

Gewebe CRP Färbung- Ein vielversprechendes diagnostisches Instrument in der mehrzeitigen Revisionsendoprothetik bei periprothetischer Infektion

Seuser A¹, Lau J F², Havenith R³, Randau T M^{1,4}, Wirtz D C¹, Kristiansen G²,

Zugehörigkeiten:

- 1: Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Bonn, Deutschland
- 2: Abteilung für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn, Deutschland
- 3: Abteilung für Dermatologie, Universitätsklinikum Bonn, Deutschland
- 4: Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Augustinerkrankenhaus Köln, Deutschland

Schlüsselwörter: Periprothetische Gelenkinfektion, periprothetische Membranen, diagnostischer Algorithmus für PPI (periprothetische Gelenkinfektion), histopathologische Diagnose von PPI, Gewebemikroarrays, Endoprothetik

Zusammenfassung:

Fragestellung:

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer immunhistochemischer Marker zur Unterscheidung der Infektkonsolidierung und Infektpersistenz in der Therapie komplexer periprothetischer Infektionen, als ein wertvolles histopathologisches Diagnoseinstrument.

Methodik:

Anhand der gängigen Kriterien der ICM erfolgte die retrospektive Aufarbeitung und der Vergleich von 10 Fällen mit persistierender Infektion mit 9 infektfreien Fällen. Es erfolgte die Erstellung von TMAs sowie immunhistochemische Färbungen um verschiedene Marker wie CRP, Kollagen II und IV, PAX 2 und weitere zu untersuchen.

Ergebnisse:

Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Färbungsintensität von CRP, Kollagen II, Kollagen IV und PAX 2 zwischen infiziertem und nicht infiziertem Gewebe. Die Receiver-Operator-Characteristic-Analyse ergab für die Färbeintensität von CRP eine hohe Sensitivität (100%) und Spezifität (90%) bei einem Cut-off von 1,5 im gemittelten Färbescore. Die Färbeintensität von Kollagen II und IV hatte eine Sensitivität von 85%. Der Anteil positiv gefärbter Zellen pro HPF mit PAX 2 zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen infiziertem und nicht infiziertem Gewebe. Die ROC-Analyse hatte eine Sensitivität von 85% und eine Spezifität von ca. 50%.

Schlussfolgerung:

Die periprothetische Infektion ist eine bedeutende Komplikation in der muskuloskelettalen Chirurgie, die mit steigenden Primärimplantationen weiterhin eine wichtige Rolle spielen wird. Die Therapie ist für die Betroffenen eine körperliche wie geistige Herausforderung und bedarf eines multimodalen Ansatzes. Neue immunhistochemische Färbungen haben bisher keinen Einfluss auf die Diagnose von PPI. Die Arbeit zielt darauf ab, eine Basis für eine neue immunhistochemische Evaluation von periprothetischen Membranen zu schaffen, um eine verlässliche Aussage zur Infektkonsolidierung treffen zu können. Durch die Erstellung von Gewebenchips konnten viele immunhistochemische Marker untersucht werden, wobei CRP, PAX 2, Kollagen II und IV als vielversprechende Indikatoren zur Diskriminierung zwischen infizierten und nicht infizierten Geweben identifiziert wurden.

Einleitung:

Der endoprothetische Gelenkersatz an Knie und Hüfte ist ein äußerst erfolgreicher chirurgischer Eingriff mit hoher Patientenzufriedenheit und Erfolgsrate. Die steigende Anzahl von Implantationen hat zu einer Zunahme von Revisionsoperationen geführt, insbesondere aufgrund aseptischer Lockerung und periprothetischer Infektion. Die differentialdiagnostische Unterscheidung dieser Ursachen hat Fortschritte gemacht, erfordert jedoch oft den Wechsel des Kunstgelenks. Der

ideale Zeitpunkt für die Reimplantation und die Therapie im prothesenfreien Intervall sind noch nicht eindeutig definiert. Diese Studie zielt darauf ab, immunhistochemische Marker zu identifizieren, die eine Infektion von infektfreiem Gewebe unterscheiden können. Histopathologische Proben von Patienten mit konsolidiertem oder persistierendem Infekt nach Explantation einer Endoprothese werden verwendet, um die diagnostische Wirksamkeit der Marker zu evaluieren und ihre Validität zu überprüfen.

Die Periprotetische Infektion:

Die periprotetische Gelenkinfektion (PPI) ist eine schwere Komplikation nach endoprothetischem Gelenkersatz. Der zweizeitige Wechsel ist der Goldstandard in der Therapie der PPI. Die Reinfektionsraten nach zweizeitigen Revisionen bei PPI variieren in verschiedenen Studien. So zeigte Puhto et al 2014 nach einem 6-wöchigen Antibiotikaintervall und einem vierwöchigen antibiotikafreien Intervall eine mikrobiologische Infektpersistenz bei Wiedereinbau von lediglich 5,2 % und mutmaßte keine Korrelation zwischen einem Keimnachweis bei Reimplantation und dem Erfolg der Therapie (1). Jedoch zeigen Registerdaten eine deutlich erhöhte Wahrscheinlichkeit (23,5 % bis 35,1 %) für eine erneute Revision innerhalb von zwei Jahren (1,2). Um so wichtiger ist es, den richtigen Zeitpunkt für die Reimplantation beim zweizeitigen Wechsel verlässlich bestimmen zu können. Hierfür bedarf es diagnostischer Mittel, um eine Infektpersistenz ausschließen zu können. Die bestehenden Kriterien zur Definition der PPI wurden bereits in verschiedenen Studien auf ihre Wertigkeit hinsichtlich der Erkennung einer persistierenden Infektion untersucht. George et al. und Kheir et al. zeigten, dass die Anwendung der MSIS Klassifikation der PPI zur Identifikation einer Infektpersistenz mit einer Sensitivität von jeweils 26 % eine nur unzureichende Wertigkeit hat bei Spezifitäten von 96 % und 88 % (3–5).

Serumparameter:

Die im Serum bestimmbaren Parameter zeigten sich alle nicht geeignet für die Detektion einer persistierenden Infektion sowie als Prädiktor für

das Versagen nach Reimplantation. So präsentierten CRP und BSG in der Metaanalyse von Bian et al. lediglich eine geringe Genauigkeit in der Detektion von persistierenden Infektionen und hinsichtlich der Aussage über eine erfolgreiche Reimplantation mit einer Sensitivität und Spezifität von 45 % und 73 % für das CRP und 57 % und 50 % für die BSG (3).

