe der klassischen Eitererreger gehören, sind sie dafür bekannt, besonders viele neutrophile Granulozyten anzulocken. Enterokokken kommen natürlicherweise im Darm vor und zählen zu den Verursachern von zahlreichen im Krankenhaus erworbenen Infektionen. Sie sind für Harnwegsinfekte, Wundinfektionen sowie für nosokomiale Bakteriämien verantwortlich [Kafil et al. 2013]. Bei *Enterococcus faecalis* wurden im Gegensatz zu *Enterococcus faecium* mehr Virulenzgene gefunden und sie haben deswegen mehr Potential, eine Infektion auszulösen. *Enterococcus faecium* weist eine höhere Antibiotikaresistenz auf und wird daher öfters bei stationären Patienten gefunden [Kafil et al. 2013].

Gamella haemolysans kommt physiologischerweise im Respirationstrakt vor [Rose et al. 2012]. Das Bakterium wird zunehmend als Verursacher für zahlreiche Infektionen verantwortlich gemacht. Dazu zählen unter anderem Meningitis, Zerebralabszess, Keratitis, Pneumonie und Endokarditis. Der Erreger verursacht nur selten Infektionen nach orthopädischen Eingriffen und gelangt dann meistens im Rahmen einer Septikämie zum betroffenen Gelenk [Rose et al. 2012].

Zu den niedrig virulenten bakteriellen Erregern zählen vor allem Koagulase-negative Staphylokokken. Ein Vertreter ist *Staphylococcus epidermidis*, ein Bakterium, das als nicht pathogen gilt und auf der Haut und Schleimhaut vorkommt. Wie zahlreich in der Literatur beschrieben (und wie aus den Ergebnissen dieser Untersuchung zu entnehmen) gehört er zu den häufigsten Erregern des periprothetischen Gelenkinfekts [Bogut et al. 2014, Trampuz et al. 2005]. Zunächst haftet *Staphylococcus epidermidis* an der Oberfläche der Endoprothese, wo es zu einer Akkumulation der Erreger kommt.

Sie bilden Kolonien und produzieren einen Biofilm [Trampuz et al. 2005].

Staphylococcus epidermidis zählt zu den Hauptvertretern der „small colony variants“ (SCV) [Bogut et al. 2014]. Bei Letzterem handelt es sich um Subpopulationen von Erregern (vor allem von Koagulase-negativen Staphylokokken), die für persistierende oder rezidivierende Infektionen des periprothetischen Gelenks verantwortlich gemacht werden [Sendi et al. 2006]. Die Namensgebung („small colony variants“) rührt daher, dass sich die Bakterien in dem Biofilm in einem langsam wachsenden Zustand befinden und daher besonders klein sind [Sendi et al. 2006, Laffer et al. 2006].

Propionibacterium acnes zählt auch zu den niedrig-virulenten Erregern. Er zählt zur normalen Haut- und Zahnflora [Dramis et al. 2009]. Bei einer Besiedlung des periprothetischen Gelenks mit *Propionibacterium acnes* gilt das lange Intervall zwischen Kolonisation und Beginn der Symptome als problematisch. Auch dieser Erreger wird für persistierende und rezidivierende Infekte des periprothetischen Gelenks verantwortlich gemacht, welche wegen der geringen klinischen Symptome schwer zu diagnostizieren sind und daher oft mit einer aseptischen Prothesenlockerung verwechselt werden [Dramis et al. 2009]. In vielen Fällen kann *Propionibacterium acnes* aus den zahlreichen intraoperativ entnommenen Proben nur ein einziges Mal isoliert werden. Die Bedeutung der Aussagekraft von nur einer positiven Probe bei diesem Erreger ist von ungewisser Bedeutung. Der Erreger nimmt aufgrund der dargestellten Problematik eine Sonderstellung bei der Diagnostik des endoprothetischen Infekts ein [Dramis et al. 2009].

5.2. Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten in der immunhistochemischen Auswertung bei mikrobiologisch positivem und negativem Befund.

Bei der quantitativen Auswertung der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten ergibt sich ein höchst signifikanter Unterschied ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test) zwischen den periprothetischen Membranen der Patienten, bei denen der mikrobiologische Befund positiv ($n = 47$) bzw. negativ ($n = 44$) ist.

Die beiden Patientenkollektive weisen weder bei Alter, Geschlecht, Größe des Kollektivs noch der Lokalisation der Probeentnahme nennenswerte Unterschiede auf.

Der ermittelte „CD15 Fokus Score“ wurde bei jedem Präparat vom gleichen, sehr erfahrenen Pathologen überprüft. Die mikrobiologische Untersuchung scheint nach den erhaltenen Befunden zu urteilen standesgemäß durchgeführt worden zu sein. Zusammenfassend kann deshalb davon ausgegangen werden, dass bei einer histopathologischen Untersuchung unter Verwendung des CD15-Fokus-Scores signifikant mehr neutrophile Granulozyten detektiert werden, wenn eine bakteriell-infektiöse Ätiologie der Prothesenlockerung vorliegt als wenn eine nicht infektiöse Ursache zur Prothesenlockerung führt. Diese Schlussfolgerung, die aus der Interpretation der Ergebnisse hervorgeht, wird durch die oben beschriebene Beteiligung von CD15 positiven Zellen bei entzündlichen Prozessen (Kapitel 5.1.1.3.) untermauert. Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, weisen die beiden zu diesem Datensatz erstellten Boxplots (Abbildung 7) eine unterschiedliche Spannweite von einmal 289 Zellen bei Patienten mit positivem und von 125 Zellen bei Patienten mit negativem mikrobiologischen Befund auf. Die Spannweite beinhaltet jedoch auch die Ausreißer. Durch die Angabe von Interquartilabstand und empirischer Standardabweichung kann nicht nur eine Aussage über den Abstand zwischen Maximal- und Minimalwert des Datensatzes, sondern auch über die Dichte der Verteilung gemacht werden. Die größeren Werte des Interquartilabstands und der Standardabweichung innerhalb des erstellten Boxplots, das den Datensatz der Patienten mit positivem mikrobiologischen Befund beinhaltet, spiegeln im Gegensatz zu den Werten des Kontroll-Kollektivs folglich eine größere Streuung des Datensatzes bei gleichzeitiger Dichte wider. Diese Beobachtung könnte wegweisend bei der Annahme sein, dass unterschiedliche Erreger mit einem unterschiedlichen Maß an Entzündung, gemessen an der Quantität der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten, einen periprothetischen Gelenkinfekt verursachen.

Bei dem rechten Boxplot von Abbildung 7 sind fünf Ausreißer zu vermerken und in Tabelle 2 im Ergebnisteil dargestellt. Bei vier der fünf Ausreißer liegt ein Typ II oder III nach den Kriterien der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006] vor. Der mikrobiologische und der histopathologische Befund stimmen nicht überein. Bei diesen Präparaten wäre aufgrund der histologisch gestellten Diagnose ein positiver mikrobiologischer Befund zu erwarten. Eventuell ist hier die mikrobiologische Befundung falsch negativ. Eine zu kurze Kultivierung der Proben (unter zwei Wochen) bei einem niedrig virulenten Keim kann zu einem falsch negativen Ergebnis führen [Spanghel et al. 1999]. Bei diesen Fällen könnte es sich auch um sogenannte

„Graufälle“ handeln, bei denen trotz wiederholter mikrobiologischer Untersuchung mit langer Kultivierungszeit der Probe die mikrobiologische Diagnose nicht mit der histopathologischen Diagnose übereinstimmt. Wie bereits oben beschrieben kommt es in 5% der Fälle zu solchen interdisziplinären Diskrepanzen.

Bei der periprothetischen Membran der Patientenummer H/13/27761 wurde histopathologisch ein Abriebinduzierter-Typ (Typ I nach den Kriterien der Konsensusklassifikation) diagnostiziert, da die Anzahl der Abriebpartikel das histopathologische Bild dominiert. Eine hohe Anzahl an neutrophilen Granulozyten, wie sie in diesem Präparat zu finden ist, stellt nicht notwendigerweise ein Äquivalent einer bakteriellen Infektion dar, sondern kann auch Ausdruck einer nicht infektiösen Inflammation, wie beispielsweise bei einer rheumatoiden Arthritis sein [Krenn et al. 2005, Püschel et al. 1982].

Dass der linke Boxplot der Abbildung 7, der den Datensatz der Patienten mit positivem mikrobiologischen Befund beinhaltet, keine Ausreißer aufweist, ist auf eine dichte Verteilung der Daten auch nahe Maximal- und Minimalwert zurückzuführen. Allerdings gibt es auch hier einige Fälle, die zwar bei der statistischen Auswertung nicht als Ausreißer markiert wurden, die aber als „Randwerte“ zu beurteilen sind.

Bei den Eingangnummern H/13/10476 und H/13/19672 wurden histopathologisch entzündliche Veränderungen gefunden, weshalb die Präparate als histopathologisch positiv für eine Infektion einzustufen sind. Die mikrobiologischen Befunde bestätigen die histopathologische Diagnose. Jedoch ist die Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus viel zu niedrig als für einen periprothetischen Infekt erwartet. Eine Ursache könnte die verminderte Immunantwort auf entzündliche Prozesse im Sinne einer Neutropenie sein. Diese Präparate könnten auch Beispiele für einen Standardfehler sein. Der Standardfehler entspricht der Streuung der empirischen Mittelwerte um den Mittelwert eines Kollektivs [Bärlocher et al. 1999].

