

НОВЫЙ АЛГОРИТМ ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПЕРИПРОТЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ШКАЛЫ CD15 FOCUS SCORE И КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ CD15 QUANTIFIER

Ф. Кренн¹, Б. Колбель¹, С. Винерт², Ж. Димитриадис³, Д. Кендоф⁴, Т. Герке⁴, М. Хубер⁵, Л. Фроммельт⁴, А. Тиманн⁶, С. Узбек⁷, Ф. Атцродт⁷, К. Зэгер², С.А. Божкова⁸

¹ Центр гистологии, цитологии и молекулярной диагностики, г. Трир, Германия

² Vmscope GmbH, г. Берлин, Германия

³ Университет г. Трира, Германия

⁴ Хелиос Эндо-клиник, г. Гамбург, Германия

⁵ Больница Отто Вагнера, г. Вена, Австрия

⁶ Клиника ортопедии и травматологии, г. Зуль, Германия

⁷ CeratTec GmbH, г. Плохинген, Германия

⁸ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Реферат

Целью настоящего исследования явилась разработка алгоритма для диагностики ППИ на основе нового упрощенного метода (CD15 focus score) подсчета CD15-положительных нейтрофильных гранулоцитов (CD15 НГ) в синовиально-подобной поверхностной мембране (SLIM).

Материал и методы. В исследование включили 91 пациента, у которого во время ревизионных операций на крупных суставах (59 тазобедренных и 32 коленных) были забраны образцы SLIM. Было выполнено микробиологическое исследование полученных образцов тканей. Иммуногистохимическими методами были идентифицированы CD15 НГ. Подсчет количества CD15 НГ проводили разработанным методом в соответствии с принципом максимальной фокусной инфильтрации (CD15 НГ/фокус) в одном поле зрения одинаковой площади (около 0,3 мм²). Для оптимизации исследования был разработан и использован метод автоматического количественного анализа с применением компьютерной программы CD15 Quantifier.

Результаты. Пациенты были разделены на группу ППИ (n = 47) и контрольную группу (n = 44) в соответствии с результатами микробиологического исследования, наличием или отсутствием других клинико-лабораторных признаков инфекционного процесса. Показатель CD15 НГ/фокус в образцах SLIM у пациентов с ППИ был значительно больше, чем в контрольной группе (p < 0,001). Оптимальный диагностический порог для установки диагноза ППИ составил 50 CD15 НГ/фокус.

Чувствительность разработанного метода в сравнении с микробиологическими данными составила 0,83; специфичность – 0,864; точность – 0,846. Установлено, что при CD15 НГ/фокусе более 62 клеток программа CD15 Quantifier всегда проводила анализ образцов быстрее врача, использующего компьютерную морфометрию. При этом применение автоматизированного метода подсчета позволяло врачу сократить время подсчета в среднем на 32 секунды.

Заключение. Гистопатологическая диагностика с применением метода CD15 focus score и программы CD15 Quantifier позволяет достичь стандартизации количественных методов, необходимой для дифференциальной диагностики перипротезной инфекции и асептического расшатывания эндопротеза. В отличие от микробиологической диагностики гистопатологический метод требует меньшего времени, особенно когда есть подозрение на перипротезную инфекцию, обусловленную низковирулентным бактериальным патогеном. Надо отметить, что новые аналитические методы ни в коем случае не заменяют работу врача, но могут помочь повысить точность диагностики и сократить время, затрачиваемое на исследование.

Ключевые слова: метод CD15 focus score, диагностика перипротезной инфекции, автоматический количественный анализ, классификация SLIM-консенсуса

Кренн Ф., Колбель Б., Винерт С., Димитриадис Ж., Кендоф Д., Герке Т., Хубер М., Фроммельт Л., Тиманн А., Узбек С., Атцродт Ф., Зэгер К., Божкова С.А. Новый алгоритм гистопатологической диагностики перипротезной инфекции с применением шкалы CD15 focus score и компьютерной программы CD15 Quantifier. *Травматология и ортопедия России*. 2015;(3):76-85.

Кренн Ф. Trier, Germany, D-54296, Max-Planck-Str. 5; e-mail: v.Krenn@patho-trier.de

Рукопись поступила: 06.07.2015; принята в печать: 20.08.2015

Введение

В соответствии с международными критериями гистопатологическое исследование является составной частью диагностики перипротезной инфекции (ППИ) [6, 18]. Основу данного метода составляет оценка типа воспаления, которая может быть качественной (грануломатозное/негрануломатозное) или количественной (с подсчетом количества нейтрофильных гранулоцитов) [6] (рис. 1), при этом последняя методика приобретает все большее значение в диагностике ППИ [16, 17]. В ряде публикаций показано наличие прямой корреляционной связи между количеством нейтрофильных гранулоцитов (НГ) и наличием бактериальной инфекции, определены диагностические критерии для ППИ [1, 2, 3, 7, 10, 12]. Среди существующих методик подсчета клеток наибольшую значимость для диагностики инфекций продемонстрировал метод определения нейтрофильных гранулоцитов с применением разных видов окрашивания в нескольких полях зрения при микроскопии с большим увеличением – High-Power-Fields (HPF) [1–3, 7, 10, 12].