Das Serum IL-6 konnte ebenfalls nicht adäquat als Surrogatmarker dienen. Hoell et al. zeigte eine Sensitivität von 67 % und Spezifität von 90 % (6). Während die Bestimmung der D-Dimere in der Diagnostik der PPI noch ein vielversprechender Serummarker zu sein scheint und eine höhere Sensitivität und Spezifität als CRP und BSG aufweist (89 % und 93 %), so konnte Shahi et al. lediglich in 2 von 5 Fällen mit präoperativ erhöhten Werten (Cut-off von 850 ng/ml) eine persistierende Infektion (positiver mikrobiologischer Nachweis) bei Reimplantation nachweisen (7).

Gelenkpunktion:

Die Gelenkpunktion ist eines der am häufigsten verwendeten diagnostischen Mittel zum Ausschluss einer Infektpersistenz. Preininger et al. konnten zeigen, dass die mikrobiologische Bebrütung der Gelenkpunktion nach einem zweiwöchigen antibiotikafreien Intervall eine sehr niedrige Sensitivität hinsichtlich der Detektion einer persistierenden PPI von 21 % bei einer Spezifität von 100 % aufweist (8).

Auch der Anteil an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) sowie die Anzahl an Leukozyten im Gelenkpunktat, welchen in der primären Diagnostik eine hohe Wertigkeit zukommt, zeigten gemäß Zmistowski et al. eine Sensitivität von 67 % und 55 % und eine geringe Spezifität mit 56 % und 60 % respektive (9).

Kheir et al. konnte in einer prospektiven Studie zeigen, dass der Leukozyten-Esterase-Strip-Test bei Reimplantation eine Sensitivität von 26,3 % und eine Spezifität von 100 % aufweist (5).

Auch Frangiamore et al. kommen 2016 zum Schluss, dass keiner der von ihnen bestimmten synovialen Marker hinreichend ist zur Identifikation einer Infektfreiheit. So konnten die synovialen Marker IFN- γ , IL-1 β und GM-CSF die

höchste Sensitivität (75 %) bezüglich der Vorhersage eines Versagens nach Reimplantation aufweisen, jedoch mit einer niedrigen Spezifität von 64 %, 29 % und 46 %. Synoviales IL-6 hatte die geringste Sensitivität von 0 % bei einer hohen Spezifität von 89 % (10).

Histopathologie:

Der Histopathologie kommt bezüglich der Entscheidung einer Infektfreiheit bei der Reimplantation bislang lediglich eine untergeordnete Rolle zu. Populärer ist die Anfertigung von gefrorenen Schnellschnitten, welche eine ähnliche Genauigkeit wie permanenten Proben haben (11,12). Della Valle et al. berichteten erstmals über intraoperative gefrorene Schnellschnitte, welche auf eine Infektpersistenz untersucht wurden. Obwohl die Spezifität 98 % betrug, lag die Sensitivität lediglich bei 25 % (13). Die Aussagekraft von histopathologischen Gefrierschnitten zum Zeitpunkt der Reimplantation wurde auch von George et al. 2016 untersucht. Hier erfolgte die Validierung anhand der gängigen MSIS Kriterien unter Exklusion des histopathologischen Befundes. Es zeigte sich eine Spezifität von 94 % bei einer schwachen Sensitivität von 50 %. Auch die Vorhersage eines Versagens der Prozedur zeigte eine hohe Spezifität der Gefrierschnitte mit 95 %, während die Sensitivität lediglich 22 % betrug (4). Zusammenfassend besteht bislang kein Konsens bezüglich der optimalen Diagnostik, welche eine persistierende Infektion ausschließen kann, beziehungsweise welche eine Vorhersage hinsichtlich einer erfolgreichen Reimplantation treffen könnte. Verschiedene Metaanalyse haben gezeigt, dass ein einzelner Marker nicht ausreicht, um die Infektfreiheit des Gewebes im Rahmen eines mehrzeitigen Behandlungsregimes bei PPI sicher zu bestätigen und anhand dessen eine Entscheidung bezüglich der Reimplantation zu treffen. Vielmehr kommt es zum

Einsatz verschiedener Parameter um eine möglichst dezidierte Aussage bezüglich der Infektfreiheit treffen zu können (3,14).

Materiale und Methodik:

Datenbank Erstellung:

Eine Datenbank wurde erstellt, um geeignete Fälle für eine erneute immunhistopathologische Aufarbeitung und Auswertung zu identifizieren. Es wurden Fälle mit ausreichend repräsentativen histopathologischen und mikrobiologischen Proben ausgewählt, um zwischen "infektfrei" und "persistierende Infektion" zu unterscheiden. Die Datenbank wurde um epidemiologische Daten, Informationen zur Operation, klinischen Verlauf, Follow-up-Daten sowie laborchemische, therapeutische, mikrobiologische und histopathologische Daten ergänzt. Anhand der gängigen laborchemischen, histopathologischen und mikrobiologischen ICM Kriterien erfolgte die Identifikation von 10 Fällen mit persistierender Infektion im Vergleich zu 9 infektfreien Fällen.

Imunohistochemische Aufarbeitung:

Die Gewebeprobenaufbereitung am Institut für Pathologie der Universitätsklinik Bonn durchgeführt. Dabei wurde zunächst die Eignung der Gewebeproben überprüft, gefolgt von der Identifizierung und Markierung repräsentativer Bereiche der histopathologischen Gewebsschnitte. Diese markierten Bereiche wurden verwendet, um



Abbildung 1: Gewebemikroarrayblock

Tissue Microarrays (TMAs) herzustellen. Die TMAs wurden mithilfe des Tissue Arrayer Minocore®3 der Firma Alphelys aus Paraffinblöcken mit fixierten periprothetischen Membranen erstellt. Durch das Ausstanzen mit einer 1 mm messenden Nadel wurden zylindrische Gewebestanden aus den markierten Bereichen gewonnen und in einem Empfängerblock eingebettet. Dabei wurden 36 Gewebestanden aus

nicht infiziertem Gewebe und 40 Gewebestanden aus infiziertem Gewebe positioniert. Kontrollen aus Lungengewebe wurden in den ersten beiden Spalten des Empfängergewebeparaffinblocks platziert.