Bei den anderen beiden Grenzwerten (H/13/25931, H/13/50441), die in der Tabelle 1 aufgelistet sind, könnte die Ursache in der Diskrepanz zwischen mikrobiologischem und histopathologischem Befund bei einer Kontamination der Probe liegen.

5.3. Anzahl der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten in der immunhistochemischen Auswertung nach den Kriterien der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006, 2009]

Für diese Untersuchung wurden Typ II und Typ III nach den Kriterien der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006, Krenn et al. 2013] zu einem Kollektiv (n=48) zusammengefasst, das histopathologisch als positiv für eine Infektion gilt. Das andere Kollektiv (n=43) ist histopathologisch negativ für eine Infektion. Es besteht aus Typ I und Typ IV nach den Kriterien der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006, Krenn et al. 2013]. Die quantitative Auswertung der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten ergibt einen höchst signifikanten Unterschied ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test) zwischen den periprothetischen Membranen der Patienten, die histopathologisch positiv für eine Infektion sind (n=48), verglichen mit den Membranen der Patienten, die histopathologisch negativ für eine Infektion sind (n=43).

Der Boxplot (Abbildung 9, rechter Boxplot), der den Datensatz periprothetischer Membranen beinhaltet, die als histopathologisch positiv für eine Infektion gelten, weist nicht nur eine größere Spannweite und einen größeren Interquartilabstand, sondern auch eine größere Standardabweichung im Vergleich zum anderen Kollektiv auf. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der rechte Boxplot eine größere Streuung des beinhalteten Datensatzes bei gleichzeitiger Dichte widerspiegelt, verglichen mit dem Kollektiv, das histopathologisch als negativ für eine Infektion gilt. Bei den Ausreißern des Boxplots (Abbildung 9), das den Datensatz der Patienten, die histopathologisch negativ für eine Infektion sind, beinhaltet, stimmen bei einem Patienten (Eingangsnummer: H/13/71745) der histopathologische und der mikrobiologische Befund nicht überein. Eventuell ist hier der mikrobiologische Befund falsch positiv oder die histopathologische Diagnose ist nicht korrekt. Wenn beides nicht zutrifft, handelt es sich hier um einen „Graufall“. Bei den restlichen in Tabelle 4 aufgeführten Fällen könnte die Mikrobiologie falsch negativ sein. Dies ist vor allem durch eine zu kurze Kultivierungszeit der Proben zu erklären.

5.4. Vergleich der Mikrobiologie mit den Kriterien der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006]

Vergleicht man die Boxplots der Abbildung 7 und der Abbildung 9 miteinander, so sieht man, dass der Boxplot, welcher den Datensatz mit der positiven Mikrobiologie (Abbildung 7, linke Box) beinhaltet, fast deckungsgleich mit dem Boxplot ist, welcher den Datensatz der Typen II und III beinhaltet (Abbildung 9, linke Box). Die Boxplots der negativen Mikrobiologie (Abbildung 7, rechte Box) und der Typen I und IV (Abbildung 9, rechte Box) unterscheiden sich im Interquartilabstand um knapp 9 und in der Spannweite um 55 Zellen. Diese Werte spiegeln folglich eine geringere Streuung der Daten der Typen I/IV verglichen mit den Daten der negativen Mikrobiologie wider. Diese Ergebnisse sind so zu interpretieren, dass der mikrobiologische und der histopathologische Befund nicht in allen untersuchten Fällen übereinstimmen und dass diese interdisziplinäre Diskrepanz bei dem untersuchten Kollektiv größer ist, wenn ein periprothetischer Infekt auszuschließen ist.

5.5. Grenzwertermittlung: Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus, um einen periprothetischen Infekt zu diagnostizieren.

Neben der Mikrobiologie wurde auch die histopathologische Einteilung nach den Kriterien der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006] als Goldstandard herangezogen, um einen passenden Schwellenwert für den diagnostischen Test, der in dieser Arbeit vorgestellt wurde (CD15-Fokus-Score), zu ermitteln. Jedoch gilt die Mikrobiologie bei der Diagnosestellung des periprothetischen Gelenkinfekts als Goldstandard, sodass die diagnostische Güte des CD15-Fokus-Scores unter Verwendung eines Schwellenwertes gemessen wurde, welcher mit der mikrobiologischen Diagnose als Goldstandard ermittelt wurde. So liegt beim Datensatz dieser Arbeit ab einem Wert von 50 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten, ermittelt unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores mit einer Sensitivität von 83% und einer Spezifität von 86,4%, ein periprothetischer Gelenkinfekt vor. Die Summe aus Sensitivität und Spezifität ist ein Maß für die Güte eines Testverfahrens und liegt hier bei 1,694. Der positiv prädikative Wert beträgt 0,87 und der negativ prädikative Wert

0,83 (Tabelle 6). Die Accuracy beträgt 0,846, die AUC (area under the curve) beträgt 0,878. Gilt die histopathologische Einteilung nach der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006] als Goldstandard unter Anwendung von 50 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten als Grenzwert, beträgt die Sensitivität für das Diagnostikum 87,5%, die Spezifität 93%. Die Summe aus beiden beträgt 1,805. Die Accuracy beträgt 0,846, die AUC 0,878. Um die diagnostische Wertigkeit des CD15-Fokus-Scores unter Verwendung dieses Schwellenwertes beurteilen zu können, werde ich im Folgenden die Ergebnisse, die aus diesem Datensatz erhoben wurden, mit Sensitivität und Spezifität anderer angewandter diagnostischer Tests vergleichen (Tabelle 12).

In der Einleitung wurde bereits auf die Publikation von Morawietz et al. 2009 eingegangen. Um histologisch zwischen einer aseptischen und einer septischen Prothesenlockerung unterscheiden zu können, schlug er einen Schwellenwert von 23 neutrophilen Granulozyten pro 10 „High-Power-Fields“ vor. Für seine Untersuchung wurden 147 periprothetische Membranen herangezogen. Das Patientenkollektiv der hier vorliegenden Arbeit beträgt mit 91 etwas weniger als 2/3 des Patientenkollektivs von Morawietz et al. 2009. Bei der Arbeit von Morawietz et al. 2009 wurde ein mikrobiologischer Befund als positiv definiert, wenn eine Probe eines hoch virulenten Erregers wie beispielsweise *Staph. aureus* bzw. drei Proben eines niedrig virulenten Erregers wie beispielsweise *Propionibacterium acnes* positiv waren. Bei der hier vorliegenden Arbeit gilt ein bakterieller Befund als positiv, wenn zumindest bei zwei Kulturen der gleiche Erreger nachgewiesen wurde, unabhängig von der Gattung der isolierten Erreger. Auch wurde bei der hier vorliegenden Arbeit der komplette Datensatz nach einer immunhistochemischen Färbung mit Anti-CD15-Antikörpern (Klon MMA, Roche, Basel, Schweiz) begutachtet. Bei Morawietz et al. 2009 wurde nur ein Teil der Präparate nach der immunhistochemischen Färbung begutachtet, die restlichen Präparate waren mit PAS gefärbt. Die Ergebnisinterpretation in dieser Arbeit beruht somit auf der Auswertung von immunhistochemisch einheitlich angefärbten Präparaten. Zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität des Diagnostikums von Morawietz et al. 2009 wurde als Goldstandard zum einen die klinische und zum anderen die mikrobiologische Diagnose herangezogen. Bei der hier vorliegenden Arbeit wurde neben der Mikrobiologie noch die Einteilung nach den Kriterien der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006] als Goldstandard herangezogen. Den positiv und negativ prädikativen Wert berechnete Morawietz et al. 2009 genau wie in dieser Arbeit nach dem Satz von Bayes. Die einzelnen Werte der beiden Arbeiten im

Vergleich sind Tabelle 12 zu entnehmen. Die statistische Auswertung erfolgte bei beiden Arbeiten mit SPSS, zur optimalen Grenzwertermittlung wurde bei beiden Arbeiten eine ROC-Kurve erstellt. Da bei dieser wie auch bei der Arbeit von Morawietz et al. 2009 unter anderem die Mikrobiologie als Goldstandard verwendet wurde, ist es sinnvoll, die dabei gewonnenen Maße, welche ein diagnostisches Verfahren beurteilen, miteinander zu vergleichen. Die Spezifität des diagnostischen Tests, der in dieser Arbeit vorgestellt wird (CD15-Fokus-Score), ist mit 86,4 % zwar niedriger als die von Morawietz et al. 2009 mit 95%, die Sensitivität ist mit 83% jedoch höher als die von Morawietz et al. 2009 mit 73%. Auch die Summe aus Sensitivität und Spezifität ist unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores geringfügig höher als bei Morawietz et al. 2009 (Tabelle 12). Die Accuracy des diagnostischen Tests dieser Arbeit ist mit 84,6% geringfügig niedriger als die von Morawietz et al. mit 86%. Die AUC ist bei dem diagnostischen Test dieser Arbeit mit 0,878 etwas besser als bei Morawietz et al. 2009 mit 0,881. Als zweiter Goldstandard wurde bei dieser Arbeit die Einteilung nach der Konsensusklassifikation verwendet [Morawietz et al. 2006]. Da die diagnostischen Kriterien dabei grundlegend auf der Methode (23 NG pro 10HPF) von Morawietz et al. 2009 basieren, wurde damit unser Diagnostikum mit dem von Morawietz et al. 2009 verglichen. Dabei wurden eine Sensitivität von 87,5% und eine Spezifität von 93% erreicht. Die Accuracy beträgt 90%, die AUC 0,944. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit dem hier erarbeiteten immunhistochemischen Score (CD15-Fokus-Score) ähnlich gute Werte bei Testverfahren, die etwas über die Güte des angewandten Diagnostikums aussagen, erzielt werden wie bei Morawietz et al. 2009.