Целью настоящего исследования являлась разработка алгоритма для диагностики ППИ на основе нового упрощенного метода подсчета нейтрофильных гранулоцитов (CD15 focus score) в SLIM (synovial-like interface membrane = синовиально-подобной поверхностной мембране).

Материал и методы

У 91 пациента (42 женщин, 49 мужчин, средний возраст 67 лет (45–88)) при выполнении ревизионного эндопротезирования крупных суставов (59 тазобедренных и 32 коленных)

интраоперационно в рамках стандартного гистопатологического диагностического обследования были взяты тканевые биоптаты (по 3–6 образцов). Принципы взятия образцов тканей и методология гистопатологической диагностики соответствовали классификации SLIM-консенсуса [6, 8].

Микробиологическая диагностика и характеристика возбудителей. Для повышения диагностической значимости микробиологического исследования образцов перипротезных тканей антибиотики отменяли не менее чем за неделю до операции [13]. Инкубацию полученных материалов проводили в течение 14 дней. Результат исследования считали положительным при выделении одного вида патогена из двух и более образцов [18]. Всех выделенных возбудителей поделили на высоко- и низковирулентные бактерии в соответствии с рекомендациями M. Huber.

Гистопатологическая диагностика. Предварительная обработка полученных образцов тканей, гистохимические и иммуногистохимические исследования проводили в патологическом институте г. Трир (ZHMD-Trier, Germany) с применением сертифицированного оборудования и реактивов. Стандарт качества соответствовал DIN EN ISO/IEC 17020. SLIM-образцы были оценены по классификации консенсуса, в соответствии с которым у 30 пациентов установлена реакция тканей на имплантат I типа, у 32 – II типа, у 16 – III типа, у 13 – IV типа.

Гистохимические исследования. После фиксации в формалине (4%) образцы ткани заливали парафином. Микротомированные срезы толщиной 1–3 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Дополнительно оценивали PAS-реакцию (Periodic Acid-Schiff reaction) для

Оценка лейкоцитарной воспалительной картины

Инфильтрат гранулоцитов

(Нейтрофильные гранулоциты, НГ)

Острая бактериальная инфекция

Чётко выраженный связанный НГ-инфильтрат
Без количественных критериев НГ-инфильтрата
Образование абсцессов
Связанные микроабсцессы
Некрозы
Связанные изъязвления поверхностных клеток
Нодозные скопления фибрина
Мало макрофагов

Гранулематозный инфильтрат

(Эпителиоидные клетки, макрофаги, мультиядерные гигантские клетки, лимфоциты, плазменные клетки, слабойнейтрофильные гранулоциты, НД)

Слабая бактериальная инфекция

Минимальный диффузный НГ-инфильтрат
С количественными критериями НГ-инфильтрата
Оценка по:
Реакции *Chlorazetatesterase*, окраска PAS
тест CD15
Микроабсцессы
Очаговые изъязвления поверхностных клеток
Минимальные скопления фибрина
Малое / умеренное количество макрофагов

Специфические инфекции

Микобактериальная инфекция
Микотические инфекции
Бруцеллез
Сальмонеллез

Рис. 1. Гистопатологическая диагностика инфекции SLIM

определения в тканях гликопротеинов, полисахаридов, некоторых мукополисахаридов, гликолипидов и ряда жирных кислот.

Иммуногистохимические исследования. Иммуногистохимическое окрашивание выполняли в полностью автоматизированной системе (BenchmarkXT, ICH Slide Stainer компании Roche, Ventana Medical Solutions). Срезы депарафинировали с помощью ксилола и этанола. После этого проводили последовательное кондиционирование клеток с помощью Cell-Conditioning 1 (CC1) в течение 8 минут при 95°C, далее – слабое кондиционирование в течение 30 минут. Для специфической идентификации CD15 НГ в качестве первичного антитела использовали готовые к использованию неразбавленные моноклональные антитела мыши – Anti-CD15-антитела (Klon MMA, Roche, Basel, Schweiz). Срезы инкубировали с антителами в течение 32 минут. В качестве хромогена для реакции с пероксидазой применяли DAB (3,3 Diaminobenzidin; DAKO Dänemark). Предварительное добавление H₂O₂ блокировало эндогенную пероксидазу. Окраску проводили гематоксилином (Hämatoxylin по Harris, Surgipath, Richmond, Illinois, USA). В ходе подготовки отрицательных контролей первичные антитела не применяли.

Порядок оценки иммуногистохимически окрашенных срезов. Количественный метод оценки соответствовал принципу максимальной фокусной инфильтрации. Осуществляли поиск наибольшего скопления CD15 НГ, устанавливали фокус с помощью объектива с 20-кратным увеличением. Подсчет клеток в одном поле зрения проводили методом цифрового интерактивного морфометрического анализа с применением микроскопа марки «Leica DM2500» по стандарту Microsystems framework 2007 на увеличении ×200 и разработанного программного обеспечения. Картина на экране монитора соответствовала области гистологического препарата размером 0,6×0,5 мм (0,3 мм²). Микроскопическое поле полностью занимало весь экран. Клетки каждого поля зрения подсчитывали отдельно, а затем складывали. Учитывали как интра- так и экстравакулярно расположенные нейтрофильные гранулоциты. В процессе подсчета крайне важно правильно дифференцировать CD15 НГ с более интенсивными грануляциями от CD15 положительных макрофагов, которые характеризуются более слабой гранулярной реактивностью без полного перекрытия ядра и цитоплазмы.