Für die immunhistochemischen Färbungen kamen unterschiedliche Geräte zum Einsatz. Der Marker CD4 wurde mit dem vollautomatischen UltraView/OptiView Detektionskit BenchMark

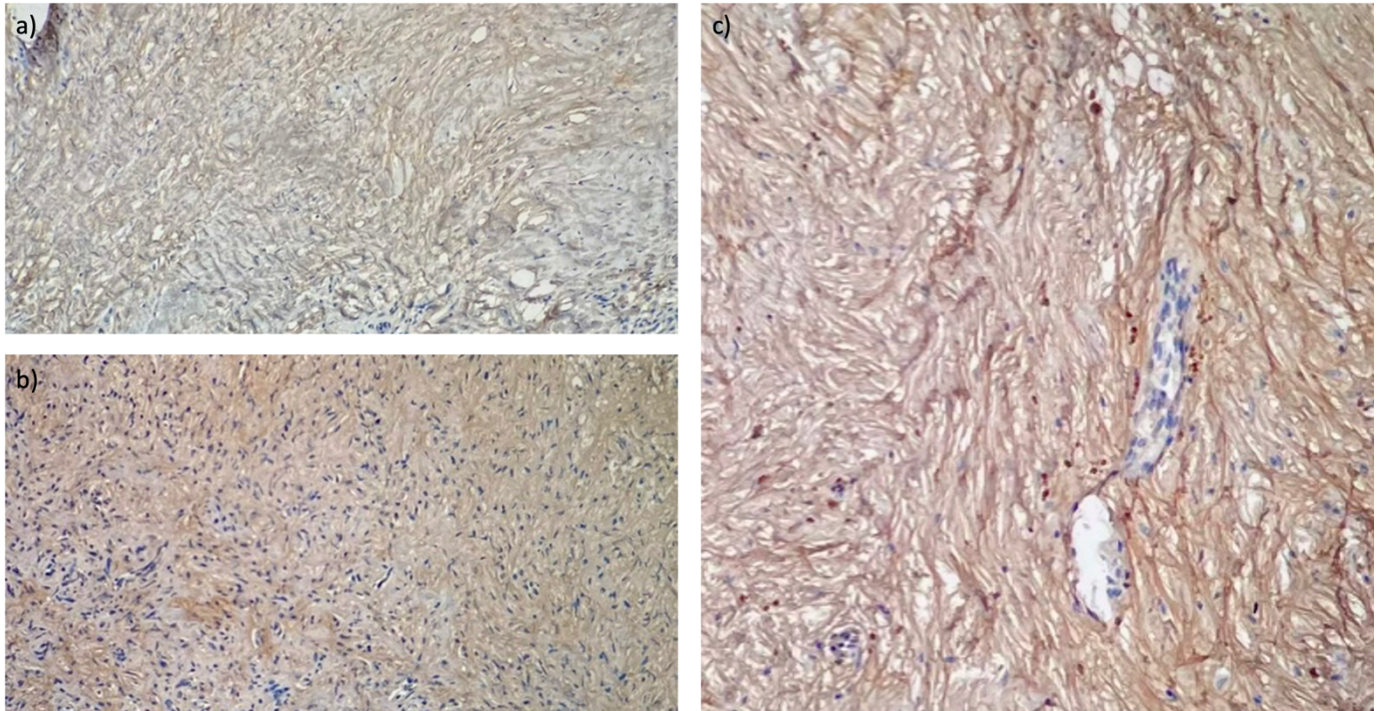


Abbildung 4: Immunohistochemische Färbung: Kollagen II; a) Probe: Aseptisch; Position: 1743/14/A1; Schwache bräunliche Färbung um Blutgefäße herum; Wertung: 1. b) Probe: Septisch; Position: 10960/16/4d; Mäßige bräunliche Färbung um Blutgefäße herum; Wertung: 2. c) Probe: Septisch; Position: 5955/14/1; Intensive bräunliche Färbung um Blutgefäße herum; Wertung: 3.

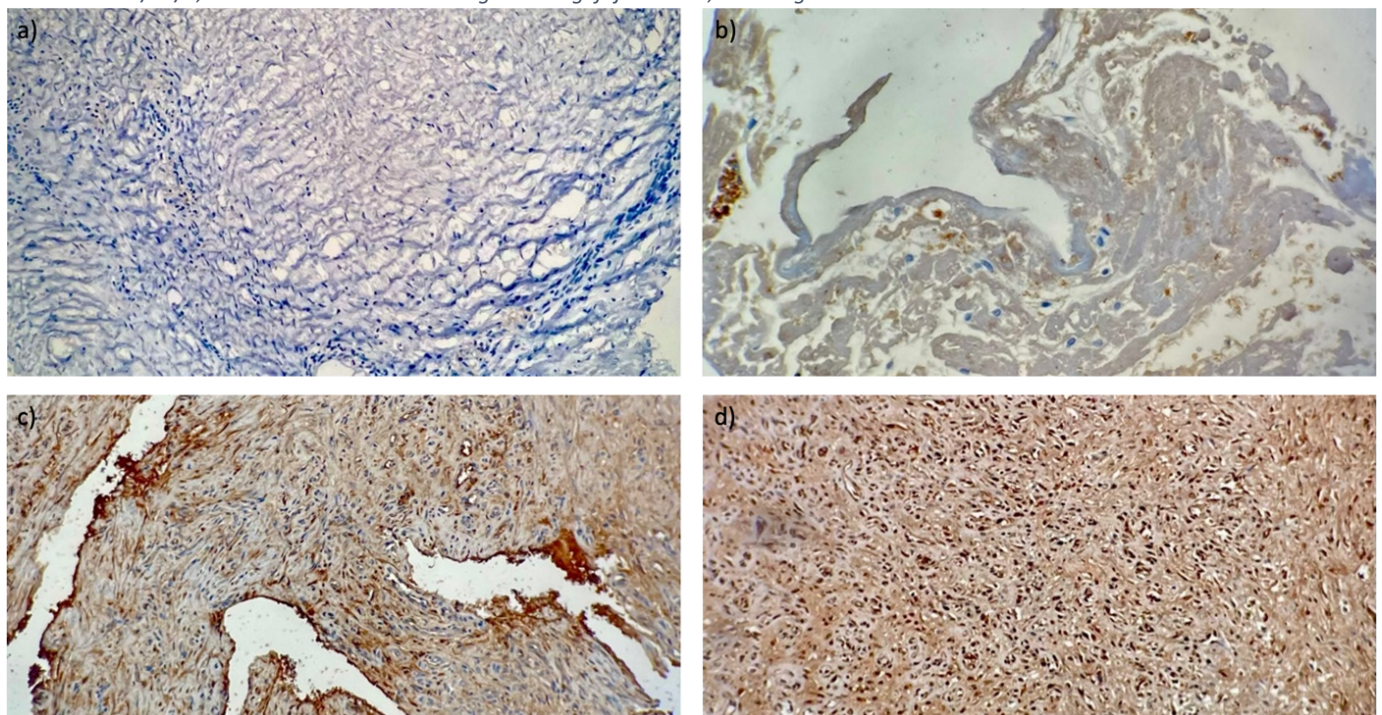


Abbildung 2: Immunohistochemische Färbung: CRP; a) Probe: Aseptisch, Position: 1743/14A1; Keine Färbung des Bindegewebes (blau) erkennbar; Wertung: 0. b) Probe: Aseptisch, Position: 8668/16/2; Schwache Färbung des Bindegewebes schwach erkennbar; Wertung: 1. c) Probe: Septisch; Position: 9282/15/4; Mäßige Färbung des Bindegewebes und des Zytoplasmas deutlich erkennbar; Wertung: 2. d) Probe: Septisch; Ort: 10960/16/4D; Intensive Färbung des Zytoplasmas, deutlich bräunlich, Wertung: 3.