Um einen Eindruck zu gewinnen, welche Sensitivität und Spezifität die diagnostischen Methoden anderer Publikationen aufweisen, wurden zwei Veröffentlichungen von Fink et al. von 2008 und 2013 herangezogen. Die Publikation von Fink et al. 2008 bezieht sich auf die Diagnostik des periprothetischen Infekts des Knies, die von Fink et al. 2013 bezieht sich auf die Diagnostik des periprothetischen Infekts der Hüfte. In den beiden Arbeiten wurden Bedeutung von Aspiration, intraoperativ gewonnener Biopsie zur histopathologischen und mikrobiologischen Beurteilung und Erhöhung des C-reaktiven Proteins bei der Diagnose des periprothetischen Infekts beurteilt. Da Sensitivität und Spezifität der intraoperativ gewonnenen Biopsie den mikrobiologischen und histopathologischen Befund beinhaltet, kann die alleinige histopathologische Diagnostik niemals solche Werte in Sensitivität und Spezifität erlangen wie beide Verfahren

zusammen. Im Vergleich zur präoperativen CRP-Erhöhung stellen alle anderen Verfahren (einschließlich unserem) ein besseres Diagnostikum dar.

Was auffällt, ist, dass der CD15-Fokus-Score im Vergleich zu den anderen in Abbildung 12 aufgeführten diagnostischen Methoden eine geringere Spezifität (Ausnahme: präoperative CRP-Bestimmung), aber eine höhere Sensitivität (Ausnahme: intraoperative Biopsie Hüfte) aufweist. Hoch sensitive Testverfahren dienen dazu, eine Krankheit mit hoher Sicherheit auszuschließen.

Durchgeführte Diagnostik	Sens. (in %)	Spez. (in %)	Positiv prädik. Wert (in%)	Negativ prädik. Wert (in %)	Summe aus Sens.+ Spez.
CD15-Fokus-Score					
-Mikrobiologie (GS)	83	86,4	87	83	1,694
-Histopathologie (GS)	87,5	93	93	87	1,805
[Morawietz et al.2009]					
23NG pro 10HPF					
-Mikrobiologie (GS)	73	95	91	84	1,68
-Klinik als (GS)	77	97	91	91	1,74
[Fink et al.]					
Gelenkaspiration Hüfte*	64	96	94	77	1,6
	72.5	95.2	85.3	90.1	1,677
Gelenkaspiration Knie**					
[Fink et al.]					
intraoperative Biopsie Hüfte*	82	98	97	87	1,8
Intraoperative Biopsie Knie**	100	98.1	95.2	100	1,981
[Fink et al.]					
CRP-Erhöhung (Hüfte*)	64	75	67	72	1,39
CRP-Erhöhung (Knie**)	72.5	80.9	59.2	88.5	1,534

Tabelle 12: Verschiedene diagnostische Kriterien, einen periprothetischen Infekt zu diagnostizieren, * Fink et al. 2013, **Fink et al. 2008, GS=Goldstandard

5.6. Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten in der immunhistochemischen Auswertung bei unterschiedlichem bakteriellen Erregerspektrum

Bei der quantitativen Auswertung der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten ergibt sich ein höchst signifikanter Unterschied ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test) zwischen den periprothetischen Membranen der Patienten, bei denen ein hoch virulenter bakterieller ($n=14$) bzw. ein niedrig virulenter bakterieller ($n=29$) Erreger isoliert wurde. Die beiden Patientenkollektive weisen weder bei Alter, Geschlecht, Größe des Kollektivs noch der Lokalisation der Probeentnahme nennenswerte Unterschiede auf. Der ermittelte CD15-Fokus-Score wurde bei jedem Präparat von dem gleichen, sehr erfahrenen Pathologen überprüft. Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die histopathologische Untersuchung (unter Verwendung des CD15-Fokus-Scores) signifikant mehr neutrophile Granulozyten bei dem Kollektiv detektiert werden konnten, bei dem eine periprothetische Infektion mit einem hoch virulenten bakteriellen Erreger vorliegt, als bei dem Kontroll-Kollektiv, bei dem ein niedrig virulenter bakterieller Erreger für die periprothetische Infektion verantwortlich gemacht wird. Da die Spannweite sowie die empirische Standardabweichung bei dem Boxplot, das den Datensatz der niedrig virulenten bakteriellen Erreger enthält, größer ist als bei dem Boxplot der hoch virulenten bakteriellen Erreger, ist die Streuung der gesamten Daten der niedrig virulenten bakteriellen Erreger somit größer als bei dem anderen Kollektiv. Bei dem Boxplot der hoch virulenten Erreger ist der Interquartilabstand größer als bei dem anderen Kollektiv (Abbildung 13). Dies spiegelt folglich eine größere Streuung von 50% des Datensatzes der hoch virulenten bakteriellen Erreger bei gleichzeitiger Dichte wider. Bei den niedrig virulenten bakteriellen Erregern gibt es einen Ausreißer. Die untersuchte Probe stammt aus dem Hüftgelenk einer weiblichen 77-jährigen Patientin. Die histopathologische Befundung ergab eine periprothetische Membran/ Neosynovialitis vom Kombinierten Typ (Typ III). Es wurden 253 CD15 positive neutrophile Granulozyten gefunden. Durch die mikrobiologische Befundung konnte *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen werden. Weshalb die Anzahl der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten hier so hoch ist, konnte nicht geklärt werden, eventuell ist der mikrobiologische Befund nicht korrekt. Bei der Ergebnisinterpretation muss, wie man aus dem Ergebnisteil entnehmen kann, darauf hingewiesen werden, dass das untersuchte Kollektiv sehr klein ist.

5.7. Grenzwertermittlung: Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus, um hoch virulente von niedrig virulenten bakteriellen Erregern zu unterscheiden.

Um herauszufinden, ab welcher Anzahl von CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus man von einer Infektion mit einem hoch virulenten bakteriellen Erreger ausgehen kann, wurde mittels ROC-Kurve ein Schwellenwert ermittelt. Als Goldstandard diente dabei die Einteilung in hoch und niedrig virulente Erreger. Der ermittelte Schwellenwert von 100 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten weist die maximale Summe aus Sensitivität und Spezifität auf. Ab einer Anzahl von 100 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten liegt bei diesem Kollektiv mit einer Sensitivität von 100% und mit einer Spezifität von 66% eine Infektion mit einem hoch virulenten bakteriellen Erreger vor. Die Summe aus Sensitivität und Spezifität beträgt 1,66. Der positiv prädikative Wert beträgt 0,587, der negativ prädikative Wert beträgt 1,0, die Accuracy beträgt 0,767 und die AUC 0,863. Die Ergebnisse zeigen, dass bei diesem Datensatz ab einem Wert von 100 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus eine Infektion mit einem niedrig virulenten Erreger ausgeschlossen werden kann. In der Literatur liegen aktuell keine Daten dazu vor, dass durch eine alleinige histopathologische Diagnostik eine Keimspezifizierung möglich ist. Die Einteilung in hoch und niedrig virulente bakterielle Erreger beruht auf veröffentlichter Literatur sowie auf den Beobachtungen von Mikrobiologen und Pathologen, die sich mit dieser Thematik beschäftigen. Ein Teil dieses Konzepts ist in Diskussion mit Frau Priv.-Doz. Dr. med. Monika Huber (SMZ Otto Wagner Spital, Pathologisch-Bakteriologisches Institut, Wien) entstanden.

Die gewonnenen Erkenntnisse können aufgrund des kleinen Kollektivs und der hierzu nicht zur Verfügung stehenden Literatur lediglich als Ansatz bei der histopathologischen bakteriellen Keimspezifizierung des periprothetischen Gelenkinfekts dienen. Es kann lediglich eine Aussage über die lokale bakterielle Virulenzwirkung in der periprothetischen Membran gemacht werden.

5.8. Vergleich des unterschiedlichen Erregerspektrums bei den histopathologischen Typen II und III der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2004, Morawietz et al. 2006, Morawietz et al. 2009]

Betrachtet man die Verteilung der verschiedenen Erreger bei Typ II (n=32) und Typ III (n=16) nach den Kriterien der Konsensusklassifikation, so sieht man, dass hoch virulente bakterielle Erreger für 38% der periprothetischen Gelenkinfektionen der periprothetischen Membranen des Typ II verantwortlich gemacht werden, wohingegen sie bei Typ III in nur 12% der Fälle als Ursache für die Infektion gelten (Abbildungen 15, 16). Niedrig virulente bakterielle Erreger und Mischinfektionen mit niedrig virulenten bakteriellen Erregern werden bei Typ III in insgesamt knapp 70% der periprothetischen Gelenkinfekte nachgewiesen. Bei Typ II sind niedrig virulente bakterielle Erreger und Mischinfektionen mit 56% nicht so häufig für den periprothetischen Gelenkinfekt verantwortlich.