Новый метод подсчета нейтрофильных гранулоцитов CD15 focus score. Предлагаемый

метод подсчета нейтрофильных гранулоцитов CD15 focus score характеризуется следующими свойствами:

1) подсчет НГ проводят методом световой микроскопии с определением количества клеток в поле зрения;

2) основан на специфическом свойстве НГ – экспрессии CD15;

3) соответствует закону максимального выражения, в результате учитывается проблема гетерогенности воспалительной реакции;

4) оценивают количество интра- и экстравакулярно расположенных НГ, в отличие от опубликованных ранее методов, что значительно облегчает подсчет;

5) разработанная автоматизированная программа упрощает процесс подсчета и существенно снижает трудозатраты.

Предложенный диагностический алгоритм иллюстрирует методику CD15 focus score и применение автоматизированной программы (рис. 2).

Компьютерная программа CD15 Quantifier.

Для автоматизированной оценки гистологических препаратов вместе с компанией VMscore GmbH был адаптирован недавно опубликованный алгоритм на базе платформы CognitionMaster [16]. При этом первоначально из цветной картинки извлекается иммуносигнал (коричневого цвета) с помощью метода деконволюции цвета (Color Deconvolution). В результирующей картине разной интенсивности (оттенки серого) детектируются объекты (т.е. клетки), причем в первую очередь используется градиент интенсивности, чтобы определить локально доминирующую структуру, что более или менее соответствует визуальному восприятию [14]. Детектированные клетки классифицируют как «клетки» и «фон», после чего осуществляется подсчет клеток. Для получения возможности сопоставления получаемых при использовании метода CD15 Quantifier результатов определяют долю площади (Score), которую занимают CD15 НГ. Таким образом, CD15 НГ Score в 100% получают тогда, когда нейтрофильные гранулоциты заполняют все поле зрения.

Для валидации метода CD15 Quantifier использовали определенную группу образцов, в которую были включены гистологические препараты с низким и высоким уровнями сложности. Последние характеризовались такими изменениями, как расхождение срезов (Dehiszenzen), образование зазоров, наложение частиц срезов, неспецифические изменения фона, а также наличие макрофагов. Срезы препаратов были теми же, которые анализировали с помощью метода CD15 focus score.

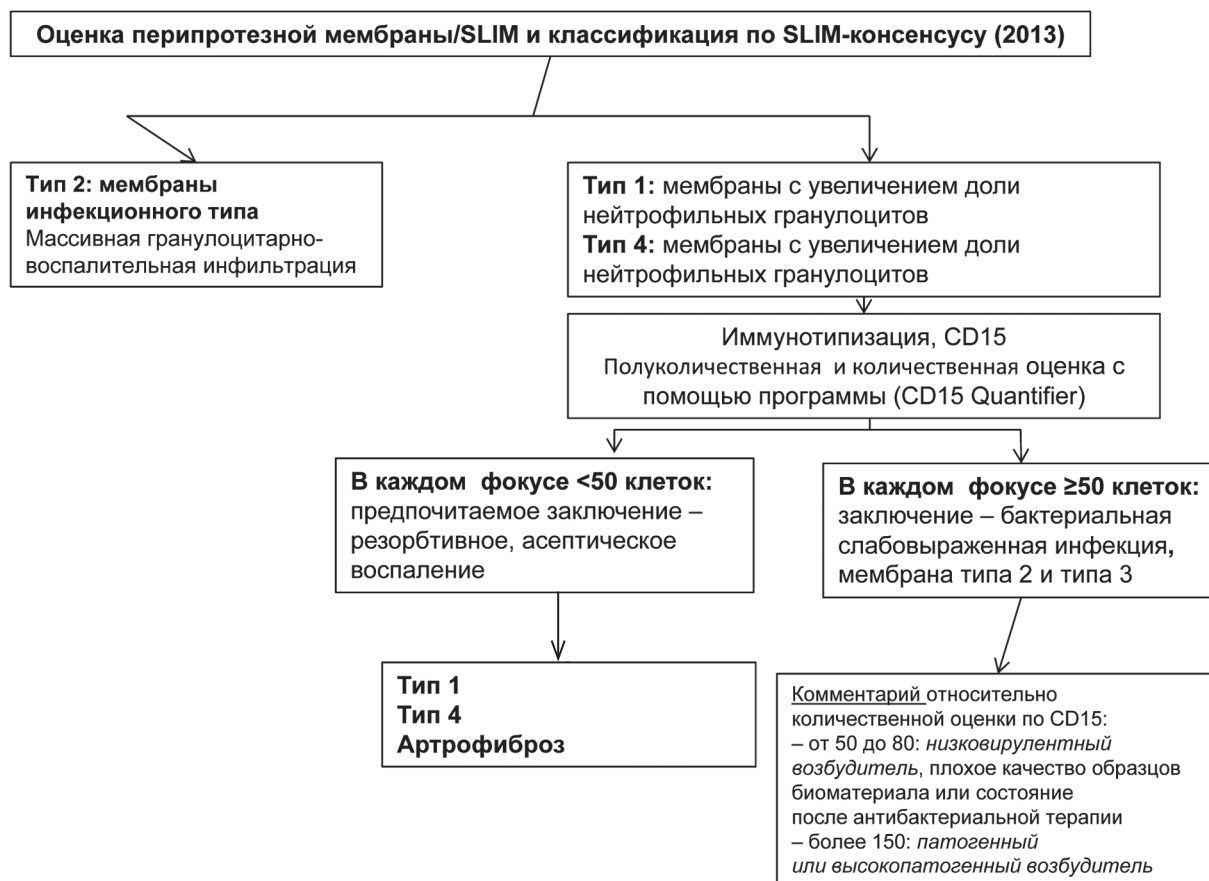


Рис. 2. Алгоритм диагностики перипротезной инфекции с использованием CD15 focus score и компьютерной программы CD15 Quantifier