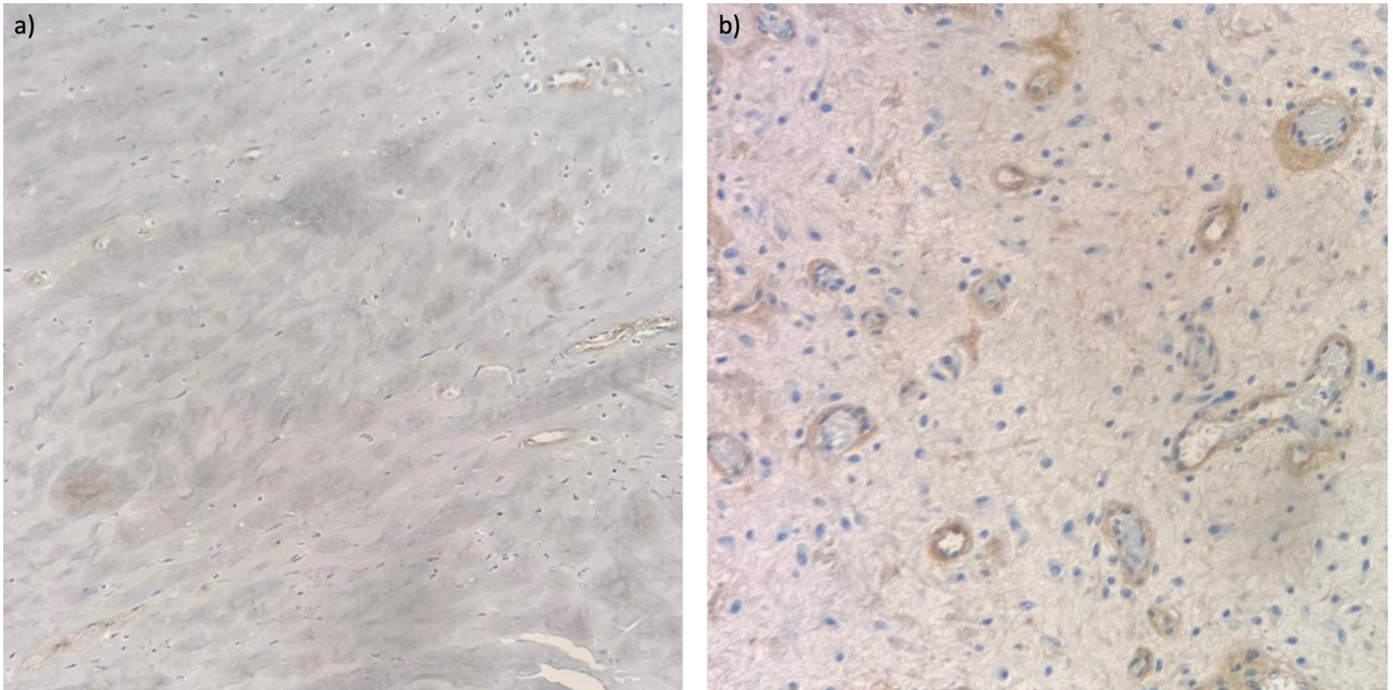


Abbildung 6: Immunohistochemische Färbung: Kollagen IV; a) Probe: Septisch; Position: 13953/15; Schwache bräunliche Färbung um Blutgefäße herum; Wertung: 1. b) Probe: Septisch; Position: 14797/14/1; Mäßige bräunliche Färbung um Blutgefäße herum; Wertung: 2.

Ultra von Roche gefärbt. Bei den anderen Färbungen wurde der semiautomatische Autostainer 480 S von Medac verwendet. Einige Färbungen erforderten eine enzymatische Vorbehandlung, während andere ohne Vorbehandlung durchgeführt wurden.

Eine Vielzahl von immunhistochemischen Markern wurde verwendet, darunter CD1a, CD3, CD4, CD5, CD20, CD31, CD34, CD38, CD56, CD138, C3 Komplement, CRP, EGFR, Elastase 3A, IgA, IgD, IgG4, IgM, Mastzelltryptase, Kollagen II und Kollagen IV.

Histologische Auswertung:

Die verschiedenen Färbungen wurden mit einer 400-fachen Vergrößerung ausgewertet. Eine Färbescore-, Gefäßscore- und direkte Zellauszählungsmethode wurde angewendet. Bei zytoplasmatisch anfärbenden Markern wie CRP und C3 Komplement wurde ein Färbescore verwendet, der in vier Farbeintensitäten eingeteilt wurde: 0=keine Färbung, 1=schwache Färbung, 2=moderate Färbung und 3=intensive Färbung. Gefäßmembrananfärbende Marker wie CD31 und CD34 wurden mit einem Gefäßscore ausgewertet. Dabei wurde die Anzahl der getrennten gefäßmorphologischen Anschnitte pro Hauptgesichtsfeld gezählt. Kollagen II,

Kollagen IV und Elastase 3a, die um Gefäßanschnitte herum anfärben, wurden anhand eines Färbescores ausgewertet, der die Intensität der Färbung um Gefäße herum zählte. Die lymphozytenanfärbenden Marker (CD1a, CD3, CD4, CD5, CD20, CD38, CD56, CD138) wurden durch Zählung aller gefärbten Zellen pro Hauptgesichtsfeld ausgewertet und mit der Gesamtzahl der lymphatischen Zellen verglichen. Die Marker Mastzelltryptase, EGFR, IgG 4, IgM, IgA und IgD wurden durch direkte Auszählung von angereicherten Zellen mit abgrenzbaren Zellstrukturen und rundlicher Morphologie ausgewertet. PAX2 und PAX5, nukleäre Marker, wurden durch Zählung der angefärbten Zellen pro Hauptgesichtsfeld ausgewertet.