Das unterschiedliche Erregerspektrum bei dem Kombinierten Typ (Typ III) im Vergleich zum Infektiösen Typ (Typ II) könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die Präsenz von Abriebpartikeln und die damit verbundene Makrophagenaktivierung ein anderes Erregerspektrum angelockt wird. Die Beobachtung, dass ein unterschiedliches Erregerspektrum bei den verschiedenen Typen der Konsensusklassifikation vorzufinden ist, könnte auch wegweisend bei der histopathologischen Keimspezifizierung sein. Das hier untersuchte Gesamtkollektiv war ebenfalls klein und die Größen der Einzelkollektive sehr unterschiedlich.

5.9. Vergleich der Ergebnisse der identifizierten CD15 positiven neutrophilen Granulozyten mittels CD15-Fokus-Score und mittels „CD15-Quantifier“.

Die Aussagekraft der Ergebnisinterpretation ist durch einige Faktoren eingeschränkt. Wie bereits im Material- und Methoden-Teil beschrieben, konnte nicht sichergestellt werden, dass bei der Anwendung der beiden Methoden exakt der gleiche Fokus analysiert wurde, da dies aus organisatorischen Gründen zum gegebenen Zeitpunkt nicht möglich war. Auch dieses Kollektiv war relativ klein. Nur bei einem von 19 Fällen ist die Diskrepanz der Zellauszählung durch unterschiedliche Modi so groß, dass sie zu

einer unterschiedlichen Diagnose geführt hat. Dies macht 0,05% am Gesamtkollektiv aus und ist als geringfügig einzustufen. Wie man aus Abbildung 24 entnehmen kann, sind bei dem betroffenen Präparat (Eingangsnummer: 36268/13) zahlreiche Hintergrundreaktionen vorhanden, die für die Software schwierig von den neutrophilen Granulozyten abzugrenzen sind. Besonders bei den Präparaten, bei denen ein höherer Schwierigkeitsgrad vorliegt, kommt es zu einer größeren Diskrepanz der ausgezählten Zellen zwischen den beiden angewandten Verfahren.

Im Durchschnitt weicht die Anzahl der CD15 positiven neutrophilen Granulozyten pro Fokus (ermittelt mit CD15-Fokus-Score) um nur 34 Zellen von dem ermittelten Wert des „CD15 Quantifiers“ ab. Es wurde der Mann-Whitney-U-Tests angewandt, um zu überprüfen, ob ein Unterschied bei der Ermittlung der Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten einerseits mit Hilfe des „CD15-Fokus-Scores“ und andererseits mit Hilfe des „CD15-Quantifiers“ besteht. Das Ergebnis zeigte, dass kein signifikanter Unterschied besteht. Die Abweichung der ermittelten Zellzahlen durch die Anwendung der beiden Verfahren ist als geringfügig anzusehen. Je mehr Zellen auszuzählen sind, umso mehr Zeit benötigt der Quantifier. Bei diesem Datenkollektiv braucht der „CD15 Quantifier“ maximal 32,7 Sekunden, um ein Präparat auszuwerten. Dieses Präparat ist in Abbildung 25 dargestellt. Auch bei diesem Präparat sind die neutrophilen Granulozyten aufgrund von technisch bedingten Artefakten wie Schnittdehiszenzen, Spaltraumbildungen, Überlagerungen von Schnittpräparatanteilen und/ oder unspezifischen Hintergrundreaktionen schwer zu detektieren. Diese Veränderungen sind auch bei einer standardisierten und apparativ durchgeführten immunhistochemischen Färbung ein konstantes Phänomen. Trotz des hohen Schwierigkeitsgrades ermittelt der „CD15-Quantifier“ in knapp 33 Sekunden eine Anzahl an CD15 positiven neutrophilen Granulozyten (275 Zellen), die sich um nur 62 Zellen von dem Ergebnis der morphometrisch gestützten Auszählung (213 Zellen) unterscheidet. Innerhalb dieses Zeitfensters kann ein Pathologe nicht über 200 Zellen auszählen.

5.10. Die Vorzüge und eventuellen Nachteile des CD15-Fokus-Scores

5.10.1. CD15 Expression in der periprothetischen Membran/ Neosynovialitis und die Ermittlung des „CD15 Fokus Scores“

Die oben (Kapitel 5.1.) dargestellte Expression von Oberflächenmerkmalen auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten/ Makrophagen ist hilfreich bei der Interpretation der Vorzüge und eventuellen Nachteile der in dieser Arbeit angewandten CD15-Fokus-Scores, um einen periprothetischen Gelenkinfekt zu diagnostizieren. Zum einen zeigt sich, dass die CD15 Expression linienspezifisch ist. Bei entzündlichen Prozessen werden durch die immunhistochemische Anfärbung von CD15 positiven Oberflächenmerkmalen fast ausschließlich Zellen der myeloischen Reihe sichtbar gemacht. Dabei werden die neutrophilen Granulozyten am intensivsten gefärbt. Sie weisen eine intensive grobe granuläre Reaktivität mit Überdeckung von Zellkern und Zytoplasma auf. Dieses Färbungsprofil ist auf die oben beschriebene Expression von CD15 auf der Zelloberfläche und auf die Färbung der intrazellulär liegenden Granula zurückzuführen. Bei den Makrophagen ist die Expression von CD15 als Oberflächenmerkmal nicht so stark ausgeprägt. Diese Zellen weisen deswegen bei der immunhistochemischen Färbung unter der Verwendung von Anti-CD15-Antikörpern eine schwächere bräunliche Reaktivität ohne vollkommene Überdeckung von Zellkern und Zytoplasma auf. Dieses Verteilungsmuster wurde bislang nur in Zelllinien wie bei Knapp et al. 1989 und nicht in Geweben und speziell nicht in der periprothetischen Membran (Abbildung 19) beschrieben. Auch können, wie in der Literatur von Munro et al. 1992 beschrieben, eosinophile Granulozyten durch die Verwendung von Anti-CD15-Antikörpern sichtbar gemacht werden, da aber, wie im Material- und Methoden-Teil erläutert, zuerst das H.E. gefärbte Präparat begutachtet wird, kann dort eine Ansammlung von eosinophilen Granulozyten ausgeschlossen werden. Bei der nachfolgenden Analyse der immunhistochemisch gefärbten Präparate können die angefärbten Zellen zweifelsfrei identifiziert werden. Neutrophile Granulozyten, die in den Kapillaren um den Entzündungsherd CD15 exprimieren, nehmen an der Margination teil. Diese Margination ist ein wichtiger Prozess, der kurz nach Beginn der Entzündungsreaktion stattfindet. In dem Moment, in dem die neutrophilen Granulozyten die Gefäße verlassen, gehen sie von der sialylierten Form in die unsialyierte Form über. Durch den dargestellten Entzündungsprozess wird deutlich, dass bei der Fragestellung

dieser Arbeit unter Anwendung des CD15-Fokus-Scores sowohl die extravasalen wie auch die intravasalen neutrophilen Granulozyten mitgezählt werden müssen.

5.10.2. Einschränkungen, die sich durch die Verwendung des CD15-Fokus-Score ergeben

Im Folgenden werden Einschränkungen, die sich durch die Verwendung von Anti-CD15-Antikörpern sowie durch die Bestimmung der Quantität der neutrophilen Granulozyten bei dieser Fragestellung ergeben, erläutert.

5.10.2.1. Einschränkungen durch die Verwendung von Anti-CD15-Antikörpern

Auch wenn neutrophile Granulozyten und Makrophagen im entzündlichen Gewebe eine unterschiedliche Morphologie aufweisen, so sind diese beiden Entzündungszellen für einen nicht ganz so erfahrenen Pathologen schwer zu unterscheiden. In periprothetischen Membranen, die z.B. dem kombinierten Typ (Typ III) nach den Kriterien der Konsensusklassifikation entsprechen, liegt neben einer entzündlichen Genese eine Partikelerkrankung vor. Durch die Entzündung werden primär neutrophile Granulozyten angezogen, durch die Abriebpartikel primär Makrophagen, sodass sich bei der histologischen Untersuchung einer solchen periprothetischen Membran neben neutrophilen Granulozyten auch Makrophagen finden. Je nach Qualität der Färbung kann die Ermittlung des CD15-Fokus-Scores falsch sein, da neutrophile Granulozyten und Makrophagen nicht unterschieden werden können.

5.10.2.2. Einschränkungen, die sich durch die Quantität von neutrophilen Granulozyten ergeben

Es gibt einige Erkrankungen, die mit einer Reduktion von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten einhergehen [Valle et al. 2013]. Patienten, die an einem Typ-1-Diabetes mellitus leiden, haben in den Jahren vor dem Ausbruch sowie zu Beginn der Erkrankung eine signifikante Neutropenie [Valle et al. 2013]. Diese Neutropenie wurde sowohl bei Kindern wie auch bei Erwachsenen festgestellt und ist ein Hinweis auf eine chronische virale Infektion, die der Entstehung des Typ-1-Diabetes oft vorausgeht [Valle et al. 2013]. Es sollte bedacht werden, dass alle Erkrankungen, die mit einer verminderten oder erhöhten Anzahl an peripheren neutrophilen Granulozyten

einhergehen, zu einer Einschränkung des CD15-Fokus-Scores bei der Diagnose des periprothetischen Gelenkinfekts führen kann.