Статистика. Статистический анализ полученных результатов и построение графических изображений выполняли с помощью SPSS 17 (IBM, SPSS, Chicago, USA). Для визуальной оценки разницы между выборками применяли метод Box-and-Whisker plot (коробчатая диаграмма, «ящик с усами»). Сопоставление количественных признаков между группами сравнения проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни для непарных выборок. Различия принимали за достоверные при $p < 0,05$.

Результаты

Группа с ППИ – положительный микробиологический результат или другие клинико-лабораторные проявления инфекционного процесса. При бактериологическом исследовании тканевых биоптатов у 47 пациентов (23 женщин и 24 мужчин) был установлен положительный рост микрофлоры. Образцы тканей были выделены в 28 случаях из области тазобедренного и в 19 – из коленного суставов. Средний возраст пациентов составил

67 лет (45–88 лет). В большинстве случаев были изолированы низковирулентные возбудители ($n = 29$): *Staphylococcus epidermidis* ($n = 16$), *Staphylococcus capitis* ($n = 2$), *Staphylococcus caprae* ($n = 2$), *Staphylococcus haemolyticus* ($n = 2$), *Propionibacterium acnes* ($n = 5$), *Corynebacterium sp.* ($n = 1$), *Bacillus pumilus* ($n = 1$).

Высоковирулентные микроорганизмы были выделены в 14 случаях: *Staphylococcus aureus* ($n = 1$), представитель стрептококков (*Streptococcus* группы A) ($n = 1$), *Escherichia coli* ($n = 3$), *Enterococcus faecalis* ($n = 2$), *Gemella haemolysans* ($n = 1$) и в 6 случаях было подозрение на высоковирулентные микроорганизмы. У 4 пациентов *S. epidermidis* был выделен в составе микробных ассоциаций с одним из перечисленных микроорганизмов: *Moraxella osloensis*, *Parvimonas micra*, *S. pettenkoferi*, *S. capitis*.

Контрольная группа – отрицательный микробиологический результат и отсутствие клинико-лабораторных признаков инфекционного процесса. У 44 пациентов (19 женщин, 25 мужчин) результаты микробиологических исследований биоптатов были отрицательными. Образцы тканей были выделены в 31 случае

из области тазобедренного и в 13 – коленного суставов. Средний возраст пациентов составил 67 лет (47–84 лет).

CD15 НГ/фокус при положительных и отрицательных микробиологических результатах. Среднее количество CD15-положительных нейтрофильных гранулоцитов в каждом фокусе (CD15 НГ/фокус) для SLIM группы с положительным микробиологическим результатом (n=47) составило 112,5 клеток, что было существенно больше ($p < 0,0001$) аналогичного показателя для SLIM-случаев контрольной группы (n=44) – 21,9 клеток (рис. 3).

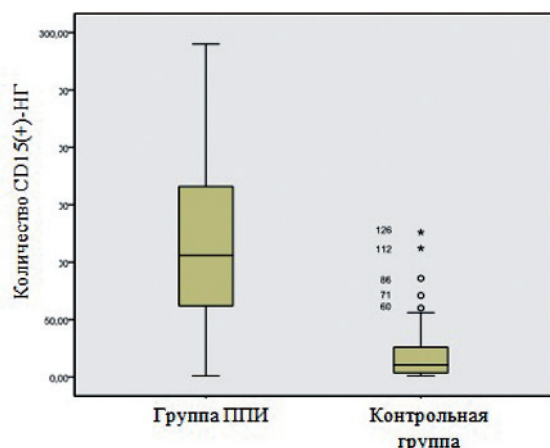


Рис. 3. Количество CD15-положительных нейтрофильных гранулоцитов (CD15(+)-НГ) в зависимости от наличия и отсутствия перипротезной инфекции при использовании метода CD15 focus score (° – умеренные выбросы, * – сильные выбросы)

Определение порогового значения: количество CD15 НГ/фокус, которое является диагностически значимым в случае перипротезной инфекции. Для определения диагностической значимости метода CD15 focus score с пороговым значением для диагностики перипротезной инфекции использовали кривую ROC, методами сравнения были «золотой стандарт» диагностики ППИ – микробиологическое исследование (рис. 4) и критерии классификации по консенсусу (рис. 5). Максимальная сумма из чувствительности и специфичности получилась при пороговом значении 50 по CD15 НГ/фокус. Если сравнивать предлагаемый метод с микробиологическими результатами, то чувствительность составила 0,83, а специфичность – 0,864, суммарное значение – 1,694. Положительное прогностическое значение (PPV): 0,87; отрицательное прогностическое значение (NPV): 0,83; точность: 0,846; площадь под кривой (AUC): 0,878. При сравнении нового метода с критерия-

ми классификации по консенсусу чувствительность составила 0,875, специфичность – 0,93, суммарный показатель – 1,805. PPV: 0,93; NPV: 0,87; точность: 0,901; AUC: 0,944.