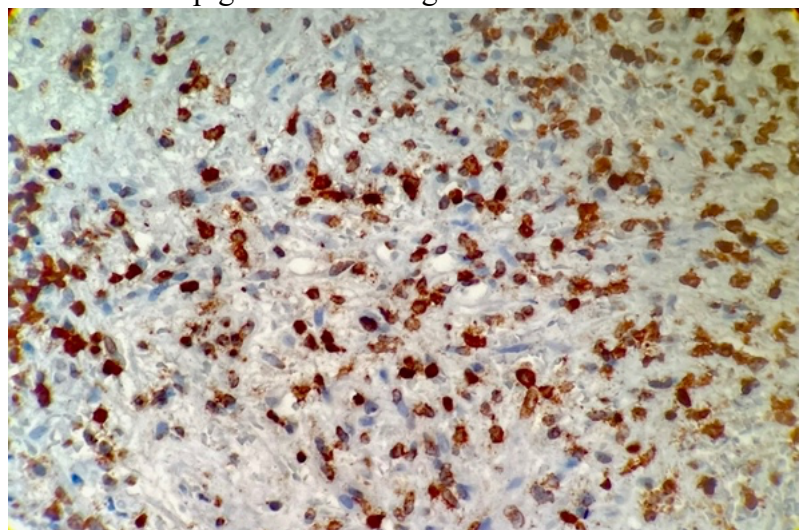


Abbildung 8 Pax 2 Färbung; Position 9282/15/14

Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung wurde mit Excel und GraphPad Prism durchgeführt. Fisher's Exact Test wurde für nicht-numerische Parameter verwendet, während der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich quantitativer und semi-quantitativer Werte angewendet wurde. Ein P-Wert von <0.05 wurde als signifikant betrachtet. Receiver-Operator Characteristics wurden berechnet, um den besten Cut-off, die Sensitivität und Spezifität zur Unterscheidung zwischen "infiziert" und "nicht infiziert" zu ermitteln.

Ergebnisse:

Die statistische Analyse mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Tests ergab signifikante Unterschiede in der Serumkonzentration von C-reaktivem Protein (CRP) ($p<0,0001$) sowie der Leukozytenkonzentration im Serum ($p=0,0006$) zwischen infiziertem und nicht infiziertem Gewebe. Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Differenz in der Färbungsintensität von CRP zwischen den beiden Gewebegruppen ($p=0,0001$), wobei ein Cut-off-Wert von 1,5 im gemittelten Färbescore eine hohe Sensitivität (100 %) und

Spezifität (90 %) aufwies. Zusätzlich wurden signifikante Unterschiede in der Färbintensität von Kollagen II ($p=0,002$) und Kollagen IV ($p=0,0064$) zwischen infiziertem und nicht infiziertem Gewebe festgestellt. Hingegen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Gefäßanschnitten von CD31, CD34 und den anderen immunhistochemischen Markern zwischen den Gewebegruppen. Die Auswertung des Anteils gefärbter Lymphozyten und weiterer immunhistochemischer Marker ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen infiziertem und nicht infiziertem Gewebe. Jedoch wies der Anteil positiv gefärbter Zellen mit PAX2 einen signifikanten Unterschied ($p=0,0264$) auf, während kein signifikanter Unterschied mit PAX5 beobachtet wurde.

Diskussion:

CRP:

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein CRP, ein in der Leber synthetisiertes Protein, dient als etablierter Serummarker zur Erkennung unspezifischer Entzündungen im Körper (15). Die Freisetzung von CRP wird durch IL-6 und in

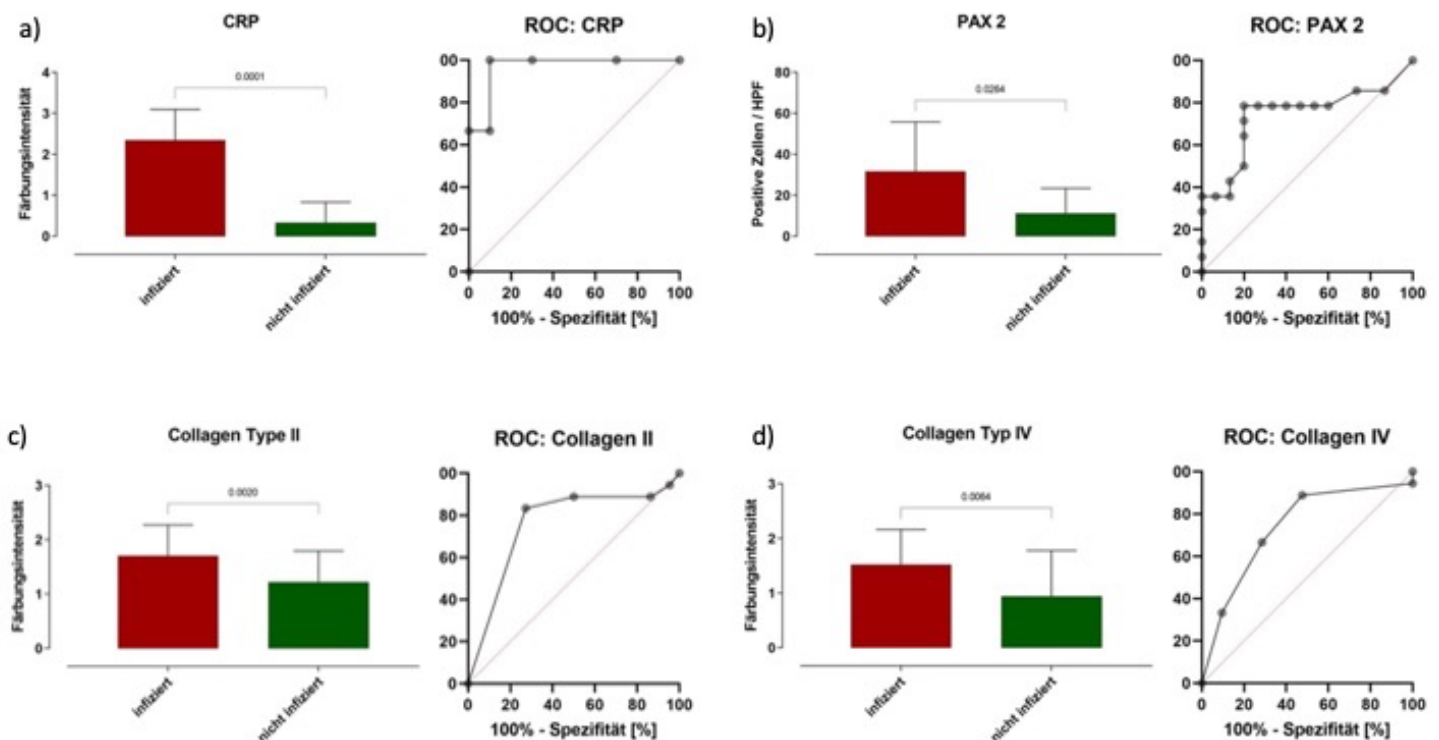


Abbildung 9 Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test, dargestellt in Boxplots, die Folgendes veranschaulichen: a) Die Färbungsintensitäten von CRP in infiziertem und nicht infiziertem Gewebe sowie die ROC-Kurve; b) Die Anzahl der PAX2-positiven Zellen pro Feld in infiziertem und nicht infiziertem Gewebe sowie die ROC-Analyse; c) Die Färbungsintensitäten von Kollagen II und d) Kollagen IV in infiziertem und nicht infiziertem Gewebe sowie die ROC-Kurve.