5.10.3. Die Bedeutung des CD15-Fokus-Scores

Da entzündliche Veränderungen heterogen ausgeprägt sind, wird bei der pathologischen Auswertung das Prinzip des „worst area grading“ verfolgt [Krenn et al. 2005]. Das bedeutet, dass das Areal, welches am stärksten entzündlich verändert ist, zur Beurteilung herangezogen wird. Der CD15-Fokus-Score bietet somit eine optimale Methode, das Prinzip des „worst area grading“ bei der histopathologischen Auswertung der periprothetischen Membranen anzuwenden. Abgesehen von Sensitivität, Spezifität und den prädikativen Werten, welche ein Maß für die Güte des Testverfahrens sind, gibt es noch weitere Argumente, die für die Anwendung des CD15-Fokus-Scores sprechen. Zum einen wäre der Punkt der Zeiteffizienz zu nennen. Es ist weniger zeitaufwendig, neutrophile Granulozyten in einem Gesichtsfeld statt in mehreren Gesichtsfeldern zu zählen. Zeiteinsparend ist auch die einfache Anwendung des Quantifizierungsmodus. Im Gegensatz zu der bisher angewandten Diagnostik von Morawietz et al. 2009 werden pro Fokus alle neutrophilen Granulozyten gezählt. Man muss weder zwischen intra- und extravasalen Zellen unterscheiden, noch muss man einen Maximalwert wie etwa 10 neutrophile Granulozyten pro HPF nach Morawietz et al. 2009 beachten. Durch die Definition eines einzigen Fokus im Areal der maximalen Entzündungsreaktion müssen weder 10 HPF willkürlich gewählt werden noch kann es zu einer wiederholten Einstellung desselben HPF kommen. Somit ist die Verfälschung des Ergebnisses durch ein einfacheres Anwendungsverfahren minimiert.

Ein High-Power-Field ist ein durch das Mikroskop sichtbarer Ausschnitt bei 400facher Vergrößerung des Präparates, es wird das 40er Objektiv verwendet. Der Präparatausschnitt ist dabei 0,3 x 0,25 mm groß (0,075 mm²). Bei der Anwendung des CD15-Fokus-Scores wird ein 20er Objektiv verwendet. Der Präparatausschnitt beträgt dabei 0,6 x 0,5 mm (0,3mm²). Mit dem eingestellten Fokus kann man also einen größeren Präparatausschnitt als mit einem eingestellten High-Power-Field begutachten und somit einen besseren Eindruck von den Gewebeveränderungen gewinnen.

Einer der größten Vorzüge des CD15-Fokus-Scores ist, dass durch seine Evaluierung eine für die Infektionsdiagnostik relevante Software erarbeitet werden konnte, welche

eine Vereinfachung der zeitkonsumierenden und konzentrationsintensiven diagnostischen Zellquantifizierung ermöglicht.

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

Die Auswertung histologischer Schnittbilder, insbesondere die Quantifizierung von immunhistochemisch gefärbten Präparaten durch den Pathologen unterliegt einer hohen Intra- und Interobserver-Variabilität. Hier versprechen computergestützte Verfahren eine höhere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit. Sie stellen ein korrigierbares, lernfähiges Diagnostikum dar. Das Gebiet der automatisierten Mikroskopbildanalyse ist zwar seit vielen Jahrzehnten ein aktives Forschungsfeld, seine Bedeutung nahm aber besonders in den vergangenen Jahren durch die Verfügbarkeit von Computer, Mikroskopkameras und Slide-Scannern zu [Wienert et al. 2012]. Mit diesem Equipment ist der Pathologe nun im Stande, hoch qualitatives digitalisiertes histologisches Datenmaterial zu erzeugen, aufzuarbeiten und zu analysieren. Durch diese veränderten Rahmenbedingungen ist das Interesse der klinischen Pathologen an neuen Verfahren, die eine Standardisierung bei der Diagnostik von Zell- und Gewebeproben gewährleisten, gewachsen [Wienert et al. 2012].

Durch den vermehrten Einsatz von prognostischen Markern, mit deren Hilfe man unter anderem eine Aussage über die Prognose der Erkrankung oder einen Therapieerfolg machen kann, ist eine Standardisierung der Auswertung erforderlich [Wienert et al. 2012]. Die PC-assistierte Diagnostik wird beispielsweise bei der Expression von KI-67 im Zusammenhang mit Brustkrebs angewendet [Wienert et al. 2013]. Bei KI-67 handelt es sich um ein humanes Protein, das streng mit der Zellproliferation assoziiert ist. Während der Interphase kann es nur im Zellkern detektiert werden. In allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2, Mitose) wird es auch auf der Oberfläche der Chromosomen exprimiert und kann dort mit Hilfe von KI-67-Antikörpern nachgewiesen werden. Da es sowohl auf der Oberfläche von gesunden wie auch auf Tumorzellen exprimiert wird, gilt es als exzellenter Marker, um die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation festzulegen [Scholzen et al. 2000, Gong et al. 2013]. Bei der Quantifikation des Tumor-Proliferationsindexes gemessen an der KI-67 Immunhistochemie wird der Anteil der tumorösen Zellen im Verhältnis zu den gesunden Zellen gemessen. Das Verteilungsmuster der KI-67 Expression gibt im Zusammenhang

mit dem Mammakarzinom Auskunft über klinisch-pathologische Eigenschaften des Tumors sowie über seine Prognose [Gong et al. 2013]. Tumorzellen und deren Zellkerne sind sehr heterogen in Größe und Form. Würde man hier eine allgemeine Kontur festlegen, welche typisch für die zu detektierende Zelle bzw. den Zellkern ist, so würden insbesondere hochgradig veränderte Zellen nicht erfasst werden [Wienert et al. 2012]. Bei dem neusten Stand der Softwareentwicklung handelt es sich um eine konturbasierte Zelldetektion. Die Detektion von Zelle und Zellkern erfolgt unabhängig von der Form und richtet sich nach der Kontur der Zelle, die sich an dem Farbgradienten orientiert. Das Verfahren respektiert die Formeigenschaften der zu untersuchenden Zellen [Wienert et al. 2012, Wienert et al. 2013].

Der „CD15-Quantifier“ ermöglicht eine höchst standardisierte histopathologische Auswertung der periprothetischen Membran bzw. der Neosynovialitis. Da die Anzahl an neutrophilen Granulozyten ein entscheidendes diagnostisches Kriterium bei der Unterscheidung zwischen aseptischer und septischer Prothesenlockerung ist, kann eine falsch ermittelte Quantität an Entzündungszellen zu einer falschen Diagnose führen. Die Begutachtung der immunhistochemischen Schnittpräparate stellt einen konzentrations- und arbeitsaufwendigen Prozess dar, der viel Erfahrung benötigt. Die Unterscheidung zwischen CD15 positiven neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ist bei manchen Präparaten höchst anspruchsvoll und für einen noch nicht so erfahrenen Pathologen schwierig. Durch den „CD15-Quantifier“ ist eine verlässliche Diagnose auch für einen noch nicht so erfahrenen Pathologen möglich. Bei einer Thematik wie der Endoprothesenpathologie, wo die interdisziplinäre Zusammenarbeit unerlässlich ist, um eine periprothetische Gelenkinfektion zu diagnostizieren, ist ein standardisierter Quantifizierungsmodus sehr willkommen. Der Orthopäde konnte sicher sein, dass die histopathologische Diagnose unter Einsatz des „CD15-Quantifiers“ einer geringeren Interobserver-Variabilität unterliegt. Im Vergleich zur mikrobiologischen Untersuchung ist der „CD15-Quantifier“ sehr zeiteffizient. Bei Verdacht auf einen periprothetischen Gelenkinfekt mit einem niedrig virulenten bakteriellen Erreger muss eine Probe mindestens 14 Tage kultiviert werden. Bei der histopathologischen Begutachtung vergehen ab dem Moment der Probeentnahme bis zum Stellen der histopathologischen Diagnose etwa 48 Stunden. Diese Zeitspanne beinhaltet die immunhistochemische Färbung mit Anti-CD15-Antikörpern und die histopathologische Analyse unter Anwendung des „CD15-Quantifiers“. Wie man aus dem Ergebnisteil

entnehmen kann, dauert das Auszählen der Zellen mit Hilfe des Quantifiers nur etwa 10-40 Sekunden.

Die neuen Bild-Analyse-Verfahren werden die Arbeit der Pathologen nicht ersetzen, aber sie unterstützen den Pathologen, die diagnostische Präzision zu steigern [Wienert et al. 2013].

6. Verzeichnis

6.1. Literaturverzeichnis

Aggarwal VK, Bakhshi H, Ecker NU, Parvizi J, Gehrke T, Kendoff D. Organism profile in periprosthetic joint infection: pathogens differ at two arthroplasty infection referral centers in Europe and in the United States. *J Knee Surg* 2014;51:14-18

Albrechtsen M, Kerr MA. Characterization of human neutrophil glycoproteins expressing the CD15 differentiation antigen: 3-fucosyl-N-acetyllactosamine. *Br J Haematol* 1989;72:312-320

Anderson DC, Miller LJ, Schmalstieg FC, Rothlein R, Springer TA. Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: structure-function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies. *J Immunol* 1986;137(1):15-27

Andre F, Dieci MV, Dubsky P, Sotiriou C, Curigliano G, Denkert C, Loi S. Molecular pathways: involvement of immune pathways in the therapeutic response and outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(1):28-33

Athanasou NA, Pandey R, de Steiger R, McLardy Smith P. The role of intraoperative frozen sections in revision total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:1433-1434.

Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DWM, Simpson H, Peto TEA, McLardy-Smith P, Berendt AR. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10):2932-2939

Bärlocher F. *Biostatistik: Praktische Einführung in Konzepte und Methoden*. 1.Aufl. New York, Stuttgart: Georg Thieme Verlag;1999

Banit DM, Kaufer H, Hartford JM. Intraoperative frozen section analysis in revision total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2002;401:230-238

Berg EL, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC, Magnani JL. A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(x) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J Biol Chem* 1991;266(23):14869-72.

Böcker W, Denk H, Heitz U, Moch H. *Pathologie*. 4.Aufl. München, Jena: Urban&Fischer;2008

Bogut A, Niedzwiadek J, Koziol-Montewka M, Strzelec-Nowak D, Blacha J, Mazurkiewicz T, Marczyński W, Plewik D. Staphylococcus epidermidis and staphylococcus warneri small-colony variants associated with prosthetic joint infections. J Med Microbiol 2014;63(2):176-185.

Bos I. Gewebereaktionen um gelockerte Hüftgelenkendoprothesen. Orthopäde 2001;30(11):881-889

Braun B. Knie- und Hüft- (Total-) Endoprothesen 2008 bis 2012. HKK Gesundheitsreport 2013.

Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interaction: the attributes of virulence. J Infect Dis 2001;184:337-44

Caselitz FH, Freitag V. Halbflüssiges Kombinationsmedium (TVLS-Medium) zur Züchtung anaerober Bakterien. Aerztl Lab 1969;15: 426–430

Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Urena EOG, Mandrekar JN, Osmon DR, Lough LE, Pritt BS, Steckelberg JM, Patel R. Rapid molecular microbiologic diagnosis of prosthetic joint infection. J Clin Microbiol 2013;51(7):2280-2287

Chacko BK, Kramer PA, Ravi S, Johnson MS, Hardy RW, Ballinger SW, Darley-Usmar VM. Methods for defining distinct bioenergetic profiles in platelets, lymphocytes, monocytes and neutrophils and the oxidative burst from human blood. Lab Invest 2013;93:690-700

Chan JKC, Ng CS, Hui PK. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. Histopathology 1988;12:461-480

Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, Berit M, Pfitzner BM, Salat C, Loi S, Schmitt WD, Schem C, Fisch K, Darb-Esfahani S, Mehta K, Sotiriou C, Wienert S, Klare P, André F, Klauschen F, Blohmer JU, Krappmann K, Schmidt M, Tesch H, Kümmel S, Sinn P, Jackisch C, Dietel M, Reimer T, Untch M, Loibl S. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. 2014 in Vorbereitung.

Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, von Törne C, Weichert W, Engels K, Solbach C, Schrader I, Dietel M, von Minckwitz G. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. J Clin Oncol 2010;28(1):105-113

Dinneen A, Guyot A, Clements J, Bradley N. Synovial fluid white cell and differential count in the diagnosis or exclusion of prosthetic joint infection. Bone Joint J 2013;95-B:554-7

Dramis A, Aldlyami E, Grimer RJ, Dunlop DJ, O'Connell N, Elliott T. *Int Orthop* 2009;33:829-833

Ethgen O, Bruyère O, Richy F, Dardennes C, Reginster J-Y. Health-related quality of life in total hip and total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg* 2004;86-A:963-974

Feldman DS, Lonner JH, Desai P, Zuckerman JD. The role of intraoperative frozen sections in revision total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:1807-1813

Fink B, Gebhard A, Fuerst M, Berger I, Schäfer P. High diagnostic value of synovial biopsy in periprosthetic joint infection of the hip. *Clin Orthop relat Res* 2013;471:956-964

Fink B, Makowiak C, Fuerst M, Berger I, Schäfer P, Frommelt L. The value of synovial biopsy, joint aspiration and C-reactive protein in the diagnosis of late peri-prosthetic infection of total knee replacements. *J Bone Joint Surg (Br)* 2008;90-B-874-8

Forsyth KD, Simpson AC, Levinsky RJ. CD15 antibodies increase neutrophil adhesion to endothelium by an LFA-1-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 1989;19(7):1331-4

Frommelt L. Prinzipien der Antibiotikabehandlung bei periprothetischen Infektionen. *Orthopäde* 2004;33:822-826

Gadhoum SZ, Sackstein R. Lewis x/CD15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity. *Nat Chem Biol* 2008;4(12):751-757

Gentzsch C, Kaiser E, Plutat J, Sellckau R, Wodtke J, Delling G. Zytokin-Expressionsprofil aseptisch gelockerter Femurschaftprothesen. *Pathologe* 2002;23:373-378

Gong P, Wang Y, Liu G, Zhang J, Wang Z. New insight into Ki67 expression and the invasive front in breast cancer. *PLoS ONE* 2013;8(1):e54912

Haas H, Grifka J, Günther KP, Heller KD, Niethard FU, Windhagen H, Ebner M, Mittelmeier W. *Zertifizierung von Endoprothetischen Versorgungszentren in Deutschland*. 1 Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag;2013

Harrasser N, Lenze U, Pohlig F. Periprosthetic joint infection: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl* 2012;117:7-8

Hillienhof A. Zahl der Operationen auf Rekordhoch. *Dtsch Arztebl* 2013;110(44):A 2048

Ince A, Rupp J, Frommelt L, Katzer A, Gille J, Löhr JF. Is „aseptic“ loosening of the prosthetic cup after total hip replacement due to nonculturable bacterial pathogens in patients with Low-Grade Infection? *Clin Infect Dis* 2004;39:1599–603

Kafil HS, Mobarez AM, Moghadam MF. Adhesion and virulence factor properties of Enterococci isolated from clinical samples in Iran. *Indian J Pathol Microbiol* 2013;56:238-242

Kerr MA, Stocks SC. The role of CD15-(LeX)-related carbohydrates in neutrophil adhesion. *Histochem J* 1992;24:811-826

Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEKr. *Leucocyte Typing IV*. 1 Aufl.Oxford: Oxford University Press;1989

Krenn V, Kretzer JP, Thomas P, Thomsen M, Usbeck S, Scheuber L, Boettner F, Rütter W, Schulz S, Zustin J, Huber M. Update on endoprosthesis pathology: Particle algorithm for particle identification in the SLIM. *Semin Arthroplasty* 2013:265-275

Krenn V, Morawietz L, Burmester GR, Häupl T. Synovialitis-Score: Histopathologisches Graduierungsschema rheumatischer und nicht-rheumatischer Synovialitiden. *Z Rheumatol* 2005;64:334-342

Krenn V, Morawietz L, Kienapfel H, Ascherl R, Matziolis G, Hassenpflug J, Thomsen M, Thomas P, Huber M, Schuh C, Kendoff D, Baumhoer D, Krukemeyer MG, Perino G, Zustin J, Berger I, Rütter W, Poremba C, Gehrke T. Erweiterte Konsensusklassifikation: Histopathologische Klassifikation von Gelenkendoprothesen-assoziierten Erkrankungen. *Z Rheumatol* 2013;72:383-392

Krenn V, Otto M, Morawietz L, Hopf T, Jakobs M, Klauser W, Schwantes B, Gehrke T. Histopathologische Diagnostik in der Endoprothetik: Periprothetische Neosynovialitis, Hypersensibilitätsreaktionen und Arthrofibrose. *Orthopäde* 2009;38:520-530

Krenn V, Rütter W. *Pathologie des Bewegungsapparates*. 2.Aufl.Berlin: De Gruyter Verlag;2012

Kriegsmann J, Hopf T, Jacobs D, Arens N, Krenn V, Schmitt-Wiedhoff R, Kriegsmann M, Heisel C, Biehl C, Thabe H, Schmitz R.P.H, Lehmann M. Molekularpathologische Diagnostik von Gelenkinfektionen. *Orthopäde* 2009;38:531-538

Krismer M, Stöckl B, Fischer M, Bauer R, Mayrhofer P, Ogon M. Early migration predicts late aseptic failure of hip sockets. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78-B:422-6

Krukemeyer MG, Möllenhoff G. *Endoprothetik*. 1.Aufl.Berlin: De Gruyter Verlag;2009

Laffer R, Ruff C. Diagnose und Therapie von Gelenkprotheseninfektionen. *Z Rheumatol* 2006;65:12-17

Liebs TR, Nasser L, Herzberg W, Rütter W, Hassenpflug J. The influence of femoral offset on health-related quality of life after total hip replacement. *Bone Joint J* 2014;96-B:36-42

Lima ALL, Oliveira PR, Carvalho VC, Saconi ES, Cabrita HB, Rodrigues MB. Periprosthetic joint infections. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2013

Lodenkämper H, Stinen G. Therapie anaerober Infektionen. Dtsch Med Wochenschr 1956;81:1226–1231

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. Molekulare Zellbiologie. 4.Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag;2001

Lonner JH, Desai P, Dicesare PE, Steiner G, Zuckerman JD. The reliability of analysis of intraoperative frozen sections for identifying active infection during revision hip or knee arthroplasty. J Bone Joint Surg Am 1996;78:1553-1558

Meißner M. Register für Endoprothesen gestartet. Dtsch Arztebl 2011;108(15):A 813