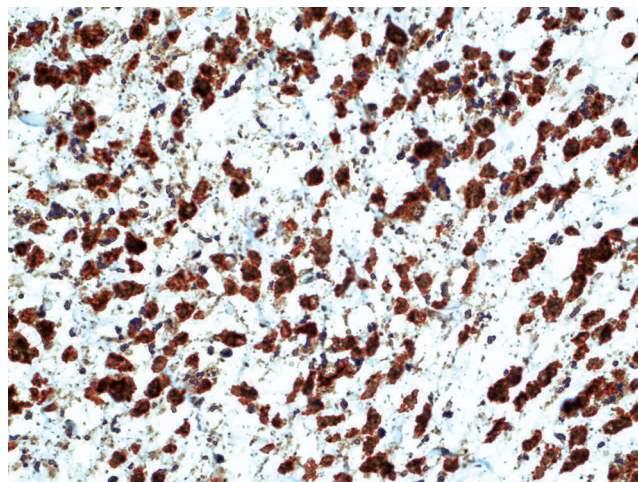


Рис. 4. Микрофото SLIM инфекционного типа (мембрана 2 типа) при положительном микробиологическом результате: 280 CD15-положительных НГ. Иммуногистохимическая окраска (Anti-CD15). CD15 Quantifier-Modus VMscope Berlin. Ув. ×200

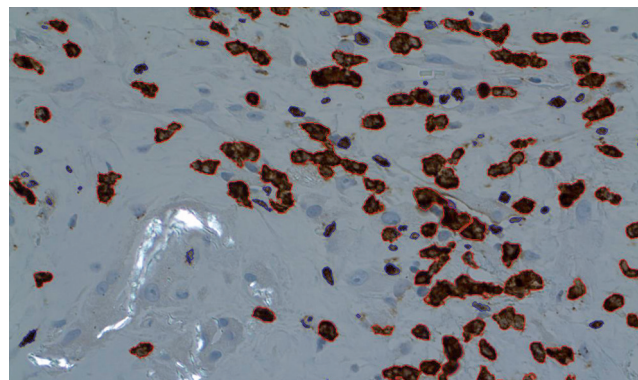


Рис. 5. Микрофото SLIM комбинированного типа (мембрана 3 типа) при положительном микробиологическом результате: 92 CD15-положительных НГ. Иммуногистохимическая окраска (Anti-CD15) и интрацитоплазмальный микрокастичный полиэтилен в анализе POL. CD15 Quantifier-Modus VMscope Berlin. Ув. ×200

Сопоставление CD15 НГ/фокус по методам подсчета: CD15 focus score и CD15 Quantifier. Для этого исследования использовали данные выше описанных групп пациентов. Показано количество CD15 НГ, которое было получено

с помощью компьютерной морфометрии на основе метода CD15 focus score и с применением программы CD15 Quantifier (рис. 6).

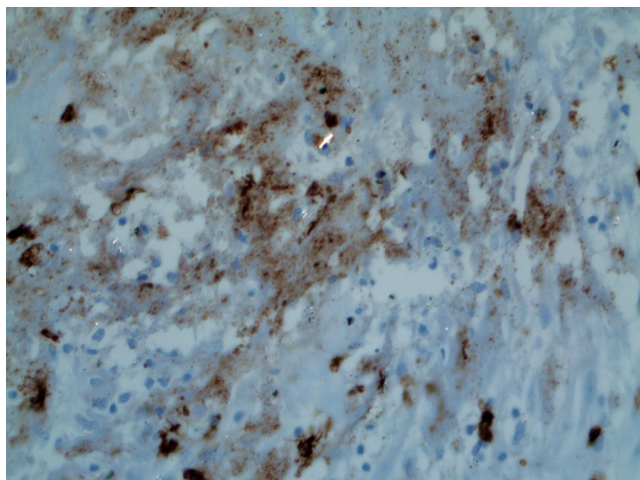


Рис. 6. Микрофото SLIM инфекционного типа (мембрана 2 типа) с интенсивной грубо-гранулярной выраженностью по CD15 в нейтрофильных гранулоцитах и диффузной слабо выраженной тонкогранулярной выраженностью в макрофагах. Ув. $\times 200$

Расчет по методу CD15 focus score проводил опытный врач, который до конца работы не знал результата, полученного с помощью программы CD15 Quantifier.

При пороговом значении CD15 НГ/фокус = 50 ни у одного препарата не было расхождения в количестве клеток между этими двумя методами, которые оказывали бы решающее влияние на диагноз (инфекционный / неинфекционный). Полученное с помощью CD15 focus score количество клеток в среднем отличалось на 12 от количества, определенного с помощью программы CD15 Quantifier. Программе CD15 Quantifier нужно было максимально 32,7 сек. для обработки данных (препарат № 40575/13), а врачу понадобилось 88 сек. (препарат № 72845/13).