geringerem Maße durch IL-1 β ausgelöst (15). In der Immunhistochemie wird CRP hauptsächlich in Zusammenhang mit Leberpathologien eingesetzt. Die Konzentration von CRP im gesunden Lebergewebe korreliert mit dem Ausgang des Hepatozellulären Karzinoms im Zusammenhang mit dem Hepatitis-B-Virus, und es besteht eine Korrelation zur im Serum nachgewiesenen CRP-Konzentration (16). CRP kann in kleinere Untereinheiten, wie das Monomer CRP (mCRP), aufgeteilt werden (17). In der extrazellulären Matrix geschädigten Hirngewebes kann mCRP nach einem ischämischen Schlaganfall nachgewiesen werden und steht mit Entzündung und dem Fortschreiten der Alzheimer-Krankheit in Verbindung (18). Hinweise deuten darauf hin, dass es über den lokalen Entzündungsprozess hinaus auch zu Entzündungen in gesundem Gewebe kommen kann, das sich nicht unmittelbar in der Nähe des geschädigten Bereichs befindet (19). CRP spielt auch bei entzündlichen Prozessen im Herzgewebe eine Rolle. Erhöhte Färbeintensitäten von extrazellulärem CRP wurden in atherosklerotischen Plaques der Koronararterien gefunden. Signifikant erhöhte Färbeintensitäten von CRP in instabilen Plaques deuten auf eine wichtige Rolle bei der Vermittlung und Aufrechterhaltung von entzündlichen Prozessen im Gewebe hin (20).

Die Ergebnisse unserer Analyse zeigen deutliche Unterschiede sowohl in der Serum-CRP-Konzentration als auch in der Gewebe-CRP-Färbung zwischen den Gruppen. Bei anhaltender Infektion ist anzunehmen, dass inflammatorische Prozesse zu einer erhöhten Gewebe-CRP-Konzentration führen. Die proinflammatorische Wirkung von CRP beruht auf seiner pentameren Struktur (pCRP), die durch den Kontakt mit nekrotischem Gewebe, apoptotischen Zellen und ischämischem Gewebe in die proinflammatorische Form (pCRP*) und schließlich in das monomere Form (mCRP) überführt wird (15). Durch die Aktivierung von Thrombozyten, Leukozyten, Endothelzellen und dem Komplementsystem kann mCRP eine zelluläre Immunantwort auslösen (15). Die erhöhte Anwesenheit von proinflammatorischem pCRP* in entzündetem Gewebe, das durch Ischämie, Verletzungen,

Transplantationen usw. verändert ist, sowie die Aufrechterhaltung der Entzündung legen nahe, dass CRP als immunhistochemischer Marker zur Detektion von Gewebeinfektionen und bakterieller Persistenz von Nutzen sein kann (15).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CRP in entzündetem und ischämischem Gewebe sowie bei malignombedingten Gewebeveränderungen vorkommt und eine Korrelation zur Serum-CRP-Konzentration aufweist. In den Proben zeigte sich CRP als relevanter und signifikanter Marker, der bei komplexen chirurgischen Eingriffen mit abweichendem zeitlichem Verlauf eine Entscheidungshilfe für den optimalen Zeitpunkt der Reimplantation sein kann.

PAX 2:

Die bisherige Literatur beschreibt Paired box 2 (PAX2) als nuklearen Transkriptionsfaktor, der bei der Embryogenese eine Rolle spielt und in verschiedenen Geweben vorkommt (21). In der histopathologischen Diagnostik wird PAX2 zur Unterscheidung zwischen gutartigen Läsionen und bestimmten Krebsarten verwendet (22–24). Es wurde auch festgestellt, dass PAX2 das Zellwachstum in bestimmten Brustkrebszellen hemmt und als positiver prädiktiver Marker für den Therapieerfolg angesehen wird (25). Es wird angenommen, dass PAX2 über eRNAs die Expression von proapoptotischen Genen reguliert (25). Eine neue Studie legt nahe, dass PAX2 auch eine Rolle bei bakteriellen Infektionen spielen könnte, insbesondere im Zusammenhang mit dem Inflammasom NLRC4 (26). Das Inflammasom erkennt bakterielle Flagelline und Proteine, die für die Fortbewegung von Bakterien wichtig sind, und löst eine Reihe von Reaktionen aus, einschließlich der Sekretion von entzündlichen Zytokinen und der Initiierung von Zelltod (26). Es wird vermutet, dass PAX2 eine Verbindung zwischen der Apoptoseinitiierungsfunktion und der bakteriellen Entzündung mit Pyroptose herstellen könnte. Die Verwendung von PAX2 als Marker zur Differenzierung von Infektpersistenz und Konsolidierung könnte neue diagnostische und therapeutische Ansätze ermöglichen.

Kollagen II und IV:

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Kollagen Typ II und Kollagen Typ IV bisher keine bekannte Rolle in der Infektdiagnostik oder im Zusammenhang mit PPIs spielen. Jedoch könnten inflammatorische Prozesse eine Verbindung zwischen diesen Kollagentypen und der Gewebereparatur herstellen. Die Aktivierung von Caspase 1 und die Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen wie IL-1 β und IL-18 spielen eine wichtige Rolle bei der Gewebemöostase und der Aktivierung von Immunzellen (26–28). Im Rahmen der Inflammation werden auch Fibroblasten aktiviert, um Kollagen zu bilden und die extrazelluläre Matrix zu regenerieren (27). Obwohl Kollagen Typ II und Kollagen Typ IV hauptsächlich in bestimmten Geweben vorkommen (29,30), ist eine Verbindung zu inflammatorischen Prozessen und der Gewebereparatur denkbar. Weitere Forschung ist jedoch erforderlich, da diese Hypothese aufgrund fehlender immunhistochemischer Färbungen für Kollagen Typ II und Kollagen Typ IV bisher vage bleibt.