Morawietz L, Classen RA, Schröder JH, Dynybil C, Perka C, Skwara A, Neidel J, Gehrke T, Frommelt L, Hansen T, Otto M, Barden B, Aigner T, Stiehl P, Schubert T, Meyer-Scholten C, König A, Ströbel P, Rader CP, Kirschner S, Lintner F, Rütter W, Bos I, Hendrich C, Kriegsmann J, Krenn V. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. J Clin Pathol 2006;59(6):591-7

Morawietz L, Gehrke T, Claßen RA, Barden B, Otto M, Hansen T, Aigner T, Stiehl P, Neidel J, Schröder JH, Frommelt L, Schubert T, Meyer-Scholten C, König A, Ströbel P, Rader CP, Kirschner S, Lintner F, Rütter W, Skawara A, Bos I, Kriegsmann J, Krenn V. Vorschlag für eine Konsensus-Klassifikation der periprothetischen Membran gelockerter Hüft- und Knieendoprothesen. Pathologe 2004;25(5):375-384

Morawietz L, Tiddens O, Mueller M, Tohtz S, Gansukh T, Schroeder JH, Perka C, Krenn V. Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. Histopathology 2009;54:847-853

Munro JM, Lo SK, Corless C, Robertson MJ, Lee NC, Barnhill RL, Weinberg DS, Bevilacqua MP. Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes and lymphoid tissues. Am J Pathol 1992;141(6):1397-1408

Niethard F, Malzahn J, Schäfer T. Uneinheitliches Versorgungsgeschehen. Dtsch Arztebl 2013;110(27-28):A 1362-5

Norman-Taylor FH, Palmer CR, Villar RN. Quality-of-life improvement compared after hip and knee replacement. J Bone Joint Surg Br 1996;78-B:74-7

Nowossadeck E. Demographische Alterung und stationäre Versorgung chronischer Krankheiten. Dtsch Arztebl 2012;109(9):151-7

Otto M. Klassifikation bei Protheseninsuffizienz und Partikelbestimmung. Pathologe 2008;29:232-239

Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA. An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. J Clin Pathol 1999;52:118-123

Pap G, Machner A, Rinnert T, Hörler D, Gay RE, Schwarzberg H, Neumann W, Michel BA, Gay S, Pap T. Development and characteristics of a synovial-like interface membrane around cemented tibial hemiarthroplasties in a novel rat model of aseptic prosthesis loosening. *Arthritis Rheum* 2001;44(4):956-963

Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, Bauer TW, Springer BD, Della Valle CJ, Garvin KL, Mont MA, Wongworawat MD, Zalavras CG. New definition for periprosthetic joint infection. *Clin orthop Relat Res* 2011;469:2992-2994

Philpott A, Weston-Simons JS, Grammatopoulos G, Bejon P, Gill HS, Mclardy-Smith P, Gundle R, Murray DW, Pandit H. Predictive outcomes of revision total hip-replacement- A consecutive series of 1176 patients with a minimum 10-year follow-up. *Maturitas* 2014;77(2):185-90.

Püschel W, Stiehl P, Rosenkranz M, Geiler G, Wiesenhaken U, Richter RF. Suitability of experimental antigen-induced arthritis in rabbits as a model of rheumatoid arthritis. *Agents Actions Suppl* 1982;10:243-53

Rader CP, Sterner T, Jakob F, Schütze N, Eulert J. Cytokine response of human macrophage-like cells after contact with polyethylene and pure titanium particles. *J Arthroplasty* 1999;14(7):840-848

Robert Koch Institut Berlin. Anlage 5.1. Richtlinie für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention. München: Urban und Fischer Verlag, 2003:7–8

Rose B, Jeer PJS, Spriggins AJ. *Gamella haemolysans* infection in total hip arthroplasty. *Case Rep Orthop* 2012; Article ID 691703

Ruifrok AC, Johnston DA. Qualification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:291-299

Satoh T, Knowles A, Li MS, Sun L, Tooze JA, Zabucchi G, Spry CJF. Expression of lacto-N-fucopentaose III (CD15)- and sialyl-Lewis X-bearing molecules and their functional properties in eosinophils from patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Immunology* 1994;83:313-318

Schäfer T, Pritzkeleit R, Jeszenszky C, Malzahn J, Maier W, Günther KP, Niethard F. Trends and geographical variation of primary hip and knee joint replacement in Germany. *Osteoarthritis Cartilage* 2013;21(2):279-88

Schinsky MF, Della Valle CJ, Sporer SM, Paprosky WG. Perioperative testing for joint infection in patients undergoing revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90:1869-75

Scholzen T, Gerdes J. The KI-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-322

Schröder P, Boy O, Schleiz W, Dienst R, Reinert C, Sanger V, Schauwecker HH, Siebert W, Scharf HP. Indikationsstellung in der primären Huft und Kniegelenkendoprothetik: Ergebnisse der externen Qualitatssicherung von über 270.000 primären Huft- und Kniegelenkendoprothesen. Orthopäde 2008;37:1016-1026

Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection. Clin Infect Dis 2006;43:961-7

Shan L, Shan B, Graham D, Saxena A. Total hip replacement: a systematic review and meta-analysis on mid-term quality of life. Osteoarthritis Cartilage 2014;22(3):389-40

Siegenthaler W. Blum HE, Klinische Pathophysiologie. 9. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag;2006

Sivadon V, Rottman M, Quincampoix JC, Prunier E, Le Moal M, de Mazancourt P, Hoffmeyer P, Lortat-Jacob A, Piriou P, Judet T, Bernard L, Gaillard JL. Partial atE sequencing of Staphylococcus epidermidis strains from prosthetic joint infections. J Clin Microbiol 2009;47(7):2321-2324

Skubitz KM, Snook RW. Monoclonal antibodies that recognize lacto-N-fucopentaose III (CD15) react with the adhesion-promoting glycoprotein family (LFA-1/HMac-1/gp 150,95) and CR1 on human neutrophils. J Immunol 1987;139(5):1631-9

Spanghel MJ, Masri BA, O'Connell JX, Duncan CP. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. J Bone Joint Surg Am 1999;81-A(5):672-683

Statistisches Bundesamt. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) 2006, Diagnosen und Prozeduren der vollstationären Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2007 (accessed January 13, 2013 at: <http://www.gbe-bund.de/stichworte/DRG.html> ; http://www.gbe-bund.de/gbe10/owards.prc_show_pdf?p_id=13555&p_sprache=d&p_uid=&p_aid=&p_ifd_nr=1#search=%22drg%22)

Statistisches Bundesamt. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) 2007, Diagnosen und Prozeduren der vollstationären Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2008

Statistisches Bundesamt. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) 2008, Diagnosen und Prozeduren der vollstationären Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2009 (accessed January 13, 2013 at: <http://archive.is/PBg5U#selection-1359.0-1359.7>)

Statistisches Bundesamt. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) 2009, Diagnosen und Prozeduren der vollstationären Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2010

Statistisches Bundesamt. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) 2010, Diagnosen und Prozeduren der vollstationären Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2011

Statistisches Bundesamt. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) 2011, Diagnosen und Prozeduren der vollstationären Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2012

Timmermans S, Berg M. The gold standard. the challenge of evidence-based medicine and standardization in health care. 1. Aufl. Philadelphia: Temple University Press;2003

Trampuz A, Hanssen AD, Osmon DR, Mandrekar J, Steckelberg JM, Patel R. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthesis knee infection. *Am J Med* 2004;117:556-562

Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss med wklly* 2005;135:243-251

Trieb K, Heller KD, Wirtz DC. Revisionsendoprothetik des Kniegelenks. 1.Aufl.Berlin, Heidelberg: Springer Verlag;2011

Valle A, Giamporcaro GM, Scavini M, Stabilini A, Grogan P, Bianconi E, Sebastiani A, Masini M. Reduction of circulating neutrophils precedes and accompanies type 1 diabetes. *Diabetes* 2013;62(6):2072-2077

Venkataraman G, Raffeld M, Pittaluga S, Jaffe ES. CD15-expressing nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Histopathology* 2011;58:792-807

Walter G, Bühler M, Hoffmann R. Der zweizeitige septische Hüft-TEP-Wechsel beim periprothetischen Spätinfekt: Frühergebnisse nach Implantation einer modularen reversen Hybridprothese. *Unfallchirurg* 2007;110:537-547

Wienert S, Heim D, Kotani M, Lindequist B, Stenzinger A, Ishii M, Hufnagl P, Beil M, Dietel M, Denkert C, Klauschen F. CognitonMaster: an object-based image analysis framework. *Diagn Pathol* 2013;8:34

Wienert S, Heim D, Saeger K, Stenzinger A, Beil M, Hufnagl P, Dietel M, Denkert C, Klauschen F. Detection and segmentation of cell nuclei in virtual microscopy images: a minimum-model approach. *Sci Rep.* 2012;2:503.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000;80(5):617-653

Zmistowski B, Della Valle C, Bauer TW, Malizos KN. Diagnosis of periprothetic joint infection. *J Orthop Res* 2014;32:98-107

Zmistowski B, Restrepo C, Huang R, Hozack WJ, Parvizi J. Periprothetic joint infection diagnosis. *J Arthroplasty* 2012;27(9):1589-1593