Программе CD15 Quantifier нужно меньше времени, чем врачу. При CD15 НГ/фокусе более 62 клеток в образце программа CD15 Quantifier всегда проводила подсчет быстрее врача. Врачу нужно было меньше времени только при исследовании образцов с количеством клеток менее 62, исключение при этом составили препараты № 69176/13 и № 69178/13. В случае, если врач при анализе исследуемой когорты работал с помощью программы CD15 Quantifier, на каждый препарат с CD15 НГ/фокусом более 62 он тратил меньше на 32 сек., чем при использовании компьютерной морфометрии.

Обсуждение

CD15 показатели в нейтрофильных гранулоцитах и в макрофагах. Необходимо специфически оценивать CD15 показатели в НГ. Отличия между CD15 НГ и CD15-положительными макрофагами однозначны из-за четко различающихся целлюлярных картин [4, 11]. CD15 экспрессия в макрофагах до сих пор была доказана только для клеточных линий [4]. В настоящей работе впервые подтвержден этот результат и четко описана целлюлярная картина (см. рис. 6).

Количество CD15 НГ/фокус в иммуногистохимическом анализе. Количественный анализ образцов показал существенные различия ($p < 0,001$) в показателях CD15 НГ/фокус между группами с ППИ и контрольной. Исследованные когорты пациентов не имели существенных отличий по возрасту, полу, количеству и локализации изъятых проб. Определение показателя CD15 НГ/фокус для каждого препарата проверял опытный врач. В результате было установлено, что при гистопатологическом анализе по методу CD15 Focus Score в случае инфекционно-воспалительной этиологии нестабильности определяется существенно большее количество НГ, чем при асептическом расшатывании. Эти результаты хорошо согласуются с данными, которые были получены в подобных условиях [2, 10, 12].

Определение порога метода CD15 focus score. Для оценки значимости результатов метода CD15 focus score с диагностическим порогом в 50 CD15 НГ/фокус полученные результаты сравнили с результатами исследования L. Morawietz с соавторами [10], в связи с тем, что предлагаемая авторами методика характеризуется высокой значимостью в гистопатологической диагностике. Для дифференцировки между асептическим и инфекционным расшатыванием эндопротеза был установлен порог – 23 нейтрофильных гранулоцита на 10 полях зрения под большим увеличением (HPF). Исследование проводили на 147 SLIM-случаях. Таким образом, группа настоящего исследования из 91 пациента соответствует примерно 2/3 численности группы L. Morawietz соавторами [10]. В нашей работе интерпретация результатов основана на одинаковой иммуногистохимической окраске препаратов антителами Anti-CD15 (Klon MMA, Roche, Basel, Schweiz), в то время как L. Morawietz соавторами только часть препаратов обследовали после иммуногистохимической окраски, а в остальных препаратах подсчет НГ проводили после реакции PAS. Для определения специфичности и чувствительности своей методики L. Morawietz соавторами

применяли в качестве «золотого стандарта» клинический и микробиологический диагнозы. В нашем случае методами сравнения были микробиологическое исследование и оценка по классификации консенсуса.

По-видимому, целесообразно привести сопоставление результатов сравнения обеих методик с микробиологическими данными. Специфичность нашего метода диагностики (CD15 focus score) в сравнении с методом, который использовали L. Morawietz с соавторами, была несколько ниже (86,4 и 95% соответственно), а чувствительность – выше (83 и 73% соответственно). Сумма обоих показателей в случае применения метода CD15 focus score составила 1,694 в сравнении с 1,68 по методике, которую применяли L. Morawietz соавторами. Точность диагностики в нашем случае незначительно уступала L. Morawietz соавторами (84,6 и 86%), также как и параметр AUC (0,878 и 0,881 соответственно). Вторым методом сравнения в нашем исследовании была оценка по классификации консенсуса [16]. При этом критерии базируются на методе L. Morawietz с соавторами (23 НГ за 10 HPF). Таким образом, метод CD15 focus score не уступает по качеству диагностики методике, предлагаемой L. Morawietz соавторами, причем сумма параметров чувствительности и специфичности у метода CD15 focus score несколько выше.

Возможности применения метода CD15 focus score. В связи с тем, что воспалительные изменения проявляются неоднородно, при проведении патологического анализа следуют принципу «worst area grading» (классификация по худшей площади), что считается стандартным подходом при диагностике неопластических и воспалительных заболеваний [5, 15]. Метод CD15 focus score также основан на этом принципе диагностики. Кроме высокого качества диагностики, в пользу применения метода CD15 focus score свидетельствуют следующие аргументы:

1) метод существенно экономит время, т.к. исследуется только одно поле зрения.

2) в отличие от предыдущих подходов, счет ведется только в одном фокусе. При этом в отличие от методов, базирующихся на HPF, используется более широкое поле зрения (0,6 мм×0,5 мм = 0,3 мм²), что является более репрезентативным.

3) существенным преимуществом метода является возможность применения автоматизации.

Упрощенная концепция метода CD15 focus score. Развитие компьютеризированной методики диагностического определения количества нейтрофильных гранулоцитов (CD15 Quantifier) стало возможным благодаря упрощенной кон-

цепции метода CD15 focus score, которая, во-первых, показывает высокое качество диагностики, во-вторых, базируется на независимом от локализации модусе подсчета в одном единственном поле зрения максимальной выраженности и, в-третьих, связана с определенным свойством нейтрофильных гранулоцитов.