Limitationen der Arbeit:

Die vorliegende Studie weist einige Limitationen auf. Die Heterogenität des Patientenkollektivs, das Fehlen einer separaten Betrachtung von Knie- und Hüftgelenken sowie das Vorhandensein von Vorerkrankungen wie rheumatoider Arthritis und Gicht beeinflussen die Interpretation der Ergebnisse. Die Anzahl der Voroperationen unterscheidet sich zwischen den Kohorten und könnte zu falsch-positiven Ergebnissen führen. So wiesen Patienten mit Infektpersistenz eine signifikant höhere Anzahl an Voroperationen auf. Fehler bei der Identifikation geeigneter Gewebeproben, insbesondere im Zusammenhang mit der Anzahl der entnommenen Proben, könnten zu falsch negativen Ergebnissen führen. Im infektkonsolidierten Kollektiv wurden im Durchschnitt nur zwei Gewebeproben für die mikrobiologische Bebrütung entnommen, während im Infektpersistenzkollektiv im Durchschnitt fünf Gewebeproben entnommen wurden. Zudem ist es wichtig anzumerken, dass die fokale Natur der Infektion berücksichtigt werden muss. Bei

Infektpersistenz können Gewebeproben aus nicht infizierten Bereichen entnommen worden sein, was zu sogenannten "Sampling"-Fehlern führen kann. Weitere Limitationen der vorliegenden Arbeit sind auf das retrospektive Studiendesign zurückzuführen. Die gesammelten Informationen zur Patientenversorgung könnten unvollständig sein, insbesondere da zum Zeitpunkt der Erstellung der Datenbank keine elektronische Patientenakte vorhanden war. Dies könnte dazu führen, dass beispielsweise Informationen über Antibiotikatherapien zu beliebigen Zeitpunkten nicht dokumentiert wurden, was die Zuverlässigkeit der mikrobiologischen Befunde beeinflussen könnte.

Zusätzlich sollte berücksichtigt werden, dass für die Diagnosestellung persistierender Infektionen und infektkonsolidierter Situationen ein diagnostischer Algorithmus verwendet wurde, der auf den älteren ICM-Kriterien von 2013 basiert. Neuere diagnostische Kriterien, die in der Klassifikation der ICM von 2018 aufgenommen wurden, wurden nicht validiert oder untersucht. Dazu gehören beispielsweise der Einsatz von D-Dimeren, der Leukozyten-Esterase und Alpha-Defensin zur Erkennung von Infektpersistenz.

Zukünftige Studien sollten diese Aspekte berücksichtigen und weitere Untersuchungen durchführen, um die Ergebnisse genauer zu interpretieren.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Studie untersuchte CRP, PAX2, Kollagen Typ II und Kollagen Typ IV als potenzielle immunhistochemische Marker für Infektpersistenz und peri-implantäre Infektion (PPI). Es wurde festgestellt, dass alle vier Marker signifikante Parameter zur Unterscheidung von Infektpersistenz und Konsolidierung darstellen. Bislang waren alle Marker in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Zusätzlich wurde diskutiert, dass inflammatorische Prozesse, insbesondere die Aktivierung von Caspase 1 und die Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen wie IL-1 β und IL-18, eine wichtige Rolle bei der Gewebereparatur und Immunantwort spielen könnten. Obwohl Kollagen Typ II und Kollagen Typ IV in bestimmten Geweben

vorkommen, fehlt es an immunhistochemischen Färbungen, um ihre Rolle bei Infektionen genauer zu untersuchen. Die Studie liefert wichtige Erkenntnisse über potenzielle Marker und Mechanismen im Zusammenhang mit Infektpersistenz und PPI, betont aber die Notwendigkeit weiterer Forschung, um ihre Bedeutung in der Diagnostik und Therapie von Infektionen zu klären. Dies könnte zu neuen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen führen und unser Verständnis der Pathophysiologie von Infektionen erweitern. Es bedarf weiterer Studien mit größeren Fallzahlen, um die gefundenen Ergebnisse zu verifizieren.

Literatur:

1. Puhto AP, Puhto TM, Niinimäki TT, Leppilahti JJ, Syrjälä HPT. Two-stage revision for prosthetic joint infection: Outcome and role of reimplantation microbiology in 107 cases. *J Arthroplasty* [Internet]. 2014;29(6):1101–4. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arth.2013.12.027>
2. Steinbrück AGJLOMMMA. Jahresbericht 2022 Mit Sicherheit mehr Qualität. Berlin: EPRD Deutsche Endoprothesenregister gGmbH; 2022.
3. Bian T, Shao H, Zhou Y, Huang Y, Song Y. Tests for predicting reimplantation success of two-stage revision for periprosthetic joint infection: A systematic review and meta-analysis. *Orthop Traumatol Surg Res* [Internet]. 2018;104(7):1115–23. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2018.03.017>
4. George J, Kwiecien G, Klika AK, Ramanathan D, Bauer TW, Barsoum WK, u. a. Are Frozen Sections and MSIS Criteria Reliable at the Time of Reimplantation of Two-stage Revision Arthroplasty? *Clin Orthop Relat Res*. 2016;474(7):1619–26.
5. Kheir MM, Ackerman CT, Tan TL, Benazzo A, Tischler EH, Parvizi J. Leukocyte Esterase Strip Test Can Predict Subsequent Failure Following Reimplantation in Patients With Periprosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty* [Internet]. 2017;32(6):1976–9. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arth.2017.01.031>
6. Hoell S, Borgers L, Gosheger G, Dieckmann R, Schulz D, Gerss J, u. a. Interleukin-6 in two-stage revision arthroplasty. *Bone Joint J*. 2015;97-B(1):71–5.
7. Shahi A, Kheir MM, Tarabichi M, Hosseinzadeh HRS, Tan TL, Parvizi J. Serum D-Dimer Test Is Promising for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection and Timing of Reimplantation. *J Bone Jt Surg - Am Vol*. 2017;99(17):1419–27.
8. Preininger B, Janz V, Von Roth P, Trampuz A, Perka CF, Pfitzner T. Inadequacy of joint aspiration for detection of persistent periprosthetic infection during two-stage septic revision knee surgery. *Orthopedics*. 2017;40(4):231–4.
9. Zmistowski BM, Clyde CT, Ghanem ES, Gotoff JR, Deirmengian CA, Parvizi J. Utility of Synovial White Blood Cell Count and Differential Before Reimplantation Surgery. *J Arthroplasty* [Internet]. 2017;32(9):2820–4. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arth.2017.03.068>
10. Frangiamore SJ, Siqueira MBP, Saleh A, Daly T, Higuera CA, Barsoum WK. Synovial Cytokines and the MSIS Criteria Are Not Useful for Determining Infection Resolution After Periprosthetic Joint Infection Explantation. *Clin Orthop Relat Res*. 2016;474(7):1630–9.
11. Kelly ME, Bahethi SR, King ME, Elstner BC, Turcotte JJ, King PJ. The Utility of Frozen Section Histology in Diagnosing Periprosthetic Joint Infection in Revision Total Joint Arthroplasty. *J Arthroplasty* [Internet]. 2021;36(6):2137–43. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.arth.2020.12.051>
12. Kwiecien G, George J, Klika AK, Zhang Y, Bauer TW, Rueda CAH. Intraoperative Frozen Section Histology: Matched for Musculoskeletal Infection Society Criteria. *J Arthroplasty* [Internet]. 2017;32(1):223–7. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arth.2016.06.019>
13. C J Della Valle 1, E Bogner, P Desai, J H Lonner, E Adler, J D Zuckerman PEDC. Analysis of frozen sections of intraoperative specimens obtained at the time of reoperation after hip or knee resection arthroplasty for the treatment of infection. *J Bone Jt Surg*. 1999;81(5):684–689.
14. Lee YS, Fernando N, Koo KH, Kim HJ, Vahedi H, Chen AF. What markers best

- guide the timing of reimplantation in twostage exchange arthroplasty for PJI? A systematic review and meta-analysis. *Clin Orthop Relat Res.* 2018;476(10):1972–83.
15. Peter K. Dissociation of C-Reactive Protein Localizes and Amplifies inflammation : evidence for a Direct Biological Role of C-Reactive Protein and its Conformational Changes. 2018;9(June).
 16. Shin JH, Yu E, Kim EN, Kim CJ. C-reactive protein overexpression in the background liver of hepatitis b virus-associated hepatocellular carcinoma is a prognostic biomarker. *J Pathol Transl Med.* 2018;52(5):267–74.
 17. Boncler M, Wu Y, Watala C. The multiple faces of c-reactive protein-physiological and pathophysiological implications in cardiovascular disease. *Molecules.* 2019;24(11).
 18. Slevin M, Matou S, Zeinolabediny Y, Corpas R, Weston R, Liu D, u. a. Monomeric C-reactive protein - A key molecule driving development of Alzheimer's disease associated with brain ischaemia? *Sci Rep.* 3. September 2015;5.
 19. Slevin M, E EG-L, Capitanescu B, Sanfeliu C, Zeinolabediny Y, AlBaradie R, u. a. Monomeric C-Reactive Protein Aggravates Secondary Degeneration after Intracerebral Haemorrhagic Stroke and May Function as a Sensor for Systemic Inflammation. *J Clin Med.* 2020;9(9):3053.
 20. Rittersma SZH, Chamuleau SAJ, Tijssen JGP, Becker AE, Piek JJ. Colocalisation of intraplaque C reactive protein, complement, oxidised low density lipoprotein, and macrophages in stable and unstable angina and acute myocardial infarction. 2006;8:196–201.
 21. Quick CM, Gokden N, Sangoi AR, Brooks JD, McKenney JK. The distribution of PAX-2 immunoreactivity in the prostate gland, seminal vesicle, and ejaculatory duct: Comparison with prostatic adenocarcinoma and discussion of prostatic zonal embryogenesis. *Hum Pathol* [Internet]. 2010;41(8):1145–9. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2010.01.010>
 22. Rabban JT, McAlhany S, Lerwill MF, Grenert JP, Zaloudek CJ. PAX2 distinguishes benign mesonephric and mullerian glandular lesions of the cervix from endocervical adenocarcinoma, including minimal deviation adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(2):137–46.
 23. Carney EM, Banerjee P, Ellis CL, Albadine R, Sharma R, Chaux AM, u. a. PAX2(-)/PAX8(-)/inhibin A(+) immunoprofile in hemangioblastoma: A helpful combination in the differential diagnosis with metastatic clear cell renal cell carcinoma to the central nervous system. *Am J Surg Pathol.* 2011;35(2):262–7.
 24. Knoepp SM, Kunju LP, Roh MH. Utility of PAX8 and PAX2 immunohistochemistry in the identification of renal cell carcinoma in diagnostic cytology. *Diagn Cytopathol.* August 2012;40(8):667–72.
 25. Wang S, Somisetty VS, Bai B, Chernukhin I, Niskanen H, Kaikkonen MU, u. a. The proapoptotic gene interferon regulatory factor-1 mediates the antiproliferative outcome of paired box 2 gene and tamoxifen. *Oncogene* [Internet]. 2020;39(40):6300–12. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-020-01435-4>
 26. Lu F, Lan Z, Xin Z, He C, Guo Z, Xia X, u. a. Emerging insights into molecular mechanisms underlying pyroptosis and functions of inflammasomes in diseases. *J Cell Physiol.* 2020;235(4):3207–21.
 27. Bainbridge P, Healing W, Repair T. Wound healing and the role of Fibroblasts. 2013;
 28. Vallés PG, Lorenzo AG, Bocanegra V, Vallés R. Acute kidney injury: What part do toll-like receptors play? *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2014;7(February):241–51.
 29. Hall DA, Jackson DS. International review of connective tissue research. Volume 6. Elsevier Science; 1973. 341 S.
 30. Von Der Mark K. Localization of collagen types in tissues [Internet]. Bd. Vol. 9, International Review of Connective Tissue Research. ACADEMIC PRESS, INC.; 1981. 265–324 S. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-363709-3.50012-7>

Abbildungsverzeichnis:

- | | |
|---|---|
| Abbildung 1: Gewebemikroarrayblock | 3 |
| Abbildung 2: Immunohistochemische Färbung: Kollagen II; a) Probe: Aseptisch; Position: 1743/14/A1; Schwache bräunliche Färbung um Blutgefäße herum; Wertung: 1. b) Probe: Septisch; Position: 10960/16/4d; Mäßige | |

bräunliche Färbung um Blutgefäße herum;
Wertung: 2. c) Probe: Septisch; Position:
5955/14/1; Intensive bräunliche Färbung um
Blutgefäße herum; Wertung: 3. 4

Abbildung 3: Immunohistochemische Färbung:
CRP; a) Probe: Aseptisch, Position: 1743/14A1;
Keine Färbung des Bindegewebes (blau)
erkennbar; Wertung: 0. b) Probe: Aseptisch,
Position: 8668/16/2; Schwache Färbung des
Bindegewebes schwach erkennbar; Wertung: 1. c)
Probe: Septisch; Position: 9282/15/4; Mäßige
Färbung des Bindegewebes und des Zytoplasmas
deutlich erkennbar; Wertung: 2. d) Probe:
Septisch; Ort: 10960/16/4D; Intensive Färbung
des Zytoplasmas, deutlich bräunlich, Wertung: 3.4

Abbildung 4: Immunohistochemische Färbung:
Kollagen IV; a) Probe: Septisch; Position:
13953/15/; Schwache bräunliche Färbung um
Blutgefäße herum; Wertung: 1. b) Probe:
Septisch; Position: 14797/14/1; Mäßige
bräunliche Färbung um Blutgefäße herum;
Wertung: 2. 5

Abbildung 5 Pax 2 Färbung; Position 9282/15/145
5

Abbildung 6 Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test,
dargestellt in Boxplots, die Folgendes
veranschaulichen: a) Die Färbungsintensitäten von
CRP in infiziertem und nicht infiziertem Gewebe
sowie die ROC-Kurve; b) Die Anzahl der PAX2-
positiven Zellen pro Feld in infiziertem und nicht
infiziertem Gewebe sowie die ROC-Analyse; c)
Die Färbungsintensitäten von Kollagen II und d)
Kollagen IV in infiziertem und nicht infiziertem
Gewebe sowie die ROC-Kurve. 6