6.2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: „Randwerte“ bei dem Kollektiv mit positivem mikrobiologischen Befund	39
Tabelle 2: Ausreißer bei dem Kollektiv mit negativem mikrobiologischen Befund	39
Tabelle 3: Deskriptive Statistik bei positivem und negativem mikrobiologischen Befund	40
Tabelle 4: Ausreißer bei dem Kollektiv das histopathologisch als negativ für eine Infektion gilt	44
Tabelle 5: Deskriptive Statistik bei Kollektiven die histopathologisch als positiv und negativ für eine Infektion sind	44
Tabelle 6: Deskriptive Statistik bei 50 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten als Grenzwert für einen periprothetischen Infekt	48
Tabelle 7: Hoch und niedrig virulente bakterielle Erreger	50
Tabelle 8: Deskriptive Statistik bei hoch und niedrig virulenten bakteriellen Erregern	53
Tabelle 9: Deskriptive Statistik bei 100 CD15 positiven neutrophilen Granulozyten als Schwellenwert um zwischen hoch und niedrig virulenten bakteriellen Erregern zu unterscheiden.	55
Tabelle 10: Kollektivbeschreibung bei verschiedenem Erregerspektrum bei Typen die histopathologisch als positiv für eine Infektion gelten.	56
Tabelle 11: CD15 positive neutrophile Granulozyten bei der manuellen Auszählung (CD 15-Fokus-Score) und mit Hilfe des "CD15-Quantifiers"	65
Tabelle 12: Verschiedene diagnostische Kriterien einen periprothetischen Infekt zu diagnostizieren, * Fink et al. 2013, **Fink et al. 2008, GS=Goldstandard	82
Abbildung 1: Entwicklung der Anzahl von Hüft- und Knieendoprothesen in Deutschland von 2006-2011; eigene Zusammenstellung, Zahlen aus Statistischem Bundesamt 2007-2012 und Braun et al. (2013)	3
Abbildung 2: Entwicklung der Anzahl von Hüft und Knieendoprothesen-Revisionen in Deutschland von 2006-2011; eigene Zusammenstellung, Zahlen aus Statistischem Bundesamt 2007-2012 und Braun et al. (2013)	3
Abbildung 3: Periprothetische Membran und Neosynovialis bei der radiologischen Darstellung eines Hüftgelenks	8
Abbildung 4: Erweiterte Konsensusklassifikation der Endoprothesenpathologie [Morawietz et al. 2006, Krenn et al. 2013]	10
Abbildung 5: (Strept-) Avidin-Biotin- Complex (ABC)	24
Abbildung 6: Mittelwerte von CD15 positiven neutrophilen Granulozyten bei positivem und negativem mikrobiologischen Befund.	36
Abbildung 7: Mittelwerte von CD15 positiven neutrophilen Granulozyten bei Kollektiven die histopathologisch positiv und negativ für eine Infektion sind	42
Abbildung 8: CD15 positive neutrophile Granulozyten bei Kollektiven die histopathologisch positiv und negativ für eine Infektion sind (Boxplot)	43
Abbildung 9: ROC-Kurve mit Mikrobiologie als Goldstandard	46
Abbildung 10: ROC-Kurve mit Histopathologie als Goldstandard	47
Abbildung 12: CD15 positive neutrophile Granulozyten bei hoch und niedrig virulenten bakteriellen Erregern	53
Abbildung 13: ROC-Kurve bei hoch und niedrig virulenten Erreger	55
Abbildung 14: Erregerspektrum bei Typ II nach der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006]	58

Abbildung 15: Erregerspektrum bei Typ III nach der Konsensusklassifikation [Morawietz et al. 2006] _____	58
Abbildung 16: Periprothetische Membran vom Infektiösen Typ (Typ II) _____	59
Abbildung 17: Periprothetische Membran von Kombinierten Typ (Typ III) _____	60
Abbildung 18: Periprothetische Membran vom Abrieb-Typ (Typ I) _____	60
Abbildung 19: Periprothetische Membran vom Abrieb-Typ (Typ I) _____	61
Abbildung 20: periprothetische membran vom Abrieb-Typ (Typ I) _____	61
Abbildung 21: Periprothetische Membran vom Abrieb-Typ (Typ I), Negativkontrolle _	62
Abbildung 22: Periprothetische Membran vom Abrieb-Typ (Typ I) _____	63
Abbildung 23: Periprothetische Membran vom Infektiösen Typ (Typ II) _____	66
Abbildung 24: Periprothetische Membran vom Infektiösen Typ (Typ II) _____	66
Abbildung 25: Ursachen der septischen Prothesenlösung _____	72

7. Anhang

7.1. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Beatrice Kölbl, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: CD15-Fokus-Score: Ein immunhistochemisch basierter Score sowie die Mitentwicklung einer morphometrischen Software („CD15-Quantifier“) zur Infektionsdiagnostik in der periprothetischen Membran selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7.2. Lebenslauf

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

7.3. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Beatrice Kölbl hat folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Im Druck:

Publikation 1:

Kölbl B, Krenn V, Müller S, Tiemann A, Illinger U. Correlation of histopathology and microbiology: defined criteria of non-specific bacterial infection in synovitis and osteomyelitis improves the diagnostic safety. Pathologe 2014, Abstract, Poster
Beitrag im Einzelnen: Mitwirken bei der immunhistochemischen Färbung und der mikroskopischen Auswertung. Zusammentragen der Daten. Erstellen der statistischen Auswertung. Mitwirken bei Erstellung des Textkörpers. Anfertigung von Mikrophotografien. Erstellung eines Posters.

Publikation 2:

Hopf F, Huber M, Thomsen M, Müller S, **Kölbl B**, Kretzer J, Thomas P, Gehrke T, Krenn V. Particle algorithm for joint implantat-material characterisation in the SLIM with focus on lymphocytic adverse reactions. Pathologe 2014, Abstract, Poster
Beitrag im Einzelnen: Mitgestaltung des Artikels. Mithilfe bei der Literaturrecherche sowie bei der Zusammenstellung des Literaturverzeichnisses. Mitwirken bei der Anfertigung von Mikrophotografien.

Publikation 3:

Krenn V, Hopf F, Müller S, **Kölbl B**. Neoplastische und nicht neoplastische synoviale Erkrankungen: Histopathologische Differentialdiagnostik von Gelenkerkrankungen. Arthritis und Rheuma 2014
Beitrag im Einzelnen: Mitgestaltung des Artikels, Erstellung von Textpassagen, besonders bei „nicht neoplastische synoviale Erkrankungen“. Mithilfe bei der Literaturrecherche sowie bei der Zusammenstellung des Literaturverzeichnisses.

In Vorbereitung:

Publikation 4:

Kölbl B, Wienert S, Dimitriadis J, Kendoff D, Gehrke T, Huber M, Frommelt L, Tiemann A, Saeger K, Krenn V. CD15-Fokus-Score und die Validierung einer morphometrischen Software („CD15-Quantifier“) zur Diagnostik der periprothetischen Infektion. Orthopäde 2014
Beitrag im Einzelnen: Miterstellen des Konzeptes. Mitwirken bei der immunhistochemischen Färbung und der mikroskopischen Auswertung. Mithilfe bei der Validierung der Software bei VMscope GmbH Berlin. Zusammentragen der Daten. Erstellen der statistischen Auswertung. Mitwirken bei Erstellung des Textkörpers und bei der Wahl der verwendeten Fotos.

Publikation 5:

Krenn V, Morawietz L, Kienapfel H, Ascherl R, Hassenpflug GJ, Thomsen M, Thomas P, Huber M, Kendoff D, Baumhoer D, Krukemeyer MG, Perino G, Natsu S, Boettner F, Zustin J, **Kölbl B**, Rütter W, Kretzer JP, Tiemann A, Trampuz A, Frommelt L, Tichilow

R, Söder S, Müller S, Parvizi J, Gehrke T. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. Histopathology 2014
Beitrag im Einzelnen: Literaturrecherche mit dem Fokus der periprothetischen Gelenkinfektion. Mithilfe bei der histopathologischen Auswertung von Infektionspathologischen Fällen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

7.4. Eigene bisherige Arbeit

Semmelweis Universität
Medizinische Fakultät
Asklepios Campus Hamburg

1. Medizinische Abteilung der Asklepios Klinik St.Georg Hamburg
Leiter: Prof. Dr. med. Dirk Müller-Wieland
Konsulent: Frau Dr. rer. nat., Dr. med. vet. J. Haas

Transkriptionsfaktoren als molekulares Target:
Fettleber bei Mäusen mit leberspezifischer Überexpression von
Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP)-1a

Diplomarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades:
Dr. med. Semmelweis

Vorgelegt von Beatrice Kölbl
VI. Studienjahr
Hamburg, 2013

7.5. Danksagung

Mein herzlichster Dank gebührt Herrn Prof. Dr. med. V. Krenn, der mir diese Promotionsschrift ermöglicht hat. Ich danke ihm für die außerordentlich geduldige und intensive Betreuung sowie für seine positiven und motivierenden Worte zu jedem Zeitpunkt.

Ich danke Frau Simone Giak. Ihr Engagement und ihre Unterstützung haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Stephan Wienert von VMscope Berlin für die kompetente Unterstützung und die gute Zusammenarbeit in Berlin.

Ich danke Herrn Jannis Dimitriadis für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Frau Martin aus dem Pathologischen Institut Trier bedanken, die als MTA die immunhistochemischen Färbungen durchführte, mich unterwies und jederzeit für meine Fragen Zeit hatte.

Auch möchte ich Frau Schmidt für ihre sehr engagierte Hilfe danken.

Des Weiteren danke ich Sarah Müller und Julia Schilling für ihre Unterstützung.

Mein innigster Dank gilt meiner Familie, die zu jedem Zeitpunkt für mich da ist.