Заключение

Разработанная программа CD15 Quantifier позволяет проводить стандартизованную гистопатологическую обработку, т.е. диагностику SLIM, благодаря правильно выбранному количественному критерию для дифференцировки между инфекционным и асептическим расшатыванием эндопротеза. В отличие от микробиологической диагностики гистопатологический метод требует меньшего времени, особенно когда есть подозрение на ППИ, обусловленную низковирулентным бактериальным патогеном. Проведенное исследование показало, что автоматизированный анализ образцов с CD15НГ/фокусом более 62 клеток с использованием разработанной компьютерной программы всегда проходит быстрее, чем подсчет клеток врачом методом компьютерной морфометрии. Надо отметить, что новые аналитические методы ни в коем случае не отменяют работу врача, но могут помочь ему повысить точность диагностики и сократить время, затрачиваемое на исследование.

Финансирование

Финансовая поддержка получена со стороны общества «ENDO» (Гамбург, Германия).

Конфликт интересов: не заявлен.

Литература/ References

1. Banit D.M., Kaufer H., Hartford J.M. Intraoperative frozen section analysis in revision total joint arthroplasty. *Clin Orthop.* 2002; (401):230-238.
2. 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 periprosthetic infection of total knee replacements. *J Bone Joint Surg.* 2008; 90-B:874-878.
3. 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.* 2013; 471:956-964.
4. Knapp W. Leucocyte typing IV: white cell differentiation antigens. Oxford ; New York : Oxford University Press, 1989.
5. Krenn V., Morawietz L., Burmester G.R., Kinne R.W., Mueller-Ladner U., Muller B., Haupl T. Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology.* 2006; 49(4):358-364.
6. Krenn V., Morawietz L., Perino G., Kienapfel H., Ascherl R., Hassenpflug G.J., Thomsen M., Thomas P., Huber M., Kendoff D., Baumhoer D., Krukemeyer M.G., Natsu S., Boettner E., Zustin J., Kölbl B., Rütger W., Kretzer J.P.,

- Tiemann A., Trampuz A., Frommelt L., Tichilow R., Söder S., Müller S., Parvizi J., Illgner U., Gehrke T. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract.* 2014; 210(12):779-786.
7. Lonner J.H., Desai P., Dicesare P.E., Steiner G., Zuckerman J.D. 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.
 8. Morawietz L., Classen R.A., Schröder J.H., 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 C.P., Kirschner S., Lintner F., Rütther 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):591-597.
 9. Morawietz L., Gehrke T., Claßen R.A., Barden B., Otto M., Hansen T., Aigner T., Stiehl P., Neidel J., Schröder J.H., Frommelt L., Schubert T., Meyer-Scholten C., König A., Ströbel P., Rader C.P., Kirschner S., Lintner F., Rütther W., Skawara A., Bos I., Kriegsmann J., Krenn V. Vorschlag für eine Konsensus-Klassifikation der periprosthetischen Membran gelockerter Hüft- und Knieendoprothesen. *Pathologie.* 2004; 25(5):375-384.
 10. Morawietz L., Tiddens O., Mueller M., Tohtz S., Gansukh T., Schroeder J.H., 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.
 11. Munro J.M., Lo S.K., Corless C., Robertson M.J., Lee N.C., Barnhill R.L., Weinberg D.S., Bevilacqua M.P. Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes and lymphoid tissues. *Am J Pathol.* 1992; 141(6):1397-1408.
 12. Pandey R., Drakoulakis E., Athanasou N.A. An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *J Clin Pathol.* 1999; 52:118-123.
 13. Ruifrok A.C., Johnston D.A. Qualification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol.* 2001; 23:291-299.
 14. Scholzen T., Gerdes J. The KI-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182:311-322.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Zmistowski B., Della Valle C., Bauer T.W., Malizos K.N. Diagnosis of periprosthetic joint infection. *J Orthop Res.* 2014; 32:98-107.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Крени Ф. – патологоанатом, Центр гистологии, цитологии и молекулярной диагностики, г. Трир, Германия

Колбель Б. – патологоанатом, Центр гистологии, цитологии и молекулярной диагностики, г. Трир, Германия

Винерт С. – патологоанатом, Vmscore GmbH, Берлин, Германия

Димитриадис Ж. – статистик, Университет г. Трира, Германия

Кендоф Д. – хирург, Хелиос Эндо-клиник, Берлин, Германия

Гэрке Т. – хирург, Хелиос Эндо-клиник, Гамбург, Германия

Хубер М. – патологоанатом, Больница Отто Вагнера, г. Вена, Австрия

Фроммельт Л. – микробиолог, Хелиос Эндо-клиник, Гамбург, Германия

Тиманн А. – хирург, Клиника ортопедии и травматологии, г. Зуль, Германия

Узбек С. – КерамТек, г. Плохинген, Германия

Атцродт Ф. – КерамТек, г. Плохинген, Германия

Зэгер К. – Vmscore GmbH, Берлин, Германия

Божкова С.А. – канд. мед. наук заведующая научным отделением профилактики и лечения раневой инфекции и отделением клинической фармакологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России

A NEW ALGORITHM FOR HISTOPATHOLOGICAL DIAGNOSIS OF PERIPROSTHETIC INFECTION USING CD15 FOCUS SCORE AND COMPUTER PROGRAM CD15 QUANTIFIER

V. Krenn¹, B. Kölbl¹, S. Wienert², J. Dimitriadis³, D. Kendoff⁴, T. Gehrke⁴, M. Huber⁵, L. Frommelt⁴, A. Tiemann⁶, S. Usbeck⁷, V. Atzrodt⁷, K. Saeger², S.A. Bozhkova⁸

¹Zentrum für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik, Trier, D-54296 Max-Planck-Str. 5, Germany

²VMscope GmbH, Berlin, D-10117, Charitéplatz, 1, Germany

³Universität Trier, Trier, D-54296 Universität, Germany

⁴HELIOS ENDO-Klinik, Berlin, D-13125, Schwanebecker Chaussee, 50; Hamburg, D-22767, Holstenstr. 2, Germany

⁵Pathologisch-bakteriologisches Institut, Otto Wagner Spital, Vienna, A-1140, Baumgartnerhöhe, 1, Austria

⁶Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, SRH Zentralklinikum Suhl, Suhl, D-98527, Albert-Schweitzer-Straße, 2, Germany

⁷CeramTec GmbH, Plochingen, Plochingen, D-73207, CeramTec-Platz, 1-9, Germany

⁸Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics, ul. Akademika Baykova, 8, St. Petersburg, Russia, 195427

Abstract

Introduction. A simple microscopic diagnostic quantification system for neutrophilic granulocytes (NG) was developed evaluating a single focal point (CD15 focus score) which enables the detection of bacterial infection in SLIM (synovial-like interface membrane). Additionally a diagnostic algorithm is proposed how to use the CD15 focus score and the quantification software (CD15 Quantifier).

Methods. 91 SLIM removed during revision surgery for histopathological diagnosis (hip; n=59 and knee; n=32) underwent histopathological classification according to the SLIM-consensus classification. NG were identified immunohistochemically by means of a CD15-specific monoclonal antibody exhibiting an intense granular cytoplasmic staining pattern. This pattern is different from CD15 expression in macrophages showing a pale and homogenous expression in mononuclear cells. The quantitative evaluation of CD15-positive neutrophils granulocytes (CD15NG) used the principle of maximum focal infiltration (focus) together with an assessment of a single focal point (approximately 0.3 mm²). This immunohistochemical data made it possible to develop CD15 Quantifier software which automatically quantifies CD15NG.

Results. SLIM-cases with positive microbiological diagnosis (n=47) have significantly (p<0.001, Mann-Whitney U test) more CD15NG/focal point than cases with negative microbiological diagnosis (n=44). 50 CD15NG/focal point were identified as the optimum threshold 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, specificity is 0.864. (PPV: 0.87; NPV: 0.83; accuracy 0.846; AUC: 0.878.) The evaluation findings for the preparations using the CD15 Quantifier (n=31) deviated in an average of 12 cells from the histopathological evaluation findings (CD15-focus score). From a cell-count greater 62 CD15 Quantifier needs on average 32 seconds less than the diagnostic pathologist.


Conclusion. The 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. The proposed diagnostic algorithm (how to use the CD15 focus score and the quantification software, CD15 Quantifier) may contribute towards the standardisation for periprosthetic joint infection and diagnosing bacterial infections in the SLIM.

Key words: CD15 focus score, periprosthetic joint infection, automated image analysis, SLIM-Consensus-classification.

Financial support was received for this study from "ENDO" (Hamburg, Germany).

Conflict of interest: none.

 **Cite as:** Krenn V, Kölbl B, Wienert S, Dimitriadis J, Kendoff D, Gehrke T, Huber M, Frommelt L, Tiemann A, Usbeck S, Atzrodt V, Saeger K, Bozhkova SA. [A new algorithm for histopathological diagnosis of periprosthetic infection using CD15 focus score and computer program CD15 Quantifier]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2015; (3):76-85. [in Russian]

 Krenn V. Trier, Germany, D-54296, Max-Planck-Str. 5; e-mail: v.Krenn@patho-trier.de

 Received: 06.07.2015; Accepted for publication: 20.08.2015

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Krenn V. – Pathologist, Zentrum für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik, Trier, Germany

Kölbel B. – Pathologist, Zentrum für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik, Trier, Germany

Wienert S. – Pathologist, VMscope GmbH, Berlin, Germany

Dimitriadis J. – Statistician, Universität Trier, Trier, Germany

Kendoff D. – Surgeon, HELIOS ENDO-Klinik, Berlin, Germany

Gehrke T. – Surgeon, HELIOS ENDO-Klinik, Hamburg, Germany

Huber M. – Pathologist, Pathologisch-bakteriologisches Institut, Otto Wagner Spital, Vienna, Austria

Frommelt L. – Mikrobiologist, HELIOS ENDO-Klinik, Hamburg, Germany

Tiemann A. – Surgeon, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, SRH Zentralklinikum Suhl, Suhl, Germany

Usbeck S. – Scientific consultant, Clinical affairs, CeramTec GmbH, Plochingen, Germany

Atzrodt V. – Scientific consultant, CeramTec GmbH, Plochingen, Germany

Saeger K. – Pathologist, VMscope GmbH, Berlin, Germany

Bozhkova S.A. – Bozhkova Svetlana A. – the head of the research Department of prevention and treatment of wound infection and Department of clinical pharmacology of Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics