

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie (CMSC)  
Klinik für Orthopädie und Klinik für Unfallchirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Charité Campus Virchow-Klinikum

DISSERTATION

Infektionsdiagnostik bei Pseudarthrose – Eine Analyse mittels  
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Marcus Nitzsche

aus Berlin

Datum der Promotion: 18.09.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>II</b>
<b>Abstrakt / Abstract.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Fraktur, Frakturheilung und Komplikationen.....	8
1.2 Pseudarthrosen.....	12
1.2.1 Definition, Epidemiologie und ökonomische Bedeutung .....	12
1.2.2 Ätiologie, Pathogenese und Klassifikationen.....	13
1.2.3 Klinik und Diagnostik .....	16
1.2.4 Therapie.....	18
1.3 Periimplantäre Infektionen .....	20
1.3.1 Definition und Pathogenese .....	20
1.3.2 Konventionelle Untersuchungsmethoden .....	23
1.3.3 Moderne Diagnostik .....	24
1.4 Grundlegende Erläuterungen zur Polymerase-Kettenreaktion .....	24
1.5 Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit.....	26
<b>2 Methodik.....</b>	<b>27</b>
2.1 Studiendesign.....	27
2.1.1 Studiencharakter, Studienpopulation sowie Ein- und Ausschlusskriterien.....	27
2.1.2 Gruppeneinteilung .....	27
2.1.3 Infektionsdefinition .....	28
2.2 Laborarbeit mit Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion .....	29
2.2.1 Allgemeine Laborbedingungen, Probenlagerung und Probenvorbereitung .....	29
2.2.2 Probenanalyse, Ergebnisdarstellung und Probennachbereitung.....	32
2.3 Übersicht zur Durchführung der Vergleichsuntersuchungen .....	36
2.4 Statistische Auswertung .....	37
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
3.1 Patientenkollektiv .....	38
3.2 Übersicht der diagnostischen Untersuchungsbefunde .....	39
3.3 Pathogennachweise und -häufigkeiten .....	44
3.4 Differenzierte Betrachtung anhand der Infektionskriterien.....	46

3. 5	Gegenüberstellung der PCR zu anderen diagnostischen Methoden .....	48
3. 6	Statistische Gütekriterien der verschiedenen diagnostischen Methoden.....	52
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
4. 1	Erörterung der Ergebnisse inklusive Literaturvergleich.....	53
4. 2	Schlussfolgerungen.....	62
4. 3	Erörterung der Methodik und Limitationen der Studie .....	63
4. 4	Fazit und Ausblick.....	67
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>77</b>
	<b>Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....</b>	<b>78</b>
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>79</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>80</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>81</b>

## Abstrakt / Abstract

*Hintergrund:* Pseudarthrosen stellen eine häufige Komplikation bei der osteosynthetischen Frakturversorgung dar. Eine frühzeitige Infektionsdiagnostik ist essenziell, da septische Pseudarthrosen andere Therapiemaßnahmen als aseptische erfordern. Die mikrobiologische Analyse periimplantärer Gewebeproben (Goldstandard) weist jedoch suboptimale Sensitivitäten und Spezifitäten auf. Auch die histopathologische Evaluation periimplantärer Gewebeproben konnte diese Aspekte bisher nicht vollständig kompensieren. Der folglich bestehende Bedarf an innovativen Diagnostikmethoden wird in aktuellen Studien durch die Untersuchung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sonikation exploriert. Das Ziel dieser Arbeit war die infektiologische Untersuchung sowie Gegenüberstellung konventioneller (Mikrobiologie, Histopathologie) und neuer Techniken (Sonikation, Multiplex-PCR) mit Fokus auf dem PCR-Verfahren bei Patienten mit Pseudarthrosen nach osteosynthetischer Therapie von Frakturen.

*Methodik:* In der klinischen Studie wurden 38 Patienten inkludiert, welche im Zeitraum von Mai 2014 bis April 2016 eine Revision mit Explantation ihres osteosynthetischen Materials an der Charité - Universitätsmedizin Berlin erfuhren. Basierend auf der präoperativen, klinischen und radiologischen Diagnose wurden sie in drei Gruppen klassifiziert: 17 Patienten mit Pseudarthrosen (Pseudarthrosen), 15 Patienten mit aseptischen Implantatentfernungen (negative Kontrollen) sowie 6 Patienten mit klinischen periimplantären Infektionen (positive Kontrollen). Innerhalb jeder Gruppe erfolgte eine mikrobiologische Untersuchung des Sonikats, des Implantatabstrichs und der periimplantären Gewebeproben sowie eine histopathologische und molekulare Untersuchung mittels Multiplex-PCR (Unyvero i60 ITI System, Curetis GmbH, Holzgerlingen, Deutschland) von periimplantärem Gewebe. Identische Pathogendetektionen in der Mikrobiologie sowie positive histopathologische Befunde (nach Morawietz) wurden als Infektion gewertet.

*Ergebnisse:* 9 von 17 Patienten der Pseudarthrosen-Gruppe erfüllten die Infektionskriterien. Für die PCR resultierten Sensitivitäten und Spezifitäten von 33 % bzw. 88 %. Bei den mikrobiologischen Analysen wurden folgende Parameter ermittelt: Kultur (Sonikat) Sensitivität 89 % und Spezifität 38 %, Kultur (Implantatabstrich) Sensitivität 63 % und Spezifität 83 % sowie Kultur (periimplantäre Gewebeproben) Sensitivität 78 % und Spezifität 88 %. Die histopathologische Untersuchung präsentierte eine Spezifität von 100 % bei einer Sensitivität von 38 %.

*Diskussion:* Die PCR konnte sich, auch unter Berücksichtigung der rapiden Untersuchungszeit von 5 Stunden, hinsichtlich der Pathogendetektionen nicht als gleichwertig zu konventionellen Techniken erweisen. Aufgrund der hohen Sensitivität erscheint ein Einsatz der Sonikation, unter Beachtung der niedrigen Spezifität, in der Zukunft sinnvoll. Kulturen von Gewebeproben

generierten solide Sensitivitäten und Spezifitäten, weshalb sie legitim als Goldstandard gelten. Summa summarum ist der Anteil an Infektpseudarthrosen höher (53 %) als bisher angenommen. Weitere Modifikationen sind notwendig, um Verfahren wie die PCR in die routinemäßige Diagnostik zu implementieren und die reale Quote an septischen Pseudarthrosen zu identifizieren.

*Background:* Nonunions represent a common complication in the context of fracture treatment with osteosynthesis. A timely diagnosis of infection is essential because septic nonunions require different medical treatment. Nevertheless, cultures of peri-implant tissue (gold standard) offer suboptimal sensitivity and specificity. The histopathological testing of peri-implant tissue is not able to fully compensate these aspects, too. Hence, there exists a need for innovative diagnostics such as polymerase chain reaction (PCR) and sonication which are currently being investigated. The purpose of this dissertation was to examine conventional (microbiology, histology) and novel techniques (primary multiplex PCR, sonication) for the detection of infections in patients with nonunions after osteosynthetic treatment. *Methods:* A total of 38 patients that underwent revisions with explantations of their osteosynthesis at the Charité - Universitätsmedizin Berlin between May 2014 and April 2016 were included in this study. Based on the preoperative, clinical and radiological diagnosis they were classified into three groups: 17 patients with nonunions (pseudarthrosis), 15 patients with planned aseptic explantations (negative control) as well as 6 patients with clinical peri-implant infections (positive control). Cultures of peri-implant tissue, swab and sonication plus histopathological and molecular multiplex PCR examinations (Unyvero i60 ITI System, Curetis GmbH, Holzgerlingen, Germany) of peri-implant tissue were performed. An infection was defined as the presence of equivalent, microbiological pathogen detections or a positive histopathological result (Morawietz). *Results:* 9 out of 17 patients with nonunions fulfilled the infection criteria. PCR offered a sensitivity of 33 % and specificity of 88 %. The microbiological analyses of sonication, swab and peri-implant tissue showed sensitivities of 89 % versus 63 % versus 78 % and specificities of 38 % versus 83 % versus 88 %. Histopathological evaluation offered a specificity of 100 % with a sensitivity of 38 %. *Discussion:* Our results showed that, despite a brief processing time of 5 hours, the accomplishment of multiplex PCR using tissue is not comparable to conventional techniques. Due to high sensitivity the application of sonication seems to be useful in the future with respect to low specificity. Cultures of tissue generated a reliable sensitivity and specificity. Consequently, it is regarded as the legitimate gold standard. In conclusion, the amount of septic nonunions exceeds (53 %) previous estimations. Further modifications, notably for PCR, are necessary to implement these novel procedures for routine diagnostics and to ascertain the real rate of septic nonunions.

## Abkürzungsverzeichnis

AO	<i>Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSG	<i>Blutsenkungsgeschwindigkeit</i>
CrP	<i>C-reaktives Protein</i>
CT	<i>Computertomographie</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)</i>
ESCMID	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
ESWT	<i>extracorporeal shockwave therapy</i>
IAI	<i>implantatassoziierte Infektionen</i>
ITI	<i>Implant &amp; Tissue Infection</i>
LIPUS	<i>low intensity pulsed ultrasound</i>
MRT	<i>Magnetresonanztomographie</i>
NPV	<i>negativ prädiktiver Wert</i>
NSAR	<i>nicht-steroidale Antirheumatika</i>
NUSS	<i>Non-Union Scoring System</i>
ORIF	<i>open reduction and internal fixation</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)</i>
PET-CT	<i>Positronenemissionstomographie-Computertomographie</i>
PJI	<i>periprosthetic joint infection</i>
PPV	<i>positiv prädiktiver Wert</i>
RIA	<i>Reaming-irrigation-aspiration</i>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Weber/Czech Klassifikation der Pseudarthrosen .....	15
Abbildung 2: Entstehung und therapeutische Bedeutung des Biofilms .....	22
Abbildung 3: Prinzipieller, schematischer Ablauf eines PCR-Zyklus in drei Phasen .....	25
Abbildung 4: Übersicht der Gruppeneinteilung .....	28
Abbildung 5: Graphische Übersicht zu Unyvero Geräten (5a) und Darstellung der Unyvero ITI Kartusche (5b) .....	30
Abbildung 6: Grundlegender Ablauf der Laborarbeit entsprechend des Laborhandbuches von Curetis .....	33
Abbildung 7: Darstellung positiver Untersuchungsbefunde und ihre Relationen zueinander innerhalb der Pseudarthrosen-Gruppe .....	44
Abbildung 8: Übersicht zur Erfüllung der Infektionskriterien und Beitrag einzelner Diagnostikmethoden .....	47
Abbildung 9: Anteil an erfüllten Infektionskriterien und positiven PCR-Befunden in der Pseudarthrosen-Gruppe .....	48
Abbildung 10: Befunde von PCR-positiven Patienten in absoluten Zahlen (10 a) sowie deren Relationen (10 b) .....	49
Abbildung 11: Klinische und analytische Performance der PCR bei Kultur-positiven Patienten innerhalb der Pseudarthrosen-Gruppe .....	51
Tabelle 1: AO-Klassifikation der Frakturen .....	9
Tabelle 2: Risikofaktoren zur Entwicklung einer Pseudarthrose .....	14
Tabelle 3: Diamant-Konzept .....	20
Tabelle 4: Diagnostische Kriterien zur Definition einer periimplantären Infektion .....	21
Tabelle 5: Übersicht detektierbarer Mikroorganismen mittels Unyvero ITI Kartusche .....	35
Tabelle 6: Histopathologische Konsensus-Klassifikation der periprothetischen Membran .....	37
Tabelle 7: Übersicht der Patientencharakteristika unter Berücksichtigung verschiedener Studiengruppen .....	38
Tabelle 8: Übersicht der Resultate aller diagnostischen Untersuchungsmethoden .....	40
Tabelle 9: Abundanz der detektierten Pathogene aller diagnostischen Methoden .....	45
Tabelle 10: Vergleich der PCR zur konventionellen Kultur von periimplantärem Gewebe (Pseudarthrosen-Gruppe) .....	49
Tabelle 11: Statistische Analyse der durchgeführten Diagnostikmethoden zur Identifikation einer Infektion .....	52
Tabelle 12: Übersicht der Raten an septischen Pseudarthrosen in Studien .....	54
Tabelle 13: Übersicht statistischer Parameter von PCR-Studien bei periprothetischen Gelenkinfektionen unter Verwendung des Unyvero Implant & Tissue Infection (ITI) Multiplex-PCR Systems der Firma Curetis .....	57

# 1 Einleitung

## 1. 1 Fraktur, Frakturheilung und Komplikationen

Gemäß einer Schätzung der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin verletzten sich im Jahr 2015 mehr als 9,7 Millionen Menschen in Deutschland bei Unfällen.<sup>1</sup> Ein erheblicher Anteil der nichttödlichen Zwischenfälle ist, insbesondere im höheren Lebensalter, auf Stürze zurückzuführen.<sup>2</sup> Nach einem Bericht des Robert Koch-Instituts verletzten sich 2,6 % der Erwachsenen innerhalb eines Jahres durch Sturzunfälle und wurden nachfolgend ärztlich behandelt. Bei circa jedem dritten Sturz trat dabei ein Knochenbruch auf.<sup>2</sup> Eine derartige, vollständige ossäre Kontinuitätsunterbrechung wird als Fraktur definiert, wohingegen bei einer Spaltbildung ohne holotische Kontinuitätsunterbrechung eine Fissur vorliegt.<sup>3</sup> Die Inzidenz von Frakturen beträgt für beide Geschlechter etwa 11 pro 1000 pro Jahr.<sup>4</sup>

Zur Gewährleistung einer einheitlichen Deskription von Frakturen werden sie anhand der Klassifikation der Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese (AO) kategorisiert.<sup>5-7</sup> Mittels dieser Zahlen- und Buchstabenkombination soll eine präzise Darstellung der Fraktur ermöglicht werden.<sup>3</sup> Während die ersten beiden Zahlen der finalen Kombination zur exakten Lokalisationsbeschreibung dienen, vermittelt der folgende Teil des Codes genauere Infos zur Morphologie der Fraktur (siehe Tabelle 1).<sup>5-7</sup> Eine einfache diaphysäre Oberarmfraktur wird demnach kodiert als 12-A1.<sup>3</sup>

Der Knochen ist eines der wenigen Organe beziehungsweise Gewebe, welches auch im Erwachsenenalter das Potential zur Regeneration beibehält.<sup>8</sup> Eine weitere Besonderheit besteht darin, dass beim Heilungsprozess ein Ersatzknochen entsteht, welcher mit den biomechanischen Eigenschaften des Knochens vor der Fraktur korrespondiert.<sup>9,10</sup> Dies ist konträr zu anderen Geweben des menschlichen Körpers, bei denen meist eine Defektheilung über Narbengewebe mit verminderter Qualität resultiert.<sup>8,9</sup> Die Intention einer Frakturheilung ist stets die Wiederherstellung der Funktion des zuvor intakten Knochens.<sup>9</sup> Zur Realisierung dieses Ziels ist eine Vielzahl von präzise abgestimmten biologischen Prozessen erforderlich, welche Parallelitäten zur embryonalen Skelettentwicklung aufzeigen.<sup>9</sup> Dabei wird zwischen zwei elementaren Formen der Knochenheilung (direkt und indirekt) differenziert:

Die indirekte oder sekundäre Knochenheilung gleicht dem physiologischen Heilungsprozess nach einer Verletzung und durchläuft mehrere, sich teilweise überlappende Phasen.<sup>3,11</sup> Zunächst kommt

Tabelle 1: AO-Klassifikation der Frakturen adaptiert nach Niethard<sup>3</sup> sowie AO Foundation<sup>5</sup>

Parameter des Codes	Zahlen- und Buchstabenzuordnung	
<b>1. Körperregion (Knochen oder Knochengruppe)</b>	1 = Oberarm (Humerus) 2 = Unterarm (Radius bzw. Ulna) 3 = Oberschenkel (Femur) 4 = Unterschenkel (Tibia bzw. Fibula) 5 = Wirbelsäule 6 = Becken 7 = Hand 8 = Fuß 9 = Kraniomaxillofaziale Gruppe 14 = Schulterblatt (Skapula) 15 = Schlüsselbein (Klavikula) 16 = Brustkorb (Thorax)	
<b>2. Segment innerhalb der Region (lange Röhrenknochen)</b>	1 = proximal 2 = diaphysär 3 = distal 4 = Sonderfall Tibia/Fibula: malleolär	
<b>3. Schweregrad bzw. Typ</b>	<i>Schaftfrakturen:</i> A = einfach B = Keilfraktur C = mehrfachfragmentär	<i>Gelenkfrakturen:</i> A = extraartikulär B = partielle Gelenkfraktur C = vollständige Gelenkfraktur
<b>4. Gruppe</b>	<i>Schaftfrakturen:</i> Gruppe A: spiralförmig (1), schräg (2), quer (3) Gruppe B: intakt (2), fragmentiert (3) Gruppe C: intakt segmental (2), fragmentiert segmental (3)	
	<i>Gelenkfrakturen:</i> Gruppe A: Abrissfraktur (1), einfach (2), mehrfachfragmentär (3) Gruppe B: einfach (1), Splitterfraktur (2), fragmentiert (3) Gruppe C: einfach artikulär und einfach metaphysär (1), einfach artikulär und multifragmentär metaphysär (2), multifragmentär artikulär und metaphysär (3)	

es bei der initialen *Frakturphase* durch die Gewalteinwirkung zur Schädigung von Knochenhaut (*Periost*), Knochenrinde (*Substantia corticalis*), Knochenmark (*Medulla ossium*) sowie angrenzendem Weichteilgewebe.<sup>11,12</sup> Da hierbei periostale sowie endostale Gefäße lädiert werden, resultiert die Ausbildung eines Frakturhämatoms.<sup>9</sup> Dies ermöglicht jedoch auch das Einwandern von Wachstumsfaktoren und pluripotenten Zellen, welche nachfolgend im Frakturspalt aktiviert werden und somit zur zweiten Phase, der *Entzündungsphase*, führen.<sup>12</sup> Meist nur wenige Tage andauernd, ist sie durch eine überschießende Kapillarausbildung, Zellproliferation sowie das

Einströmen neutrophiler Granulozyten und Makrophagen charakterisiert.<sup>3,9,11,12</sup> Diese Phase ist daher sowohl für die Phagozytose abgestorbener Zellen und Gewebereste als auch für die Initiation immunologischer Prozesse der Wundheilung verantwortlich.<sup>9</sup> In der darauffolgenden *Granulationsphase* wandern Fibroblasten, Chondroblasten sowie Osteoblasten ein, welche das primäre Frakturhämatom sukzessive durch Granulationsgewebe ersetzen.<sup>11,12</sup> Die erste interfragmentäre Brückenbildung ist damit abgeschlossen. Es entsteht der sogenannte weiche Kallus. Gleichzeitig wächst von der Knochenmarkhöhle (*Cavitas medullaris*) ausgehendes, undifferenziertes embryonales Bindegewebe (*Blastem*) in die Frakturspalten ein und füllt diese als medullärer Kallus aus.<sup>11,12</sup> Als Folge dieses Prozesses, welcher nach etwa drei bis vier Wochen vollendet ist, liegt nach einmonatiger Verletzungsdauer eine Kombination aus bindegewebigen und knorpeligen Verbindungen der Frakturfragmente vor (*enchondrale Ossifikation*).<sup>9,11</sup> Dies bildet die Ausgangsbasis für die sich anschließende *Phase der Kallushärtung*, in der diese vorübergehenden Verbindungen mineralisieren und zu einem noch unreifen, aber deutlich stabileren knöchernen Kallus beziehungsweise Geflechtknochen transformiert werden.<sup>3,11</sup> Des Weiteren erfolgt in dieser mehrere Wochen bis Monate andauernden Phase ein Abbau nekrotischer Knochenbestandteile.<sup>11,12</sup> Während in diesem Zeitraum radiologisch bereits eine Konsolidierung nachweisbar ist, äußert sich der Fortschritt klinisch durch eine Schmerzreduktion.<sup>9,12</sup> In der abschließenden *Remodelling-* bzw. *Umbauphase* erfolgt die Dekomposition des fibrösen Knochens und die belastungsadaptierte, funktionelle Umstrukturierung zum reifen Lamellenknochen, welcher der Qualität des ursprünglichen Knochens entspricht.<sup>3,9,12</sup> Dieser Prozess kann einige Jahre fortwähren und ist erst nach holotischem Abschluss der biochemischen Reparaturvorgänge vollendet.<sup>12</sup>

Die direkte oder primäre Knochenheilung hingegen findet nur bei stabiler Fraktursituation mit absoluter Ruhigstellung ohne Makrobewegungen der Bruchfragmente statt.<sup>9,11,12</sup> Die Selektion des Osteosyntheseverfahrens (absolut stabil oder relativ stabil) beeinflusst somit die interfragmentäre Mobilität und bestimmt dadurch die Art der Frakturheilung (primär oder sekundär).<sup>9</sup> Im Gegensatz zur indirekten Form entsteht der neue Knochen bei der primären Variante, analog zur embryonal-desmalen Ossifikation, direkt aus den mesenchymalen Zellen.<sup>9</sup> Es existiert keine Zwischenstufe über eine Knorpelbildung beziehungsweise die zuvor beschriebene Kallusbildung. Die Phasen der Entzündung, Granulation und Kallushärtung werden auf Kosten der dabei resultierenden Stabilität übersprungen.<sup>11</sup> Eine weitere Voraussetzung für diese Form der Knochenheilung ist ein adäquater Vaskularisationszustand.<sup>3</sup> Dies gewährleistet, dass die neu gebildeten Havers-Systeme (*Osteone*) inklusive ihrer Gefäßeinsprossungen den Frakturspalt direkt durchwandern, entlang der

Frakturfragmente wachsen und diese verbinden können (Kontaktheilung).<sup>3,11</sup> Auch bei der Präsenz von kleinen Knochenspalten zwischen den Fragmenten findet unter stabiler Fixation eine Komplementierung mittels Knochen ohne vorherige Zwischenstufen statt (Spaltheilung).<sup>13</sup> Der gesamte Heilungsprozess der direkten Knochenheilung bis zur vollständigen Wiederherstellung des ursprünglichen Funktionszustandes (*Restitutio ad Integrum*) dauert circa 18 bis 24 Monate.<sup>3,12</sup>

Obwohl die Fachliteratur zwischen diesen beiden Knochenheilungsformen differenziert, ist die finale physiologische Frakturheilung wohl am ehesten als Kombination beider Varianten anzusehen, bei der eine Form überwiegt.<sup>9</sup> Der gesamte Prozess einer suffizienten Frakturheilung kann abhängig von der Lokalisation und den morphologischen Eigenschaften der Fraktur unterschiedliche Zeitspannen und Therapieregime erfordern.<sup>3</sup> In diesem Zusammenhang wurde auch der Begriff „*fracture personality*“ geprägt, welcher veranschaulicht, dass jede Fraktur in ihrer Existenz und den dazugehörigen Umgebungsfaktoren einzigartig ist und folglich individuell analysiert sowie behandelt werden muss.<sup>14-16</sup> Zur Unterstützung des Heilungsprozesses stehen verschiedene ärztliche Interventionen zur Verfügung.

Zu den konservativen Maßnahmen zählen immobilisierend-stützende Verbände (zum Beispiel Gilchristverband), Gipsverbände sowie die begleitende Schmerztherapie.<sup>3</sup> Demgegenüber existieren operative Versorgungsmöglichkeiten, welche durch die stetige Weiterentwicklung der Techniken und Implantate zunehmend an Bedeutung gewinnen.<sup>3</sup> Die chirurgische Unterstützung der Knochenbruchheilung mittels Applikation von Implantaten wie Platten, Schrauben, Drähten, Nägeln oder Fixateur externe wird als Osteosynthese bezeichnet.<sup>3</sup> Als alternative Optionen sind Entfernung der Frakturreste (Resektion), Versteifung (zum Beispiel Arthrodesen) und Gelenkersatz mittels Endoprothese zu nennen.<sup>3</sup> Trotz ihrer unterschiedlichen Behandlungsansätze weisen konservative und operative Therapien einen grundlegenden dreiteiligen Verlauf auf: Nach der Wiederherstellung (Reposition) der ursprünglichen ossären Anatomie (absolute Stabilität) bzw. der Achse, Länge und Rotation (relative Stabilität) folgt die Ruhigstellung und Schienung (Retention) mit abschließendem Nachbehandlungskonzept (Rehabilitation).<sup>3,17</sup> Der Vorteil einer Osteosynthese liegt darin, dass nach vollzogener Reposition die Verwendung von Implantaten eine optimale Retention aufrechterhalten bzw. bei übermäßiger Dislokation grundsätzlich erst ermöglichen kann.<sup>3</sup> Des Weiteren erfolgt in der Regel die Rehabilitation früher als bei der konservativen Behandlung, wodurch immobilisationsbedingte Defizite vermieden werden.<sup>3</sup>

Bei mehr als 90 % aller Frakturen findet eine erfolgreiche Frakturheilung statt.<sup>18</sup> Unabhängig von ärztlichen Interventionsformen im Rahmen der Therapie können jedoch

Komplikationen bei der Frakturheilung auftreten.<sup>3</sup> Neben direkten Komplikationen wie sekundären Weichteilschäden mit Beeinträchtigung von Durchblutung, Motorik und Sensibilität (DMS) oder Verletzungen innerer Organe sind weiterhin indirekte Erscheinungen zu beachten. Zu Letzteren werden unter anderem Frakturheilungsstörungen, Refrakturen, Ermüdungsfrakturen, das Kompartmentsyndrom sowie die posttraumatische Osteomyelitis und Arthrose gezählt.<sup>3</sup> Ursächlich ist hierbei meist ein Ungleichgewicht von miteinander interagierenden biochemischen und biomechanischen Faktoren, welches den Prozess der Knochenheilung beeinträchtigt.<sup>12,19</sup> Kann diese Störung des Gleichgewichts nicht arretiert und normiert werden, ist eine physiologische und erfolgreiche Frakturheilung nicht gewährleistet.<sup>12,19</sup> Eine mögliche Folgeerscheinung ist das orthopädisch-unfallchirurgische Krankheitsbild der Pseudarthrose.

## 1.2 Pseudarthrosen

### 1.2.1 Definition, Epidemiologie und ökonomische Bedeutung

Als Frakturheilungsstörungen bezeichnet man unvollständige knöcherne Konsolidierungen, welche über den herkömmlichen Zeitraum hinaus andauern.<sup>19</sup> Per definitionem werden sie vier bis sechs Monate nach einer Verletzung als verzögerte Frakturheilung („*delayed-union*“) sowie nach einer Zeitspanne von sechs Monaten als Pseudarthrosen („*non-union*“) determiniert.<sup>3,19,20</sup> Obwohl die FDA (Food and Drug Administration) der Vereinigten Staaten von Amerika eine Pseudarthrose als inkomplette Frakturheilung neun Monate nach der Verletzung mit ausbleibender radiologischer Progression der Frakturdurchbauung über drei Monate definiert, hat sich in Deutschland die bereits beschriebene halbjährliche Grenze für dieses Krankheitsbild etabliert.<sup>10,18,21-23</sup> Die alleinige Festlegung anhand des Zeitraumes wird jedoch teilweise kritisch hinterfragt, da jede Fraktur aufgrund ihrer Lokalisation und weiteren Einflussfaktoren (siehe Risikofaktoren) einen individuellen Heilungsprozess aufweist.<sup>12,23</sup> Zur Diagnosestellung ist daher auch stets die klinische Expertise des behandelnden Arztes relevant.<sup>23</sup>

In Abhängigkeit von Faktoren wie Lokalisation, Frakturform, begleitendem Weichteilschaden sowie Therapieform werden bei Pseudarthrosen, auch als posttraumatische Falschgelenke bezeichnet, unterschiedliche Zahlenangaben zur Häufigkeit beschrieben.<sup>13,20</sup> Bezogen auf alle Frakturen am menschlichen Körper werden überwiegend Zahlen unterhalb von 15 % genannt.<sup>24-26</sup> Eine verzögerte Frakturheilung ist bei 5 - 10 % aller Frakturen zu erwarten, eine Pseudarthrose resultiert bei 1 - 5 % aller Knochenbrüche.<sup>22,27</sup> Demnach handelt es sich bei Pseudarthrosen um ein häufiges Krankheitsbild.<sup>27</sup> Aufgrund der erhöhten mechanischen Belastung, geringen

Weichteildeckung mit Gefahr der offenen Fraktur und weniger ausgeprägten Vaskularisation sind die unteren Extremitäten bzw. die Tibia besonders vulnerabel.<sup>28-30</sup> Bezüglich der Tibia können dadurch sogar Pseudarthrosenraten von bis zu 45 % auftreten.<sup>29</sup>

Eine schwerwiegende Komplikation des Krankheitsbildes, die vor allem nach offenen Frakturen entstehende Infekt-pseudarthrose, wird mit einer Häufigkeit von 15 % aller Pseudarthrosen angegeben.<sup>27,28</sup> Ob dies wirklich der Realität entspricht, wird durch neuere molekulare Untersuchungsmethoden hinterfragt, welche Infektionsraten bis zu 88 % nachweisen konnten.<sup>31</sup>

Während Männer ein Pseudarthrosen-Maximum im Alter von 25 bis 34 Jahren aufweisen, sind bei Frauen Höchstwerte im Bereich von 65 bis 74 Jahren zu verzeichnen.<sup>26</sup> Obwohl die Frakturzahl mit zunehmendem Alter ansteigt (unter anderem bedingt durch Osteoporose sowie Koordinationsschwierigkeiten), liegt der Höhepunkt an Pseudarthrosen geschlechtsneutral betrachtet etwa bei 35 bis 44 Jahren – im optimalen erwerbsfähigen Lebensabschnitt.<sup>23,26,32</sup>

Aus einer amerikanischen Studie geht zudem hervor, dass die Therapie von Patienten mit Pseudarthrosen am Tibiaschaft mehr als den doppelten Kostenumfang im Vergleich zu Patienten mit planmäßiger Heilung der Tibiafraktur nach sich zieht (25.556 \$ versus 11.686 \$).<sup>33</sup> Folglich resultieren aus diesem Krankheitsbild nicht nur prolongierte körperliche Defizite und verlängerte Krankenhausaufenthalte mit Einschränkung der Lebensqualität, sondern auch erhebliche gesundheitsökonomische Kosten (Operationen, Schmerzmedikation, Lohnausfälle).<sup>19,32</sup> Daher ist neben einer optimalen Therapie die exakte Analyse von Risikofaktoren und deren Prävention von enormer Relevanz.<sup>19,33</sup>

### 1.2.2 Ätiologie, Pathogenese und Klassifikationen

Es existieren verschiedene Einflussfaktoren, welche die Frakturheilung beeinträchtigen können. Dabei unterscheidet man lokale und systemische Risikofaktoren für Pseudarthrosen, welche in der Tabelle 2 aufgelistet sind.<sup>12</sup> Als wichtige lokale Faktoren sind neben Tibiafrakturen vor allem offene Frakturen mit ausgeprägtem Weichteilschaden sowie offene Repositionen mit nachfolgender Implantation einer Osteosynthese („*open reduction and internal fixation*“, kurz: ORIF) zu nennen, welche Infektionen als weiteren Risikofaktor begünstigen.<sup>34-37</sup> Zu den systemischen Risiken zählt insbesondere der Konsum von Zigaretten, welcher unter anderem über den gefäßverengenden Effekt (Vasokonstriktion) des Nikotins zur Minderperfusion und folglich reduzierten Knochenheilung führt.<sup>37</sup> Aufgrund des dezelerierten Knochenstoffwechsels wird auch ein höheres Lebensalter als Risikofaktor angenommen.<sup>37</sup>

Tabelle 2: Risikofaktoren zur Entwicklung einer Pseudarthrose nach Calori<sup>14</sup>, Miska<sup>12</sup>, Santolini<sup>36</sup>, Copuroglu<sup>37</sup>

Lokale Faktoren	Systemische Faktoren
Fraktureigenschaften <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lokalisation (typisch: Tibia)</li> <li>• Dislokation der Fragmente</li> <li>• Frakturtyp (Trümmerfraktur)</li> <li>• offene Fraktur</li> </ul>	Einnahme von bestimmten Medikamenten <ul style="list-style-type: none"> <li>• nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR)</li> <li>• Immunsuppressiva (Glukokortikoide)</li> <li>• Antibiotika (zum Beispiel Chinolone)</li> <li>• Antikoagulantien</li> </ul>
Ausgeprägte Weichteilschäden	Rauchen
Störungen der Vaskularisation	Alkohol (exzessive Dosen)
Behandlungsform <ul style="list-style-type: none"> <li>• Offene Frakturpositionierung</li> <li>• Inadäquate mechanische Stabilisierung durch das verwendete Implantat (Osteosynthese)</li> </ul>	Komorbiditäten <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabetes mellitus</li> <li>• Osteoporose</li> <li>• Periphere Vaskulopathien</li> </ul>
Infektion	Höheres Lebensalter

Für eine optimale Therapie ist ein analytisches Verständnis der Kausalität einer Pseudarthrose notwendig.<sup>19</sup> Im Allgemeinen handelt es sich dabei um einen multifaktoriellen Prozess, welcher durch bestimmte Faktoren begünstigt wird (siehe Tabelle 2).<sup>38</sup> Grundlegend werden zwei verschiedene Ursachen differenziert: mechanische und biologische Probleme.<sup>3</sup> Erstere sind durch inadäquate Reposition und mangelhaften Kontakt der Frakturfragmente (zum Beispiel durch Weichteilinterposition) sowie vorzeitige oder unzureichende Mobilisierung mit resultierender interfragmentärer Unruhe bei prinzipiell intakten biologischen Heilungsprozessen gekennzeichnet.<sup>3,30,39</sup> Infolgedessen kann keine physiologische Überbrückung des Frakturspaltens durch Kallusbildung erfolgen.<sup>40</sup> Als biologische Ursache ist vor allem eine insuffiziente Vaskularisation hervorzuheben, welche mit erheblichen Weichteildefekten oder Komorbiditäten wie peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) sowie Diabetes mellitus korrespondiert.<sup>3</sup> Neben lokalen Infektionen zählen außerdem weitere knochenheilungsinhibierende Faktoren wie bestimmte Medikamente (siehe Tabelle 2), Nikotin- und exzessiver Alkoholkonsum dazu.<sup>3</sup>

Prinzipiell müssen angeborene von erworbenen Pseudarthrosen unterschieden werden.<sup>40</sup> Angeborene Formen können idiopathisch oder im Rahmen einer fibrösen Dysplasie beziehungsweise Neurofibromatose auftreten.<sup>40</sup> Bei den erworbenen Pseudarthrosen hat sich die 1973 eingeführte Klassifikation nach Weber und Czech im klinischen Alltag etabliert.<sup>23</sup> Präoperativ wird basierend auf dem klinischem und radiologischem Erscheinungsbild eine

Unterteilung in meist mechanisch bedingte, biologisch reaktionsfähige (vital bzw. hypertroph) sowie biologisch inaktive (avital bzw. atroph) Pseudarthrosen vorgenommen (siehe Abb. 1).<sup>23,41</sup>

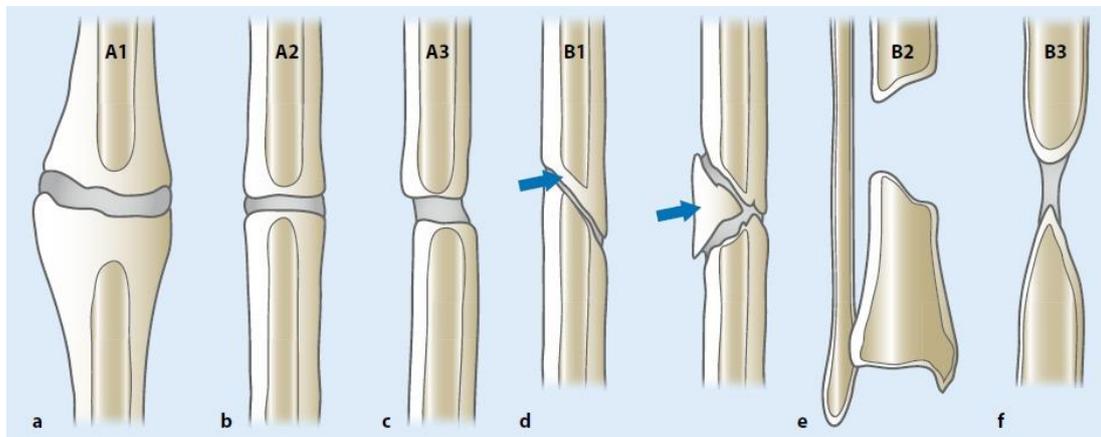


Abbildung 1: Weber/Czech Klassifikation der Pseudarthrosen adaptiert nach Everding<sup>23</sup> (mit Genehmigung durch Springer Nature)

Vitale Pseudarthrosen	A1 – A3:	a) reaktiv hypertroph	b) kallusarm	c) kalluslos
Avitale Pseudarthrosen	B1 – B3:	d) Drehkeilpseudarthrose	e) Defektpseudarthrose	f) atroph

Die hypertrophe kallusreiche Form (siehe Abbildung 1: Typ A1) resultiert beispielsweise aus einer insuffizienten Ruhigstellung oder vorzeitigen Belastung mit nachfolgender reaktiver Verbreiterung der Frakturenenden als Ausdruck der interfragmentären Unruhe.<sup>13</sup> Bei den kallusarmen und kalluslosen beziehungsweise oligotrophen Varianten (Typ A2 und A3) sind zusätzlich zur mechanischen Problematik biologische Defizite existent.<sup>40</sup> Avitale Pseudarthrosen zeichnen sich durch störende intermediäre Fragmente (Typ B1), osteologisch tote Bereiche als Folge umfangreicher Knochendefekte (Typ B2) oder arretierte Reparationsprozesse (Typ B3) aus.<sup>40</sup> In diesem Zusammenhang wird meist auch die Relevanz der gestörten Durchblutung hervorgehoben.<sup>22</sup> Es fehlt eine suffiziente Kallusbildung – ein Heilungspotential liegt nicht vor.<sup>22</sup> Obwohl es sich hierbei um die meistverwendete Klassifikation handelt, wird diese zunehmend hinterfragt.<sup>41</sup> Insbesondere der Aspekt der unzureichenden Vaskularisierung wird angezweifelt, da mehrere Studien zeigen konnten, dass atrophe Pseudarthrosen nicht avaskulär sind.<sup>38,41,42</sup>

Des Weiteren wurden andere, weniger gebräuchliche Klassifikationen entwickelt.<sup>32</sup> Paley unterteilt beispielsweise nach dem Ausmaß des Knochenverlustes in Typ A (< 1 cm) und Typ B (> 1 cm).<sup>41,43</sup> Erstere werden zudem nach der Deformitäten-Mobilität in lockere und steife Pseudarthrosen (Typ A1 und A2) sowie letztere nach dem Grad der Knochenverkürzung (Typ B1 bis B3) untergliedert.<sup>43</sup>

Eine weitere, therapierelevante Unterscheidung ist die Differenzierung in aseptische und septische Pseudarthrosen.<sup>22</sup> Eine Infektion inhibiert, bedingt durch die Resorption von infiziertem inklusive neu synthetisiertem Weichteil- und Knochengewebe, die posttraumatische Differenzierung des Granulations- und Bindegewebes zu Faserknochen. Dadurch wird die Frakturheilung beeinträchtigt und eine septische Pseudarthrose entsteht.<sup>40</sup> Die Infektpseudarthrose ist folglich ein Zustand, bei dem neben der fehlenden ossären Konsolidierung eine Infektion vorliegt.<sup>44</sup> Die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung dieser Variante der Pseudarthrosen ist bei offenen Frakturen, langer Operationsdauer sowie bei insuffizienter Immunkompetenz oder Durchblutung erhöht.<sup>44</sup> Als häufigster Erreger ist *Staphylococcus aureus* zu verzeichnen.<sup>22</sup> Der Prozess kann akut, subakut oder chronisch verlaufen und zu einer Osteomyelitis fortschreiten, welche nach der Cierny-Mader Klassifikation eingeteilt wird.<sup>22</sup> Sie beurteilt neben der anatomischen Lokalisation auch den Zustand des Immunsystems, sodass abhängig von der individuellen Belastbarkeit des Patienten verschiedene Therapieregime empfohlen werden.<sup>22,45</sup>

Seit 2008 existiert eine additional, bereits validierte Klassifikation, das Non-Union Scoring System (NUSS), welche neben den bis zu diesem Zeitpunkt morphologisch-radiologisch fokussierten Einteilungen eine Vielzahl an zusätzlichen Parametern berücksichtigt (zum Beispiel vorherige Interventionen und individuelle Patientenfaktoren wie Nikotinkonsum, die Präsenz von Diabetes mellitus, den Infektionsstatus sowie den *American Society of Anesthesiologists Score*).<sup>16,23,29,41,46</sup> Anhand des ermittelten Punktwertes erfolgt eine Eingliederung in eine von vier Gruppen, welche mit zunehmenden Score komplexere Therapieempfehlungen suggeriert.<sup>16</sup>

### 1.2.3 Klinik und Diagnostik

Da jede Frakturheilung aufgrund der beschriebenen Einflussfaktoren individuell verläuft, gestaltet sich die Diagnosestellung einer Pseudarthrose nicht immer einfach.<sup>32</sup> Definitionsgemäß ist sie jedoch ab einer Dauer von sechs Monaten als solche zu werten.<sup>23</sup> Der grundlegende Verdacht ergibt sich bereits aus der Anamnese.<sup>32</sup> Typische klinische Beschwerden sind posttraumatisch persistierende, instabilitätsbedingte lokale Schmerzen inklusive Belastungsinsuffizienz.<sup>22,32,40</sup> Pseudarthrosen können sich allerdings auch klinisch inapparent darstellen.<sup>40</sup> In diesem Zusammenhang ist die detaillierte Erfassung und Analyse von Risikofaktoren (siehe Tabelle 2) essenziell.<sup>29</sup> Auch Indizien für vorherige Infektionen und die Applikation von Antibiotika müssen exploriert werden.<sup>18,29</sup>

Zunächst sollte bei der klinischen Untersuchung neben der Inspektion des fraktur-nahen Haut- und Weichteilgewebes eine Beurteilung des vaskulären, sensorischen sowie motorischen Zustandes

erfolgen.<sup>18,29</sup> Des Weiteren sind Fisteln sowie die klassischen Infektionszeichen Rötung (*rubor*), Überwärmung (*calor*), Schmerz (*dolor*), Schwellung (*tumor*) und Funktionseinschränkung (*functio laesa*) als Hinweise auf eine Infektpseudarthrose zu evaluieren.<sup>29,30,40</sup> Mögliche Befunde der passiven und aktiven Beweglichkeitsprüfung des betroffenen Körperareals stellen Instabilität mit pathologischer Mobilität sowie Achsen- und Rotationsabweichungen im Rahmen von Implantatlockerungen oder -brüchen dar.<sup>18,22,23,40</sup> Alle angrenzenden Gelenke sind dabei zu untersuchen, da Pseudarthrosen sekundär artikuläre Versteifungen induzieren können.<sup>40</sup> Okkasionell kann allerdings auch eine Kombination aus unauffälliger Anamnese und körperlicher Untersuchung vorliegen.<sup>32</sup>

Bei der apparativen Diagnostik ist die konventionelle Röntgenaufnahme in zwei Ebenen inklusive der angrenzenden Gelenke die Untersuchungsmethode der Wahl zur Begutachtung der Frakturkonsolidierung.<sup>12,18,28,44</sup> Verlaufskontrollen, welche mehrere Wochen bis Monate nach dem initialen Trauma einen persistierenden Frakturspalt aufzeigen, sind charakteristisch für Pseudarthrosen.<sup>19</sup> Während hypertrophe Pseudarthrosen eine überschießende Kallusbildung aufweisen, präsentiert sich die atrophe Form über insuffiziente Kallusbildung mit Sklerosierung der Frakturrenden.<sup>19</sup> Zusätzliche radiologische Indizien für das Vorliegen dieses Krankheitsbildes können Implantatversagen (Lockerungssaum, Implantatbruch) und fortschreitende Frakturdislokation sein.<sup>23</sup> Zur Beurteilung ossärer Modifizierungen im Verlauf der Frakturheilung ist ein Vergleich mit Voraufnahmen obligatorisch.<sup>22,23</sup> Der Nachteil von nativradiologischen Aufnahmen besteht jedoch darin, dass sie nicht immer eindeutig beurteilbar sind.<sup>22</sup> Bei fraglichen projektionsradiographischen Befunden, zum Beispiel nach komplexen Fraktursituationen oder durch das Vorhandensein von Implantaten, sowie zur detaillierten präoperativen Planung ist die Computertomographie (CT) das Verfahren der Wahl.<sup>12,22,28,44</sup> Auch sie erbringt keinen direkten Nachweis einer Infektpseudarthrose.<sup>44</sup> Allerdings sind mittels CT infektionsverdächtige Befunde wie Resorptionszonen, Lysen und Sequester akkurater zu detektieren und werden unter anderem laborchemisch nachverfolgt.<sup>12,28,30</sup>

Die Entzündungsparameter Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), C-reaktives Protein (CrP) sowie Leukozyten können bei Infektpseudarthrosen pathologisch erhöhte Werte aufweisen.<sup>22</sup> Sie stellen jedoch für sich betrachtet keine valide Untersuchungsmethode dar, weil sie bei niedriggradigen (*low-grade*) und chronischen Infektionen teilweise normwertig und in diesem Zusammenhang nicht ausreichend sensitiv bzw. spezifisch für eine Infektpseudarthrose sind.<sup>22,44,47</sup> Zur Evaluierung des Verlaufs hat sich dennoch der CrP-Wert konstituiert.<sup>28,44,47</sup>

Bei Verdacht auf eine Infektpseudarthrose ist zur Diagnosestellung der Erregernachweis über Gewebebiopsien mit nachfolgender kultureller Anzucht als Goldstandard anzusehen.<sup>27</sup> Dabei sollten mindestens drei Proben entnommen sowie, falls aus medizinischer Sicht tolerierbar, eine vorherige zweiwöchige Antibiotikakarenz beachtet werden.<sup>27</sup> Auch die histologische Analyse stellt ein valides Diagnostikmittel zur Sicherung der Infektion dar, sodass selbst bei negativem mikrobiologischem Befund ein positiver histologischer Nachweis eine Infektion verifiziert.<sup>27,48</sup> Ergo können Infektpseudarthrosen durch positive mikrobiologische oder histologische Befunde gesichert werden, wobei nur erstere die Möglichkeit des Erregernachweises offerieren.<sup>27,44</sup> Zudem erweist sich die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, kurz: PCR) als neue, innovative Untersuchungsmethode, welche bakterielles Erbgut amplifiziert und anschließend nachweist.<sup>27</sup> Der Nutzen dieses Verfahrens ist Gegenstand der aktuellen Forschung.<sup>27</sup>

Zur Evaluierung des Weichteilzustandes besteht die Option zusätzlich eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchzuführen.<sup>28</sup> Ihre Begutachtung kann jedoch durch vorliegende Metallimplantate limitiert werden.<sup>40,44</sup> Über die Eruierung einer Osteomyelitis oder eines Abszesses liefert sie außerdem Anhaltspunkte für eine Infektpseudarthrose.<sup>12</sup> Weiterhin kann mithilfe einer dynamischen kontrastmittelanreichernden MRT (*DCE-MRI*) der Vaskularisationsstatus des Knochengewebes analysiert werden, sodass eine therapierelevante Unterscheidung in vitale und nichtvitale ossäre Areale ermöglicht wird.<sup>12</sup>

Eine weitere Methode zur Darstellung der Perfusion ist die Sonographie.<sup>12</sup> Trotz ihrer potenziellen Verwendung zur Verlaufskontrolle der Kallusbildung bei oberflächlichen Knochen besitzt sie aufgrund ihrer Untersucherabhängigkeit und mangelhaften Reproduzierbarkeit nur eine untergeordnete Rolle bei der Pseudarthrosendiagnostik.<sup>22,23</sup> Ähnliches gilt für die nuklearmedizinischen Verfahren Positronenemissionstomographie-CT (PET-CT) sowie 3-Phasen-Skelettszintigraphie, welche Stoffwechselprozesse aufzeigen und in seltenen Fällen zur Verifizierung einer Infektpseudarthrose angewendet werden.<sup>12,23</sup>

#### 1.2.4 Therapie

Die korrekte, frühzeitige Diagnose einer Pseudarthrose sowie die Analyse der Ursachen mit resultierender exakter Klassifikation sind elementar für eine erfolgreiche Behandlung.<sup>19,22,27,28</sup> Die Ziele der Interventionen stellen die Realisierung einer belastungsfähigen, ossären Konsolidierung inklusive der Korrektur potenzieller Längenunterschiede und Fehlstellungen sowie der Sanierung von Weichteildefekten und infizierten Arealen dar.<sup>28,30,40</sup>

Vitale Pseudarthrosen werden, aufgrund ihrer mechanischen Ursachen, mittels Osteosynthesen (zum Beispiel winkelstabile Platten oder Nagelsysteme) stabilisiert bzw. die Stabilität einer bereits vorhandenen Osteosynthese verbessert oder eine vollständige neue, stabilere Osteosynthese etabliert.<sup>30,40</sup> Avitale Pseudarthrosen erfordern zusätzlich zur osteosynthetischen Stabilisierung eine Verbesserung der biologischen Voraussetzungen. Die bedarf in der Regel einer Anfrischung der Frakturrenden durch vorherige Resektion der betroffenen Bereiche (chirurgisches Debridement) mit anschließendem Defektaufbau.<sup>19,30,40</sup> Für geringfügige Defekte (< 2 bzw. 3 cm) ist die autologe Spongiosaplastik mit Materialgewinnung aus einem Beckenkamm bzw. dem Markraum langer Röhrenknochen mittels des RIA-Verfahrens (*Reaming-irrigation-aspiration*) als Standardprozedur anzusehen.<sup>19,23,49</sup> Zur Überbrückung ausgeprägter Knochendefekte (> 3 cm) werden die zweizeitige Masquelet-Technik oder die Kallusdistraktion verwendet.<sup>23,49</sup> Allogene Spongiosatransplantate besitzen bei der Pseudarthrosen-Therapie nur eine untergeordnete Rolle, da sie keine knocheninduzierenden Effekte aufweisen.<sup>24</sup> Weitere Alternativen sind die niedrig intensive gepulste Ultraschalltherapie (*low intensity pulsed ultrasound*, kurz: LIPUS) sowie die extrakorporale Stoßwellentherapie (*extracorporeal shockwave therapy*, kurz ESWT), welche über mechanische Wellen und deren Druckschwankungen positive Effekte bezüglich der Frakturheilung aufzeigen.<sup>10</sup> Trotz vielversprechender Ergebnisse in mehreren Studien, die teilweise sogar vergleichbare Erfolgsraten zur chirurgischen Therapie demonstrieren, konnten sich diese Verfahren bisher nicht im klinischen Alltag als Standard etablieren.<sup>10,22,50-53</sup>

Infektpseudarthrosen erfordern ein interdisziplinäres und mehrzeitiges Vorgehen.<sup>32,44</sup> Meist ist zunächst eine vollständige Entfernung vorliegender, infektionsbegünstigender Implantate mit radikalem chirurgischen Debridement sowie Resektion infizierter Weichteil- und Knochengewebe zur Infektsanierung notwendig.<sup>19,22,32</sup> Zusätzlich zur temporären Weichteildeckung wird das betroffene Areal ggf. mittels Fixateur externe fixiert, da Instabilitäten ebenfalls die Infektion begünstigen können.<sup>19,22,32</sup> Simultan zu den chirurgischen Interventionen erfolgt eine lokale (zum Beispiel in Form von antibiotikahaltigem Zement) sowie systemische Antibiotikatherapie.<sup>19,22</sup> Diese Maßnahmen werden bis zum Beweis der Infektionsfreiheit fortgeführt.<sup>19,32</sup> Abschließend steht der Defektaufbau mit den bereits erwähnten Verfahren im Mittelpunkt.<sup>19,32</sup>

Nach der Eradikation der Infektion bzw. bei aseptischen Pseudarthrosen orientieren sich die therapeutischen Maßnahmen am international anerkannten Diamant-Konzept, welches aktuell fünf essenzielle Faktoren für eine suffiziente Frakturheilung pointiert (siehe Tabelle 3).<sup>8,22,23,54,55</sup> Die Abwesenheit einer oder mehrerer dieser Faktoren prädisponiert zur Entwicklung einer

Tabelle 3: Diamant-Konzept adaptiert nach Giannoudis<sup>8,54</sup>, Steinhausen<sup>22</sup>, Schmidmaier<sup>29</sup>

Therapierelevante Faktoren	Interventionsbeispiele zur Optimierung
<b>Biomechanische Stabilität</b>	Osteosynthesen: Winkelstabile Implantate, dynamisierte Marknägel
<b>Osteogenese (Knochenbildung)</b>	Mesenchymale Stammzellen mit knochenbildendem Potenzial Autologe Spongiosa (Materialgewinnung: Beckenkamm, RIA)
<b>Osteoinduktion (Wachstumsstimulus)</b>	Spongiosa sowie Wachstumsfaktoren ( <i>Bone morphogenetic protein 2</i> und <i>7</i> ) fördern Differenzierung von Stammzellen
<b>Osteokonduktion (Knochengerüst)</b>	Gerüst als Matrix für neue Knochenzellen, realisierbar über: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Spongiosa</li> <li>• Synthetischer Knochenersatz (z. B. Trikalziumphosphat)</li> </ul>
<b>Vaskularisation</b>	Anfrischung der Frakturenden Verbesserung durch Induktion einer Masquelet-Membran

Pseudarthrose.<sup>18</sup> Daher müssen sie in die Therapieplanung gleichwertig einbezogen und optimiert werden, um einen erfolgreichen knöchernen Heilungsprozess zu gewährleisten.<sup>22</sup> Spongiosa besitzt hierbei die Besonderheit, dass sie über osteogene, osteoinduktive sowie osteokonduktive Effekte verfügt und folglich als therapeutischer Goldstandard angesehen wird.<sup>22</sup>

Summa summarum ist, entsprechend des Diamant-Konzeptes, bei hypertrophen Pseudarthrosen vor allem eine Optimierung der biomechanischen Stabilität relevant, während bei atrophischen Pseudarthrosen zusätzlich zur osteosynthetischen Versorgung insbesondere biologische Stimulanzen mit osteogenen, -induktiven sowie -konduktiven Eigenschaften indiziert sind.<sup>29</sup> Die Therapie der Infektpseudarthrose wird durch eine frühzeitige Infektsanierung mit sekundärem Defektaufbau charakterisiert.<sup>19,22,32</sup>

## 1.3 Periimplantäre Infektionen

### 1.3.1 Definition und Pathogenese

Die Präsenz von Implantaten (Osteosynthesen, Endoprothesen) reduziert die Erregermenge, welche für die Genese einer lokalen Infektion obligatorisch ist.<sup>20</sup> Mit einer Häufigkeit von 5 - 10 % bei Osteosynthesen sowie 1 - 3 % bei Endoprothesen stellen implantatassoziierte Infektionen (IAI) folglich eine gravierende Komplikation der orthopädisch-unfallchirurgischen Frakturversorgung dar.<sup>56-58</sup> Die Diagnose IAI ergibt sich aus Parametern wie Anamnese, klinischer Symptomatik, Bildgebung, mikrobiologischer, histologischer sowie zytologischer Untersuchung

Tabelle 4: Diagnostische Kriterien zur Definition einer periimplantären Infektion adaptiert nach Renz<sup>58</sup>

	Osteosynthesen	Prothesen
<b>Klinik<sup>a</sup></b>	Fistel, putride Wundsekretion oder sichtbares Implantat bzw. positive „probe-to-implant“-Untersuchung (bei Sondeneinführung Implantat direkt erreichbar)	
<b>Anamnese<sup>b</sup></b>	Ruhe- und Nachtschmerz, prolongierte Wundsekretion, vorangehende Revisionen und Antibiotikagaben	
<b>Radiologie<sup>b</sup></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Implantatlockerung</li> <li>• „Infektallus“</li> <li>• Knochensequester</li> <li>• Osteolysen</li> <li>• Sklerosierung der Kortikalis</li> <li>• Pseudarthrose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prothesenlockerung (Osteolysen, Prothesenmigration)</li> <li>• Heterotope Ossifikationen</li> <li>• Fistelgang<sup>a</sup></li> </ul>
<b>Histologie<sup>a</sup></b>	Infektionsnachweis im periimplantären Gewebe (> 5 Granulozyten pro Gesichtsfeld, 400-fache Vergrößerung)	Infektionsnachweis, falls 23 Granulozyten in 10 Gesichtsfeldern in 400-facher Vergrößerung (Typ II oder III nach Krenn und Morawietz)
<b>Zellzahl im Gelenkpunktat<sup>a</sup></b>	> 2000/µl Leukozyten oder > 70 % Granulozyten (PMN)	
<b>Mikrobiologie<sup>a</sup></b>	Erregernachweis in: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Synovialflüssigkeit (bei Gelenksbeteiligung bzw. Prothesen)</li> <li>• ≥ 2 Gewebeprobe(n) (bei hochvirulenten Erregern bereits ≥ 1 positive Gewebeprobe ausreichend)</li> <li>• Sonikationsflüssigkeit (Sonikat) ≥ 50 Kolonien/ml</li> </ul>	
<p><b>Legende:</b> Vorliegen einer Infektion, wenn ≥ 1 der mit (a) gekennzeichneten Kriterien erfüllt sind.  Bei mit (b) gekennzeichneten Kriterien handelt es sich um für eine Infektion suggestive Hinweise.  PMN = polymorphkernige Granulozyten</p>		

(siehe Tabelle 4).<sup>58</sup> Das Vorliegen von Fisteln, putriden Wundsekretion, der Infektionsnachweis mittels Histologie und Zytologie sowie mikrobiologische Erregernachweise nehmen hierbei eine besondere Stellung ein, da bei Erfüllung eines dieser Kriterien die Diagnose bereits gesichert ist.<sup>58</sup>

Ätiologisch unterscheidet man direkte Kontaminationen während des Traumas oder perioperativ (exogen) von postoperativen, hämatogenen (endogen) Infektionswegen.<sup>59,60</sup> Letztere weisen als potenzielle Primärherde vor allem Infektionen im Urogenital- und Gastrointestinaltrakt sowie der Haut und Lunge auf.<sup>56</sup> Erfolgt die Besiedlung der Implantatoberfläche durch Pathogene rapider als durch körpereigene Gewebezellen wie Fibroblasten oder Endothelzellen („race for the surface“), kann konsekutiv eine extensive Adhäsion und Kolonisation der

freibeweglichen (planktonischen) Erreger auf der Oberfläche des Implantats erfolgen.<sup>60-62</sup> In Abhängigkeit von opportunen Umgebungsfaktoren (offene Frakturen, Fremdmaterial, fehlende antibiotische Therapie, Immunsuppression) sowie erregerabhängigen Aspekten (Menge, spezieabhängige Adhäsionsneigung an Fremdoberflächen) ist eine Proliferation der initial adhärenen Bakterien möglich.<sup>61</sup> Nach mehreren Tagen resultieren festanhaftende, bakterielle Mikrokolonien, die als Biofilme bezeichnet werden (siehe Abbildung 2).<sup>61</sup> Diese Akkumulation von Mikroorganismen synthetisiert eine muköse, extrazelluläre Polysaccharidmatrix (EPM), welche die Erreger gerüstartig umgibt und als Barriere schützt, sodass final ein „reifer Biofilm“ vorliegt.<sup>61,63,64</sup> Die Funktion dieser komplexen Struktur besteht in einer optimalen Anpassung an Umweltbedingungen und fungiert somit als Überlebensstrategie.<sup>61</sup> Der Informationsaustausch über horizontalen Gentransfer innerhalb des Biofilms ist dabei ein möglicher Adaptationsvorgang, um sich den vorliegenden Umgebungsfaktoren anzupassen.<sup>61</sup> Zudem existiert eine interzelluläre Kommunikation namens „*quorum sensing*“, welche über die Detektion und Produktion von Signalmolekülen („*quorum sensing molecules*“) sowie Aktivierung von bestimmten Genen eine Regulation der Zelldichte innerhalb des Biofilms ermöglicht.<sup>61,64-66</sup> Des Weiteren verweilen die Mikroorganismen in einer metabolisch inaktiven Form (stationär bzw. sessil).<sup>61,67</sup> Daher sind reife Biofilme mit sessilen Erregern, im Gegensatz zur planktonischen Erregervariante, nur marginal suszeptibel bezüglich einer Antibiotikatherapie (siehe Abbildung 2).<sup>67,68</sup>

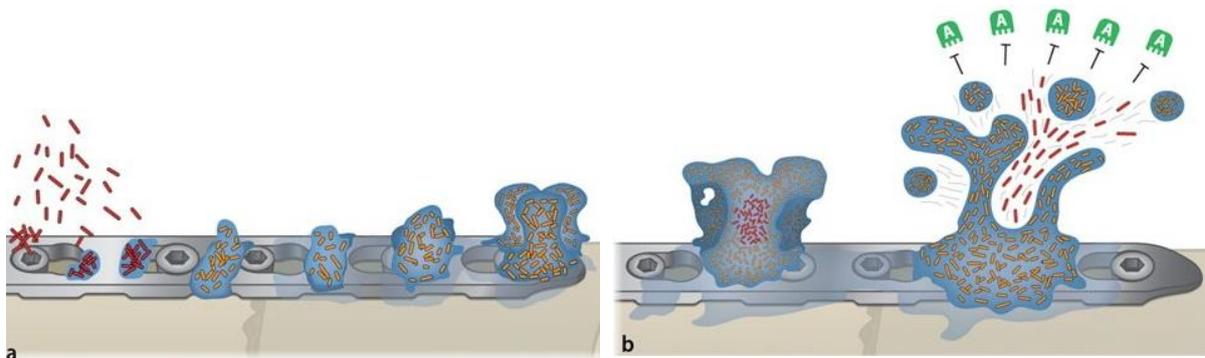


Abbildung 2: Entstehung und therapeutische Bedeutung des Biofilms adaptiert nach Dresing<sup>69</sup> (mit Genehmigung durch Springer Nature)

a) Freischwebende (planktonische) Erreger (rot) adhäreren an der Implantatoberfläche. Im Zusammenhang mit der Synthese einer umgebenden extrazellulären Polysaccharidmatrix erfolgt die Kolonisation (gelb).<sup>69</sup>

b) Der resultierende dreidimensionale Biofilm bedeckt das Implantat und kann zur Freisetzung von planktonischen und akkumulierten Mikroorganismen führen, welche wiederum neue Biofilme induzieren. Bakterien innerhalb des Biofilms sind gegen Antibiotika (grün) geschützt.<sup>69</sup>

Zusammenfassend handelt es sich bei reifen Biofilmen um hochkomplexe, dreidimensionale

Strukturen aus miteinander kommunizierenden Mikroorganismen inklusive der umgebenden Polysaccharidmatrix, welche sowohl gegen die angeborene und erworbene Immunabwehr des Patienten als auch die meisten Antibiotika resistent sind.<sup>60,61,64,70,71</sup> In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass eine asymptomatische Persistenz von Biofilmen möglich ist, sodass ein klinisch inapparenter Verlauf nicht mit einer Heilung verwechselt werden darf.<sup>60</sup>

Abhängig von der Pathogenese resultiert eine Diversität an potenziellen Erregern, wobei grampositive Mikroorganismen wie *Staphylococcus aureus* (30 %) und Koagulase-negative Staphylokokken (22 %) die häufigsten Vertreter darstellen.<sup>56,67</sup> Während Frühinfektionen vor allem durch hoch-virulente Pathogene wie *Staphylococcus aureus* und gramnegative Bakterien (z. B. *Escherichia coli*) verursacht werden, sind Spätinfektionen durch niedrig-virulente Entzündungen („low-grade“) mit Koagulase-negativen Staphylokokken (z. B. *Staphylococcus epidermidis*) oder *Propionibacterium acnes* charakterisiert.<sup>56</sup> Da persistierende Biofilme unter anderem Osteolysen, septische Implantatlockerungen sowie Pseudarthrosen implizieren, ist eine adäquate Diagnostik und Therapie obligatorisch.<sup>61</sup>

Mechanisch nicht nachvollziehbare Pseudarthrosen sollten bis zur konträren Verifizierung als implantatassoziierte Infektion angesehen werden.<sup>56</sup> Entgegen früherer Annahmen hat sich gezeigt, dass Biofilm-wirksame Antibiotika (Rifampicin bei grampositiven Bakterien sowie Ciprofloxacin bei gramnegativen) existieren.<sup>60,67</sup> In den ersten sechs postoperativen Wochen (*Frühinfekt*) besteht die Möglichkeit den noch nicht vollständig ausgereiften Biofilm mittels Antibiotikatherapie zu eradizieren.<sup>67,72</sup> Nach diesem Zeitraum (*Spätinfektion*) ist eine Heilung des Infektionsprozesses lediglich durch einen Implantatwechsel realisierbar.<sup>67,72</sup> Die Europäische Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionskrankheiten (ESCMID) setzt in ihrer Leitlinie mit drei Wochen ein strikteres Zeitlimit.<sup>71</sup> Demnach ist eine frühzeitige Diagnose unabdingbar.<sup>60</sup>

### 1.3.2 Konventionelle Untersuchungsmethoden

Während eindeutige klinische Zeichen (Fistel, sichtbares Implantat), eine positive histologische Analyse (erhöhte Anzahl an Granulozyten, Typ II und III der Klassifikation nach Krenn und Morawietz) sowie signifikante mikrobiologische Erregernachweise (zum Beispiel gleicher Mikroorganismus in mindestens 2 Gewebeproben durch kulturelle Anzucht) valide Kriterien zur Definition einer implantatassoziierten Infektion darstellen, sind positive radiologische Befunde und anamnestische Indizien lediglich hinweisgebend (siehe Tabelle 4).<sup>56,58</sup> Auch laborchemische Marker wie das CrP sind Anhaltspunkte für das Vorliegen einer IAI.<sup>59</sup> Aufgrund der niedrigen Sensitivität und Spezifität dient es aber lediglich als Screeningmethode.<sup>58</sup>

Der Goldstandard bleibt die mikrobiologische Untersuchung von Gelenkflüssigkeit (Prothesen) beziehungsweise intraoperativ gewonnenen Gewebebiopsien (Prothesen und Osteosynthesen).<sup>58</sup> Es wird empfohlen drei bis fünf Proben von repräsentativem Gewebe (periimplantär) für die nachfolgende histologische und mikrobiologische Analyse zu entnehmen.<sup>56,58</sup> Dabei sollte beachtet werden, dass die Biopsien optimalerweise nach einem antibiotikafreien Intervall von mindestens zwei Wochen erfolgen.<sup>58,59</sup>

### 1.3.3 Moderne Diagnostik

Der Nachteil der Gewebebiopsien ist, dass ausschließlich eine Einbeziehung von planktonischen Bakterien vorliegt.<sup>56,58</sup> Da die sessilen Mikroorganismen innerhalb des Biofilms hingegen nicht inkludiert werden, erscheint im Rahmen der Implantatentfernung die zusätzliche Untersuchungsmethode namens Sonikation vielversprechend.<sup>56,58,59</sup> Bei diesem innovativen Verfahren führen Ultraschallwellen durch mechanische Vibrationen von mehr als 20 Kilohertz (kHz) zu einer Ablösung des Biofilms von der Implantatoberfläche innerhalb eines Wasserbads.<sup>56,58,69</sup> Die Flüssigkeit, welche das Implantat umgibt, bezeichnet man als Sonikat.<sup>56</sup> Sie kann anschließend mittels mikrobiologischen Kulturen sowie molekularen Methoden wie der PCR hinsichtlich Mikroorganismen analysiert werden.<sup>73</sup> Der Infektionsnachweis mithilfe einer PCR stellt ebenso wie die Sonikation eine neuartige, erfolgsversprechende Technik dar.<sup>56</sup> Erstere bietet unter anderem den Vorteil, dass sogar nach antibiotischer Vorbehandlung eine Erregeridentifikation möglich ist.<sup>56,61</sup> Der Nutzen dieser Diagnostikmethode ist nicht abschließend geklärt, sodass weitere klinische Studien derzeit durchgeführt werden.<sup>56,58</sup>

## 1.4 Grundlegende Erläuterungen zur Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basiert auf dem 1985 von Kerry B. Mullis entwickelten Verfahren, welches eine Vervielfältigung (Amplifizierung) der Erbinformation in Form von doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (DNS bzw. Englisch: DNA) ermöglicht.<sup>74-76</sup> Dadurch kann ein spezifischer Bereich des genetischen Codes eines Organismus, analog der natürlichen DNA-Replikation, amplifiziert und nachfolgend aufgrund charakteristischer Sequenzbereiche zum Nachweis von speziellen Organismen (z. B. Bakterien, Viren) verwendet werden.<sup>74-77</sup> Bei dieser Methode unterscheidet man drei Phasen (siehe Abbildung 3):<sup>74,75,78</sup>

1. Denaturierung: Durch Erhitzen auf ca. 94 °C wird die originär doppelsträngige DNA (*template*) in ihre komplementären Einzelstränge aufgetrennt.
2. Hybridisierung (Annealing): Anschließend erfolgt eine Anlagerung von zwei

synthetischen, spezifischen, kurzen DNA-Fragmenten an den für die Untersuchung relevanten Genbereich. Diese auch als Oligonukleotide oder Primer bezeichneten DNA-Teilstücke sind komplementär und binden sich an ihren jeweiligen Einzelstrang. Die dafür notwendige Temperatur variiert in Abhängigkeit der Primer zwischen 40 und 70 °C.

3. Elongation: Mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase, welche aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird, kann bei ca. 72 °C durch den Einbau von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) ein neuer, zum jeweiligen Einzelstrang komplementärer DNA-Strang synthetisiert werden. Die Verlängerung (Elongation) beginnt an dem freien 3'-OH Ende der Primer und erfolgt in Richtung des anderen Primers, sodass final ein holoisches Duplikat des initialen DNA-Doppelstranges resultiert.<sup>74,75,78</sup>

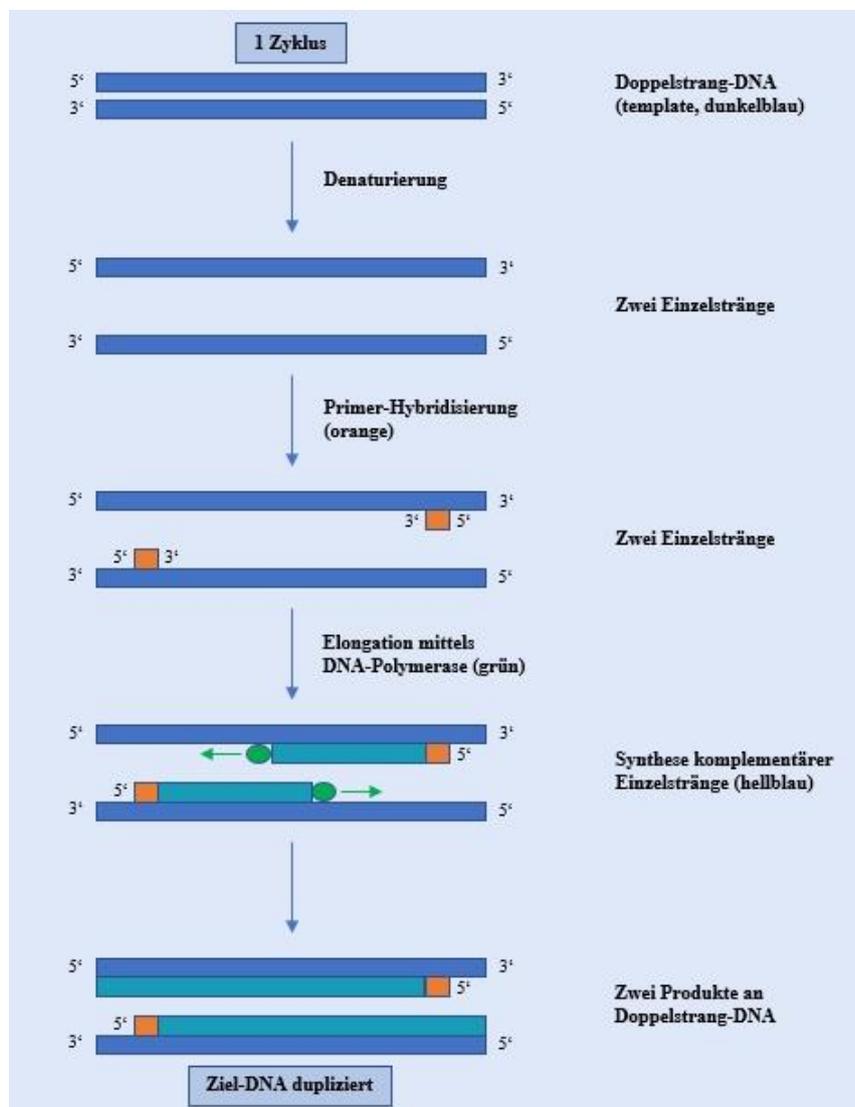


Abbildung 3: Prinzipieller, schematischer Ablauf eines PCR-Zyklus in drei Phasen, graphische Darstellung in Anlehnung an Trampuz<sup>77</sup> und Rassow<sup>78</sup>, 3' = 3'-OH Ende, 5' = 5'-OH Ende

Nachfolgend werden diese drei Phasen mehrfach wiederholt, sodass bei jedem Zyklus optimalerweise die betrachtete genetische Sequenz exponentiell multipliziert wird.<sup>75,78</sup> Durch die Applikation einer thermostabilen DNA-Polymerase muss man sie nur einmalig zu Beginn des Verfahrens hinzufügen.<sup>75,78</sup> Dies ermöglicht einen automatisierten Ablauf des Prozesses (Polymerase-Kettenreaktion).<sup>75</sup> Nach 20 bis 40 Zyklen liegt demnach eine vielfache Menge (=  $10^6$  bis  $10^{12}$ ) des ursprünglichen Erbguts vor, sodass eine PCR keine Limitationen bezüglich minimaler Quantität des Untersuchungsmaterials aufweist.<sup>78</sup> Aufgrund von diversen Faktoren (z. B. Aktivitätsverlust der Polymerase, Verbrauch an Primern und Nukleotiden) sind Zahlenwerte im Bereich von  $10^6$  realistisch umsetzbar.<sup>74,77</sup>

Zusammenfassend stellt die PCR eine Form der *in vitro* DNA-Replikation dar, welche sogar geringfügige Mengen von DNA erfassen kann.<sup>78</sup> Anschließend kann ein Nachweis der spezifischen DNA-Produkte mittels Verfahren wie Gelelektrophorese (anhand der Größe), Hybridisierung (mit internen Sonden) oder Sequenzierung (Analyse der Nukleotidsequenz) realisiert werden.<sup>74,76</sup> Via PCR wurden bereits Erregernachweise bei den Krankheitsbildern Meningitis, Endokarditis, periprothetische Infektion und Pseudarthrose erzielt.<sup>79-84</sup> Detaillierte Informationen zu dem verwendeten Multiplex-PCR-Verfahren, inklusive der Erörterung der Geräte, der Prozedur und des Erregerpanels, werden im Methodik-Teil ausführlich beschrieben.

## 1.5 Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit

Bezüglich der Infektionsdiagnostik kritisiert die aktuelle Literatur den kulturellen Goldstandard als nicht zufriedenstellend.<sup>27</sup> So wurden bei periprothetischen Gelenkinfektionen (*periprosthetic joint infection*, kurz: PJI) kulturelle Nachweisverfahren mit falsch-negativen Resultaten in 10 % bis 30 % der Fälle konstatiert.<sup>85</sup> Weiterhin ist anzunehmen, dass die Rate an Infektpseudarthrosen deutlich unterschätzt wird.<sup>27</sup> Folglich analysiert die Forschung derzeit neuere, erfolgsversprechende Verfahren wie die Sonikation und PCR.<sup>27</sup> Das Ziel dieser Promotionsarbeit ist die infektiologische Untersuchung von Pseudarthrose-Gewebeproben mittels einer speziellen PCR-Variante (Multiplex-PCR). Die Gegenüberstellung dieser Resultate zu mikrobiologischen und histologischen Befunden soll eruieren, welcher Stellenwert molekularen Methoden wie der PCR in der Zukunft beigemessen werden könnte. Folglich ist die primäre Fragestellung, inwiefern sich die PCR-Analyse von periimplantären Gewebeproben inferior, äquivalent oder superior zu den konventionellen Diagnostikmethoden darstellt und wie ausgeprägt der Anteil an Infektpseudarthrosen wirklich ist. Sekundär wird exploriert, inwiefern die Applikation der Sonikation bei Osteosynthesen ein valides Diagnostikumittel zur Pathogendetektion darstellt.

## 2 Methodik

### 2.1 Studiendesign

#### 2.1.1 Studiencharakter, Studienpopulation sowie Ein- und Ausschlusskriterien

Der Inhalt dieser Dissertation basiert auf einer klinischen Studie mit insgesamt 38 Patienten nach osteosynthetischer Versorgung, die an der Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt wurde. Zur Realisierung des Ziels dieser klinischen Laborarbeit entnahmen die Operateure bei allen Patienten im Zeitraum von Mai 2014 bis April 2016 zusätzlich zum Implantat einen Implantatabstrich und mehrere periimplantäre Gewebebiopsien, wobei die Intention, in Anlehnung an die aktuelle Literatur, optimalerweise eine Gewinnung von mindestens drei Proben darstellte.<sup>27</sup> Diese konnten anschließend, ebenso wie die Implantate selbst, mittels unterschiedlicher diagnostischer Methoden auf die Existenz von Infektionen untersucht werden (siehe 2.2 und 2.3).

Zusammenfassend inkludierten wir in diese Studie Patienten, welche ein Mindestalter von 18 Jahren aufwiesen und aufgrund einer medizinischen Indikation (z. B. Vorliegen einer Pseudarthrose) oder des expliziten Patientenwunsches eine Implantatentfernung absolvierten. Die Explantation erfolgte hierbei aus verschiedensten Regionen der unteren sowie oberen Extremitäten. Auch bezüglich des Osteosynthesenmaterials gab es keine Einschränkungen.

Als Ausschlusskriterien sind ein Alter von weniger als 18 Jahren, das Fehlen von histologischen und mikrobiologischen Befunden sowie der Mangel an Probenmaterial für eine PCR-Analyse zu nennen. Eine fehlende knöcherne Konsolidierung zwischen vier und sechs Monaten werteten wir als verzögerte Frakturheilung (keine Pseudarthrose).

Alle teilnehmenden Patienten wurden bezüglich des operativen Eingriffs aufgeklärt und bescheinigten ihr Einverständnis zur Partizipation an der Studie. Eine Zustimmung der Ethikkommission liegt vor (Antragsnummer: EA1/050/14).

Der Inhalt dieser Arbeit entspricht den Standards zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis der Charité.<sup>86</sup>

#### 2.1.2 Gruppeneinteilung

Anhand der präoperativen klinischen und radiologischen Befunde erfolgte die Klassifizierung in drei unterschiedliche Gruppen (siehe Abbildung 4).

1. Patienten, welche klinische Hinweise auf das Vorliegen einer Pseudarthrose zeigten (Implantatversagen, posttraumatisch-persistierende Belastungsinsuffizienz inklusive Schmerzen oder Instabilität) und im radiologischen Befund eine unzureichende ossäre Konsolidierung über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten aufwiesen, wurden in die „Pseudarthrosen-Gruppe“ eingeordnet (Subpopulation n = 17).
2. Präsentierten sich die Patienten präoperativ bereits mit klinischen Infektzeichen (Rötung, Schwellung, Überwärmung oder Fistel in der Nähe der Fraktur bzw. der Osteosynthese), erfolgte unter Inklusion laborchemischer Parameter (CrP) eine Zuordnung in die „Infekt-Gruppe“ mit dem Verdacht einer implantatassoziierten Infektion (Subpopulation n = 6).
3. Eine weitere Teilmenge stellten die geplanten, elektiven Implantatentfernungen dar, welche eine radiologische Frakturkonsolidierung sowie keine klinischen Infektzeichen offerierten. Diese Patienten mit mechanischen Irritationen als Explantationsindikation dienten als „Kontroll-Gruppe“ (n = 15).

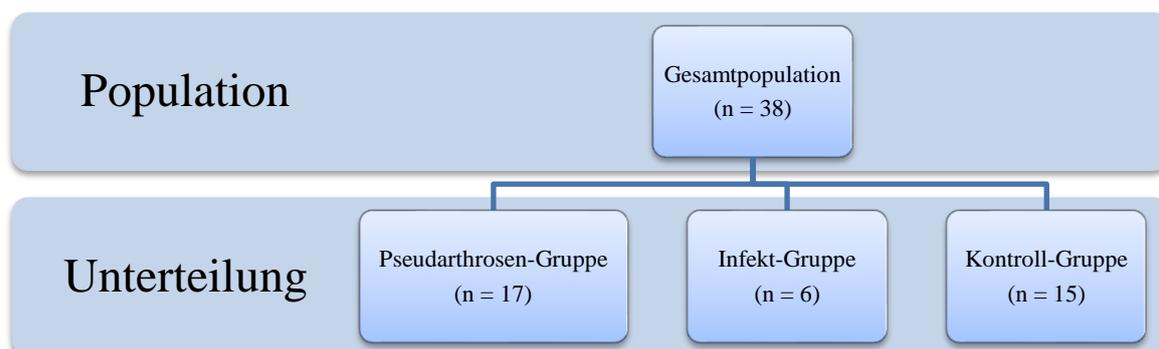


Abbildung 4: Übersicht der Gruppeneinteilung, n = Anzahl der Patienten innerhalb einer Gruppe

Zur Überprüfung der Gruppenvergleichbarkeit, wurde eine Gegenüberstellung der Alters- (arithmetisches Mittel, Minimum, Maximum) und Geschlechterverteilung (weiblich, männlich) sowie der Lokalisationen (nach AO Klassifikation) als komparable Parameter durchgeführt (siehe Tabelle 7).

### 2.1.3 Infektionsdefinition

Basierend auf den diagnostischen Untersuchungen erfolgte eine postoperative Unterscheidung bez. des Infektionsstatus. In Anlehnung an die beschriebenen Charakteristika einer IAI (Tabelle 4), wurden folgende Kriterien als positiv für die Präsenz einer manifesten Entzündung gewertet:

1. identischer Erregernachweis in mindestens zwei mikrobiologischen Proben eines Patienten (Kulturen periimplantärer Gewebeproben, Implantatabstriche oder des Sonikats),
2. positiver histopathologischer Infektionsnachweis.

Der anhand dieser Kriterien determinierte Infektionsstatus diente nachfolgend bei jeder Gruppe als Grundlage zur Bestimmung der Korrektheit und Aussagekraft der jeweiligen diagnostischen Befunde beziehungsweise Methoden. Für jede Gruppe sowie die Gesamtpopulation wurde eine individuelle Auswertung angefertigt (siehe Ergebnisse).

## 2. 2 Laborarbeit mit Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion

### 2.2.1 Allgemeine Laborbedingungen, Probenlagerung und Probenvorbereitung

Die PCR-Analysen wurden im Berlin-Brandenburg Centrum für Regenerative Therapien (BCRT) durchgeführt. Zur Gewährleistung einer sachgerechten und sterilen Laborarbeit erfolgten die Probenvorbereitung sowie Experimente in Laborräumen mit der Biologischen Schutzstufe 2 (BSL 2). Die Gewebeproben lagerten dabei bis zur Untersuchung im Kühlfach bei -80 °C. Erst unmittelbar vor der definitiven Messung wurde das entsprechende Probengefäß aus dem Kühlschrank entnommen und in einer Transportbox zur Sicherheitswerkbank befördert.

Benötigte Utensilien für die Realisierung einer Messung stellten sich wie folgt dar:

- Probengefäß inklusive Gewebeprobe,
- Transportbox (Well Tube Box – Firma Heathrow Scientific),
- Händedesinfektionsmittel sowie Kohrsolin 3 % zur Desinfektion der Arbeitsfläche und Arbeitsmaterialien,
- Schutzkleidung: Medizinische Handschuhe (Braun Vasco® Nitril long sterile), OP Mantel (Medline OPS™ UltraGard OP-Mantel), Überschuhe (Dahlhausen),
- biologische Sicherheitswerkbank (Thermo Scientific™ Safety Cabinet Class II) inklusive Abwurfbehälter, steriler Petrischale und steriler Einmal-Impföse (VWR),
- Pipette sowie sterile Pipettenspitzen (Eppendorf),
- steriles Einmal-Sicherheitsskalpell (Aesculap®-Braun).

Weiterhin wurden von der Firma Curetis (Curetis GmbH, Holzgerlingen, Deutschland) nachstehende Geräte inklusive Zubehör verwendet:<sup>87,88</sup>

- Unyvero Cockpit, Analyzer und Lysator (Geräte für PCR-Analyse, siehe Abbildung 5a),
- Unyvero ITI Cartridge (Inhalt: Reagenzien für DNA-Isolierung und -Aufreinigung, Primer, Hybridisierungs- und Waschpuffer, Oligonukleotide für Detektion, siehe Abb. 5b),
- Unyvero Sample Tube (finales Analysegefäß der Gewebeprobe, enthält Glaskügelchen und Puffer zur Probenverflüssigung sowie bakteriellen Lyse),
- Unyvero Sample Tube Cap (Verschlussfunktion, enthält Proteinase K und Kontrollgen),
- Unyvero Sample Tube Holder (Halterungsfunktion),
- Unyvero Sample Pre-Treatment Tool (Hilfsmittel zur Probenvorbereitung),
- Unyvero Master Mix Tube (enthält Reagenzien für DNA-Amplifikation, z. B. thermostabile DNA-Polymerase, PCR-Puffer und Nukleotide).



Abbildung 5: Graphische Übersicht zu Unyvero Geräten (5a) und Darstellung der Unyvero ITI Kartusche (5b) (mit freundlicher Genehmigung durch Mitarbeiter von Curetis, Abbildungen: © Curetis GmbH)

5a) Unyvero Geräte von links nach rechts: Lysator, Cockpit, Analyzer (mit 2 Einschüben)

5b) Unyvero Kartusche mit interner Separation: Integrierte Container für DNA-Isolation und -Aufreinigung (DNA purification), acht unabhängige Kammern für die Multiplex-Endpunkt-PCR (PCR-set-up) sowie finale Amplikonnachweis über Hybridisierung auf Membranarrays (Multiplex PCR with array detection)<sup>87</sup>

Die Aufbewahrung von Unyvero ITI (Implant & Tissue Infection) Cartridge, Unyvero Sample Tube, Unyvero Sample Tube Cap sowie Unyvero Sample Pre-Treatment Tool fand,

entsprechend den Hinweisen der Firma Curetis, bis zur Benutzung bei ca. +20 °C statt.<sup>87</sup> Das Unyvero Master Mix Tube hingegen erforderte eine Lagerung bei -20 °C.<sup>87</sup> Der Auftauprozess wurde wie empfohlen 30 Minuten vor der Verwendung bei Raumtemperatur realisiert.<sup>87</sup>

Nach der Einkleidung mit den Sicherheitsutensilien (Handschuhe, OP-Mantel, Überschuhe) inklusive vorheriger hygienischer Händedesinfektion erfolgte entsprechend den Anweisungen des Benutzerhandbuches von Curetis innerhalb der Sicherheitswerkbank ein Proben-transfer vom initialen Probengefäß in das Unyvero Sample Tube (finale Probengefäß für die PCR-Analyse).<sup>87</sup> Da die periimplantäre Gewebeprobe für die Analyse lediglich eine maximale Größe von 3 mm x 3 mm x 3 mm (27 mm<sup>3</sup>) aufweisen darf, war als Zwischenschritt zunächst eine Präparation notwendig.<sup>87</sup> Mittels eines Einmal-Sicherheitsskalpells wurde die Gewebeprobe auf einer neuen, sterilen Petrischale in mehrere Einzelstücke zerkleinert. Lagen von einem Patienten mehrere Gewebebiopsien für die PCR-Analyse aus dem identischen Körperareal vor, wurde das Prozedere analog für diese auf der gleichen Petrischale realisiert. Final existierten somit multiple Gewebeteilstücke eines Patienten auf einer Petrischale. Um eine möglichst repräsentative Gewebeprobe für die PCR-Analyse zu erhalten, erfolgte eine Zusammenstellung verschiedener Teilstücke zu einem resultierenden Endstück unter Beachtung der maximal erlaubten Größe.

Dafür wurden die selektierten Segmente mithilfe eines sterilen Einmal-Sicherheitsskalpells und einer sterilen Einmal-Impföse akkumuliert. Nach dem Entfernen des Unyvero Sample Tube Transport Cap (Transportkappe) konnte die finale Gewebeprobe mittels des Skalpells und der Einmal-Impföse direkt in das Unyvero Sample Tube transferiert werden (siehe Abbildung 6, Schritt 1).<sup>87</sup> Abschließend war, entsprechend der Benutzeranleitung von Curetis, eine zusätzliche Zuführung von 150 µl Puffer aus dem Unyvero Sample Pre-Treatment Tool über eine Pipette mit steriler Pipettenspitze notwendig (Abbildung 6, Schritt 2).<sup>87</sup> Das Aufsetzen eines neuen Unyvero Sample Tube Cap vollendete die Präparation.<sup>87</sup>

Als Hilfsmittel bei diesen Vorbereitungsmaßnahmen diente ein Unyvero Sample Tube Holder, welcher mit vier Unyvero Sample Tube Einschublöchern sowie dahinter lokalisierten, unterschiedlich großen Öffnungen sowohl eine Halterungsmöglichkeit für primäre Probengefäße als auch das Unyvero Sample Tube offerierte.<sup>87</sup> Zur Gewährleistung einer kontaminationsfreien Arbeit wurden neben der Desinfektion der Arbeitsmaterialien und -flächen (Kohrsolin 3 %) für jede Präparation von Gewebeproben eines Patienten neue, sterile Utensilien (z. B. Handschuhe, Petrischale, Skalpell, Einmal-Impföse, Pipettenspitzen) verwendet. Für die Entsorgung spitzer Materialien stand ein Abwurfbehälter bereit.

### 2.2.2 Probenanalyse, Ergebnisdarstellung und Probennachbereitung

Im Anschluss an die Präparation folgte die Analyse mittels Unyvero Cockpit, Analyzer und Lysator (siehe Abb. 5a). Über das Cockpit ließ sich für jede Probe manuell die Anwendung („ITI“), die Indikation („Orthopädie“), der Probenotyp („Gewebe“) sowie eine Zahlen- und Buchstabenkombination zur Patientenidentifizierung einstellen.<sup>87</sup> Der Barcode-Scan des Unyvero Sample Tube am Cockpit gab anschließend eine Öffnung des Lysators frei, in welcher sie nach korrekter Platzierung eingeschoben bzw. hineingedrückt wurde (siehe Abb. 6, Schritt 3).<sup>87</sup> Nach manuellem Verschluss des Lysator-Deckels startete die Lyse der Gewebeprobe für circa 30 Minuten.<sup>87</sup> Der aktuelle Stand und die verbleibende Restzeit waren stets über das Display des Cockpits einsehbar. In der Zwischenzeit wurde das bei -20 °C gelagerte Unyvero Master Mix Tube aus dem Kühlfach entnommen, da die empfohlene Zeit zum Auftauen mindestens 30 Minuten beträgt.<sup>87</sup>

An die abgeschlossene Lyse schloss sich das Herausnehmen des Unyvero Sample Tube mit nachfolgendem finalen Zusammenbau der Unyvero ITI Cartridge (deutsch: Kartusche) an.<sup>87</sup> Letztere besaß zwei Öffnungen – eine für das Unyvero Sample Tube sowie eine weitere für das Unyvero Master Mix Tube (siehe Abbildung 5b).<sup>87</sup> Diese wurden in den jeweiligen Einschub hineingedrückt, sodass die Kartusche nun alle für die Messung essenziellen Komponenten enthielt.<sup>87</sup> Da sie ab diesem Moment ein geschlossenes System darstellte, existierte nachfolgend kein nennenswertes Kontaminationsrisiko.<sup>87</sup> Abschließend wurde die Kartusche am Cockpit gescannt und danach in das angezeigte Einschubloch im Analyzer eingeführt (siehe Abbildung 6, Schritt 4).<sup>87</sup> Innerhalb der Kartusche fand dann der eigentliche Prozess der biochemischen Multiplex-PCR statt, welcher circa vier Stunden andauerte.<sup>87</sup> Der Analyzer selbst beinhaltete keine Reagenzien oder Abfallstoffe.<sup>88</sup> Er diente zur Prozessierung der Messung in der Kartusche.<sup>88</sup>

Nach einer initialen DNA-Aufreinigung folgte die Multiplex-PCR in acht unabhängigen Kammern (siehe Abb. 5b).<sup>87</sup> Jede dieser Kammern enthielt spezifische genetische Marker für die Detektion von Mikroorganismen und Antibiotikaresistenzen.<sup>87</sup> Die Besonderheit der Multiplex-PCR ist darin anzusehen, dass während einer Messung durch das Vorliegen multipler spezifischer Primer und Sonden mehrere relevante DNA-Abschnitte parallel vervielfältigt (spezifische Amplifikation) sowie anschließend nachgewiesen werden können (spezifische Hybridisierung).<sup>77,89,90</sup> Dies ermöglichte eine rapide, simultane Analyse von Pathogenen und Resistenzgenen der Gewebeprobe.<sup>89</sup> Die amplifizierten DNA-Areale inklusive ihrer fluoreszenz-markierten Primer hybridisierten anschließend mit spezifischen Gensonden, welche sich an den porösen Membran-Arrays befanden (siehe Abb. 6, Teilschritte von Schritt 4).<sup>87,90,91</sup>

Marcus Nitzsche: Infektionsdiagnostik bei Pseudarthrose – Eine Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Methodik

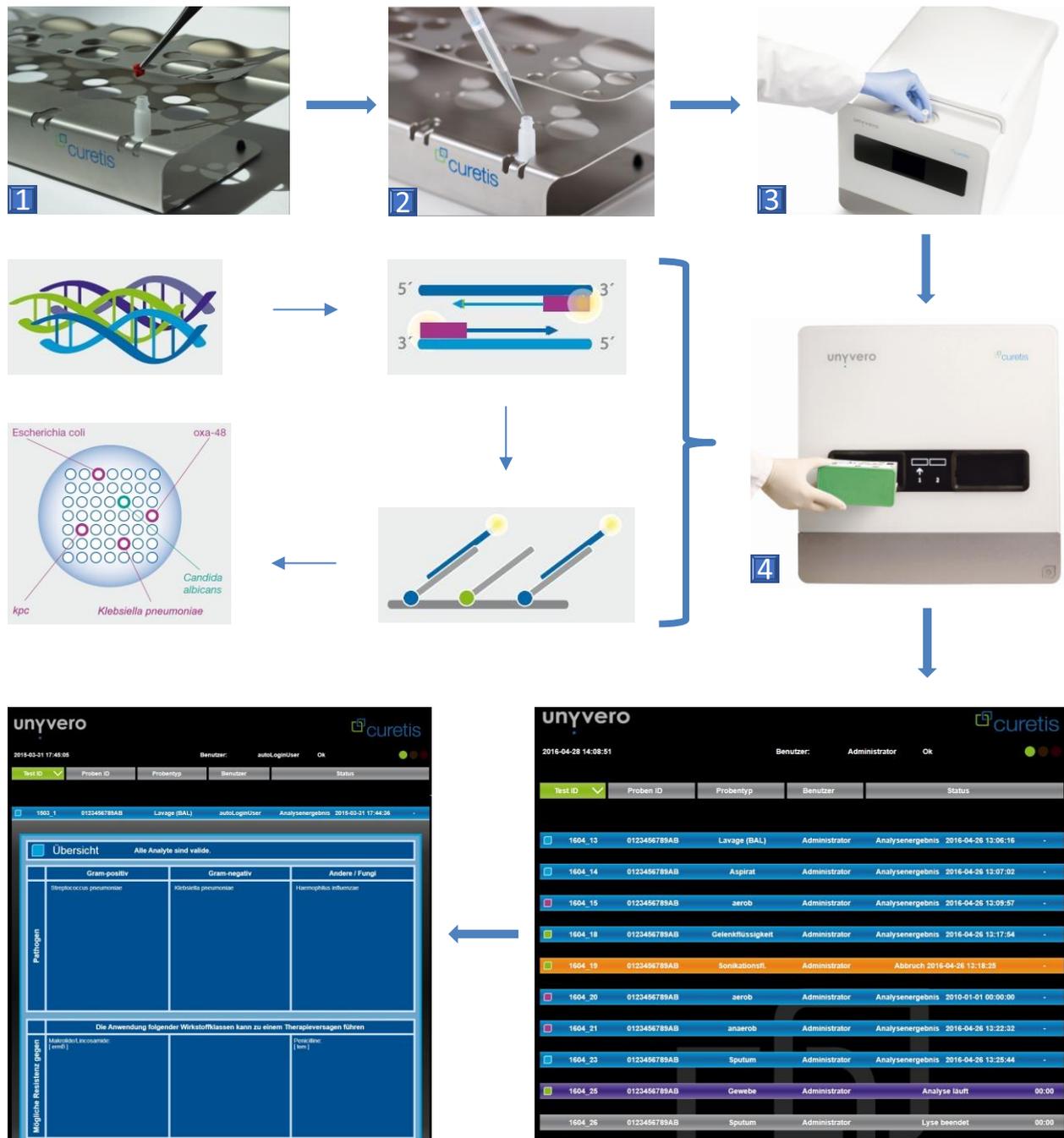


Abbildung 6: Grundlegender Ablauf der Laborarbeit entsprechend des Laborhandbuchs von Curetis<sup>87</sup> (mit freundlicher Genehmigung durch Mitarbeiter von Curetis, einzelne Abbildungen: © Curetis GmbH)

Schritt 1: Transfer der zuvor präparierten Gewebeprobe in das Unyvero Sample Tube

Schritt 2: Addition des Unyvero Sample Pre-Treatment Tool mittels Pipette

Schritt 3: Einsetzen des Unyvero Sample Tube in den Lysator-Einschub

Schritt 4: Nach endgültigem Zusammenbau der Kartusche folgt die Untersuchung im Analyzer

(Teilschritte: spezifische Amplifikation und Hybridisierung mit Identifikation von Pathogenen und Resistenzen)

Präsentation des Progresses (unten rechts) sowie der Detektionen (unten links: obere Hälfte für Pathogene, untere Hälfte für Antibiotikaresistenzen) jeder analysierten Probe via Cockpit, Möglichkeit der individuellen Inspektion

Diese Vorgänge wurden automatisch in der Kartusche prozessiert, sodass final anhand der

Array-Hybridisierung und der maschinell gesteuerten, optischen Analyse des Fluoreszenz-Signals ein qualitativer Pathogennachweis resultierte.<sup>87,90-92</sup> Der Fortschritt sowie die Vollendung der Analyse wurden, analog zu den Vorgängen bei der Lyse, auf den Displays der Geräte angezeigt.<sup>87</sup> Nach der Fertigstellung einer Messung war die Entnahme und Entsorgung der Kartusche erforderlich.<sup>87</sup> Abschließend ließ sich über das Cockpit für jede analysierte Gewebeprobe eine Auflistung aller detektierten Mikroorganismen inklusive der Antibiotikaresistenzen anzeigen (siehe Abbildung 6 unten links).<sup>87</sup> Zur Bestimmung dieser Resistenzen dienten verschiedene Resistenzmarker.<sup>87</sup> Dies sind Gene, welche unter anderem über Plasmide zwischen den Mikroorganismen transferiert werden können und deren Gegenwart mit Resistenzen gegen spezielle Antibiotikaklassen korreliert (zum Beispiel *ermA* für Makrolide, *mecA* für Oxacillin, *vanA* für Glykopeptide, *kpc* und *oxa-48* für Carbapeneme sowie *aacA4* für Aminoglykoside).<sup>87</sup> Die Darstellung der Pathogene auf dem Übersichtsbildschirm erfolgte unterteilt in „Gram-positive“ und „Gram-negative“ Bakterien sowie „Andere/Fungi“.<sup>87</sup>

Weiterhin ließ sich eine detailliertere Gruppierung in „Gram-positive Bakterien“, „Non-fermenting bacteria“, „Anaerobier“, „*Enterobacteriaceae*“, „*Corynebacteriaceae*“ sowie „*Fungi*“ abrufen, bei der zusätzlich auch quantitative Angaben anhand der gemessenen Signalintensitäten offeriert wurden (Nachweisgrenze für die meisten Erreger:  $10^4$  bis  $10^5$  Pathogene pro ml).<sup>87</sup> Eine Übersicht aller mittels einer Unyvero ITI Cartridge detektierbaren Mikroorganismen ist in der Tabelle 5 enumeriert.<sup>87</sup> Hervorzuheben ist hierbei, dass nicht nur eine Vielzahl an Erregern detektiert werden konnte, sondern auch typische Biofilm-Erreger (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* sowie *Candida spp.*) im Erregerpanel enthalten waren.<sup>90,91</sup>

Zur Gewährleistung valider Ergebnisse existierten Mechanismen, welche die Korrektheit jeder Messung prüften. Lag kein suffizienter Nachweis des Kontrollgens (keine signifikante Homologie zu anerkannten Sequenzen) vor, welches in jeder der acht Kammer präsent war, erfolgte automatisch eine Kennzeichnung für das Vorliegen invalider Analyte beziehungsweise Resultate der betroffenen Kammer.<sup>87</sup> Auch bei der Arraydetektion gab es Kontrollvorgänge, welche bei Irregularitäten ebenfalls die Ergebnisse als „invalide“ charakterisierte.<sup>87</sup> Final konnten die Resultate der Messungen als PDF-Dateien (Portable Document Format) exportiert werden.<sup>87</sup> Der gesamte Prozess von der Präparation bis zur Vollendung der Messung beanspruchte circa fünf Stunden. Da im Analyzer selbst keine Rückstände hinterblieben, war abschließend lediglich eine Entsorgung der Kartusche mit den darin enthaltenen Abfallstoffen notwendig.<sup>92</sup>

Tabelle 5: Übersicht detektierbarer Mikroorganismen mittels Unyvero ITI Kartusche, in Anlehnung an Curetis<sup>87</sup>

Gruppe	Pathogen	Gruppe	Pathogen
<b>Gram-positive Bakterien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Coagulase negative staphylococci</i><sup>1</sup></li> <li>• <i>Streptococcus spp.</i><sup>2</sup></li> <li>• <i>Streptococcus agalactiae</i></li> <li>• <i>Streptococcus pneumoniae</i></li> <li>• <i>Streptococcus pyogenes / dysgalactiae</i></li> <li>• <i>Granulicatella adiacens</i></li> <li>• <i>Abiotrophia defectiva</i></li> <li>• <i>Enterococcus spp.</i><sup>3</sup></li> <li>• <i>Enterococcus faecalis</i></li> </ul>	<b>Fungi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Candida spp.</i><sup>7</sup></li> <li>• <i>Candida albicans</i></li> <li>• <i>Candida glabrata</i></li> <li>• <i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>C. krusei</i>)</li> <li>• <i>Candida tropicalis</i></li> </ul>
<b>Corynebacteriaceae</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Corynebacterium spp.</i><sup>4</sup></li> </ul>	<b>Nonfermenter</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acinetobacter baumannii complex</i><sup>8</sup></li> <li>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> </ul>
<b>Enterobacteriaceae</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Citrobacter freundii / koseri</i></li> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Enterobacter cloacae complex</i><sup>5</sup></li> <li>• <i>Enterobacter aerogenes</i></li> <li>• <i>Proteus spp.</i><sup>6</sup></li> <li>• <i>Klebsiella pneumoniae</i></li> <li>• <i>Klebsiella oxytoca</i></li> <li>• <i>Klebsiella variicola</i></li> </ul>	<b>Anaerobier</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Propionibacterium acnes</i></li> <li>• <i>Finnegoldia magna</i></li> <li>• <i>Bacteroides fragilis group</i><sup>9</sup></li> </ul>

**Universal Bacteria** (Universalprimerpaar zur Detektion von Bakterien)

**Legende:**

<sup>1</sup> inkl. *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*

<sup>2</sup> inkl. *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. sanguinis*, *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*, *S. dysgalactiae subsp. equisimilis*, *S. gordonii*

<sup>3</sup> inkl. *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. raffinosus*

<sup>4</sup> inkl. *C. jeikeium*, *C. belfanti*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. aurimucosum*

<sup>5</sup> inkl. *E. cloacae*, *E. amnigenus*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*

<sup>6</sup> inkl. *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. hauseri*

<sup>7</sup> inkl. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. viswanathii*, *C. metapsilosis*, *C. labiduridarum*, *C. theae* sowie *Lodderomyces elongisporus*, *Schwanniomyces etchellsii*, *Millerozyma farinosa*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Yamadazyma triangularis*, *Phaeosphaeria nodorum* (Universalprimerpaar für Fungi)

<sup>8</sup> inkl. *A. baumannii*, *A. oleivorans*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii*

<sup>9</sup> inkl. *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. uniformis*

## 2.3 Übersicht zur Durchführung der Vergleichsuntersuchungen

Um die Ergebnisse der PCR-Analysen objektiv evaluieren zu können, wurden zudem konventionelle Untersuchungsmethoden (mikrobiologische Analysen von periimplantärem Gewebe und Implantatabstrich sowie histopathologische Befundung) durchgeführt. In diesem Zusammenhang erfolgte auch eine zusätzliche kulturelle Anzucht und Begutachtung der Sonikationsflüssigkeit (Sonikat) der explantierten Osteosynthese. Die Vorgehensweise bei diesen Verfahren war analog zu bereits beschriebenen Studien an der Charité in der Vergangenheit.<sup>93,94</sup>

Für die mikrobiologische Untersuchung entnahmen die Operateure zwei bis fünf periimplantäre Biopsien pro Patient, wobei makroskopisch infektionssuspekte Areale präferiert wurden. Auch ein Implantatabstrich wurde durchgeführt. Daraufhin folgte der sterile Probentransport zum Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Dort beurteilten Experten mithilfe von standardisierten Agarplatten (z. B. Kochblut-Agar, Wilkins-Chalgren Agar, MacConkey-Agar) eine potenzielle Präsenz von Mikroorganismen. Um auch langsam wachsende Erreger zu detektieren, umfasste der Zeitraum der Anzucht 14 Tage.<sup>93,94</sup>

Die explantierten Osteosynthesen wurden vorübergehend in sterilen, erst unmittelbar zuvor eröffneten Polypropylen-Behältern (mit Ringer-Lösung gefüllt) bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend waren diese bis zur Untersuchung (maximal 6 Stunden nach der Entfernung) luftdicht verschlossen. Die Sonikation vollzog ein Ultraschallgerät von BactoSonic® der Version 14.2 (BANDELIN electronic GmbH, Berlin, Deutschland).<sup>95</sup> Das applizierte Kontaktflüssigkeits-Konzentrat (TICKOPUR TR 3, 250 ml, BANDELIN electronic GmbH, Berlin, Deutschland) diente dabei zur Optimierung der Leitfähigkeit von Ultraschallwellen.<sup>94</sup> Nach initialer Durchmischung für 30 Sekunden mittels einer Vortex-Apparatur erfolgte die Sonikation (40 kHz) für drei Minuten bei einer Intensität von 100 %.<sup>95</sup> Ziel dieses Verfahrens war die Ablösung der Mikroorganismen von Implantatoberflächen, sodass die resultierende Flüssigkeit des Ultraschallbads (Sonikat) mikrobiologisch analysiert werden konnte.<sup>95</sup> Dazu wurden circa 24 ml des Sonikats mithilfe einer sterilen Spritze aspiriert und anschließend gleichmäßig in aerobe und anaerobe BD BACTEC™ PLUS Blutkulturflaschen (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey) sowie in eine sterile Spritze aufgeteilt. Additiv zur Inkubation in den Blutkulturflaschen fand, analog zu den mikrobiologischen Analysen der Gewebeproben und Implantatabstriche, eine kulturelle Anzucht auf standardisierten Agarplatten im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité - Universitätsmedizin Berlin statt. Zur Detektion und Prävention von Kontaminationen wurden in regelmäßigen Abständen negative Kontrollproben

(leere Polypropylen-Behälter) eingeschendet.<sup>93,94</sup>

Die Grundlage der histopathologischen Analyse stellten die intraoperativ gewonnenen, periimplantären Gewebeproben dar, welche bei Prothesen auch als periprothetische Membran deklariert werden. Letztere ist definiert als zwischen Prothese und Knochen lokalisierter Bindegewebesaum.<sup>96</sup> Sie entsteht unter anderem durch das Vorliegen von Abriebpartikeln des Implantats (aseptisch) oder bakterielle Kontagion (septisch).<sup>97</sup> Die Gewebebiopsien wurden in Formalin (4 %) fixiert, nachfolgend in Paraffin eingebettet und in ca. 5 µm dicke Anschnitte segmentiert. Nach der Einfärbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) erfolgte die lichtmikroskopische Begutachtung. Neben einer allgemeinen, infektionsfokussierten Beurteilung wurde hinsichtlich der periprothetischen Membran die Klassifikation nach Morawietz verwendet, welche vier grundlegende Typen unterscheidet (siehe Tabelle 6).<sup>98</sup> Dabei erhärten sowohl der Typ II (infektiöser Typ) als auch der Typ III (Mischtyp: Abriebinduziert/Infektiös) den Verdacht einer Infektion.<sup>58,99</sup>

Tabelle 6: Histopathologische Konsensus-Klassifikation der periprothetischen Membran nach Morawietz<sup>98</sup>

Histopathologischer Typ	Charakteristika
Typ I: Abriebinduzierter Typ	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nachweis von Fremdkörperpartikeln (Prothese)</li><li>• Infiltration von Makrophagen und multinukleären Riesenzellen (Anteil &gt; 20 % der Membran), enthalten die Fremdkörperpartikel</li></ul>
Typ II: Infektiöser Typ	<ul style="list-style-type: none"><li>• Granulationsgewebe mit neutrophilen Granulozyten und Plasmazellen</li></ul>
Typ III: Mischtyp	<ul style="list-style-type: none"><li>• Merkmale von Typ I und II liegen simultan vor (Kombination I und II)</li></ul>
Typ IV: Indifferenztyp	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kriterien für Typ I und II nicht erfüllt</li><li>• Vorliegen von Bindegewebe (zellarm, kollagenfaserreich)</li></ul>

## 2. 4 Statistische Auswertung

Zur Datenkollektion wurde das Programm Microsoft® Excel® 2016 (Microsoft Cooperation, Washington, USA) verwendet. Auch die statistischen Parameter wie Sensitivitäten, Spezifitäten, positiv prädiktive Werte (PPV) sowie negativ prädiktive Werte (NPV) für die einzelnen Gruppen und die Gesamtpopulation konnten damit ermittelt werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientenkollektiv

Diese Arbeit beinhaltet die Untersuchung von Proben, die von 38 Patienten gewonnen wurden. Den größten Anteil bildete die eigentliche Untersuchungsgruppe der Pseudarthrosen mit 17 Personen beziehungsweise 45 % (siehe Tabelle 7). Als Vergleichsgruppen dienten die Kontroll-Gruppe mit 15 Individuen (40 %) sowie die Infekt-Gruppe mit 6 Personen (16 %).

Tabelle 7: Übersicht der Patientencharakteristika unter Berücksichtigung verschiedener Studiengruppen

Klinische Parameter der Studienteilnehmer/innen	Studiengruppen			
	Gesamtpopulation	Pseudarthrosen	Infekt	Kontrolle
<b>Populationsgröße (%)</b>	38 (100,0)	17 (44,7)	6 (15,8)	15 (39,5)
<b>Alter (in Jahren)</b>				
Arithmetisches Mittel	49,8	42,6	74,8	47,8
Minimum / Maximum	24 / 100	24 / 72	53 / 100	24 / 71
<b>Geschlechtsverteilung (%)</b>				
Weiblich	18 (47,4)	6 (35,3)	3 (50,0)	9 (60,0)
Männlich	20 (52,6)	11 (64,7)	3 (50,0)	6 (40,0)
<b>Lokalisation nach AO (%)</b>				
11	6 (15,8)	2 (11,8)	1 (16,7)	3 (20,0)
21	3 (7,9)	1 (5,9)	0 (0)	2 (13,3)
22	1 (2,6)	1 (5,9)	0 (0)	0 (0)
23	2 (5,3)	0 (0)	0 (0)	2 (13,3)
32	3 (7,9)	3 (17,6)	0 (0)	0 (0)
33	4 (10,5)	3 (17,6)	1 (16,7)	0 (0)
41	2 (5,3)	1 (5,9)	1 (16,7)	0 (0)
42	5 (13,2)	1 (5,9)	1 (16,7)	3 (20,0)
43	8 (21,1)	2 (11,8)	2 (33,3)	4 (26,7)
152	4 (10,5)	3 (17,6)	0 (0)	1 (6,7)

**Legende:** Die Prozentangaben wurden gerundet, weshalb die Addition der Werte nicht stets exakt 100 % ergibt.

Die verschiedenen Parameter der unterschiedlichen Studiengruppen sind in der Tabelle 7 dargestellt. Das Durchschnittsalter der Gesamtpopulation betrug 49,8 Jahre [24 bis 100 Jahre]. Die einzelnen Subpopulationen wiesen dabei folgende Werte auf: Pseudarthrosen-Gruppe

42,6 Jahre, Infekt-Gruppe 74,8 Jahre sowie Kontroll-Gruppe 47,8 Jahre. Die älteste Patientin (100 Jahre) gehörte der Infekt-Gruppe an.

Insgesamt wurden 18 Frauen (47,4 %) und 20 Männer (52,6 %) inkludiert. Ähnliche Verteilungen ergaben sich in der Pseudarthrosen-Gruppe mit sechs Frauen sowie elf Männern (35,3 % bzw. 64,7 %) und in der Infekt-Gruppe mit drei Frauen und drei Männern (jeweils 50 %). Lediglich in der Kontroll-Gruppe war der Anteil der weiblichen Teilnehmerinnen größer (neun Frauen sowie sechs Männer mit 60,0 % bzw. 40,0 %).

Hinsichtlich des betroffenen Areals erwiesen sich in der Gesamtpopulation der distale Unterschenkel (AO 43 mit 21,1 %) und der proximale Humerus (AO 11 mit 15,8 %) als häufigste Lokalisationen (siehe Tabelle 7). In der Pseudarthrosen-Gruppe stellten die Clavicula, der Femurschaft und das distale Femur (AO 152, AO 32 und AO 33 mit jeweils 17,6 %) die mehrheitlich erfassten, einzelnen Knochenregionen dar.

### 3. 2 Übersicht der diagnostischen Untersuchungsbefunde

Die Proben aller 38 Patienten wurden mithilfe unterschiedlicher diagnostischer Methoden (Histopathologie und Kultur des periimplantären Gewebes, Kultur des Sonikats, Kultur des Implantatabstrichs sowie Multiplex-PCR von periimplantärem Gewebe) hinsichtlich des Vorliegens einer Infektion analysiert. Die Ergebnisse sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Für jeden Patienten lagen Befunde der kulturellen Anzucht des periimplantären Gewebes und des Sonikats vor. Mikrobiologische Analysen von Implantatabstrichen fehlten bei neun Patienten. Des Weiteren existierten bei fünf Patienten keine histopathologischen Befunde. Analysen mittels PCR wurden bei 25 Patienten durchgeführt, wobei alle 17 Individuen der Pseudarthrosen-Gruppe enthalten waren (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht der Resultate aller diagnostischen Untersuchungsmethoden (geordnet nach Gruppe, Erfüllung der Infektionskriterien, PCR-Resultat)

Nr.	Gruppe	Erfüllung der IK	Histopathologie (nach Morawietz)	Kultur (Sonikat)	Kultur (Implantatabstrich)	Kultur (Gewebe periimplantär)	Multiplex-PCR (Gewebe)
18	Pseudarthrose	Ja	-	Staph. epidermidis	Staph. epidermidis	Staph. epidermidis [2x]	Koagulase-negative Staphylokokken
20	Pseudarthrose	Ja	Typ IV	Staph. saccharolyticus	Anaerobe grampositive Kokken (o.n.A.)	Kein Erregernachweis	Propionibacterium acnes
35	Pseudarthrose	Ja	Typ IV	Staph. warneri	Kein Erregernachweis	Propionibacterium acnes [3x]	Propionibacterium acnes
1	Pseudarthrose	Ja	Typ I	Propionibacterium acnes	-	Micrococcus luteus [2x]	Kein Erregernachweis
3	Pseudarthrose	Ja	Typ IV	Staph. epidermidis	Staph. epidermidis	Staph. epidermidis [2x]	Kein Erregernachweis
13	Pseudarthrose	Ja	Typ III	Staph. aureus Staph. epidermidis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis
19	Pseudarthrose	Ja	Typ II	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Staph. aureus Strept. dysgalactiae	Kein Erregernachweis
32	Pseudarthrose	Ja	Typ IV	Staph. epidermidis	Staph. epidermidis Propionibacterium acnes	Propionibacterium acnes	Kein Erregernachweis
37	Pseudarthrose	Ja	Typ II	Staph. lugdunensis	Staph. lugdunensis	Staph. lugdunensis [2x]	Kein Erregernachweis

**Legende:** IK = Infektionskriterien, Staph. = Staphylococcus, Strept. = Streptococcus, o.n.A. = ohne nähere Angabe, Angaben in eckigen Klammern symbolisieren multiple Nachweise

Marcus Nitzsche: Infektionsdiagnostik bei Pseudarthrose – Eine Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 8: Übersicht der Resultate aller diagnostischen Untersuchungsmethoden (geordnet nach Gruppe, Erfüllung der Infektionskriterien, PCR-Resultat)

Nr.	Gruppe	Erfüllung der IK	Histopathologie (nach Morawietz)	Kultur (Sonikat)	Kultur (Implantatabstrich)	Kultur (Gewebe periimplantär)	Multiplex-PCR (Gewebe)
16	Pseudarthrose	Nein	Typ I	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Koagulase-negative Staphylokokken
2	Pseudarthrose	Nein	Typ IV	Staph. epidermidis Mikrokokken (o.n.A.)	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis
11	Pseudarthrose	Nein	-	Propionibacterium acnes	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis
21	Pseudarthrose	Nein	Typ I	Staph. hominis	-	Staph. epidermidis	Kein Erregernachweis
24	Pseudarthrose	Nein	Typ IV	Propionibacterium acnes	-	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis
28	Pseudarthrose	Nein	-	Staph. capitis	Propionibacterium acnes	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis
34	Pseudarthrose	Nein	Typ IV	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis
38	Pseudarthrose	Nein	Typ IV	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis

**Legende:** IK = Infektionskriterien, Staph. = Staphylococcus, Strept. = Streptococcus, o.n.A. = ohne nähere Angabe, Angaben in eckigen Klammern symbolisieren multiple Nachweise

Marcus Nitzsche: Infektionsdiagnostik bei Pseudarthrose – Eine Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 8: Übersicht der Resultate aller diagnostischen Untersuchungsmethoden (geordnet nach Gruppe, Erfüllung der Infektionskriterien, PCR-Resultat)

Nr.	Gruppe	Erfüllung der IK	Histopathologie (nach Morawietz)	Kultur (Sonikat)	Kultur (Implantatabstrich)	Kultur (Gewebe periimplantär)	Multiplex-PCR (Gewebe)
5	Infekt	Ja	Typ III	Staph. aureus [2x]	-	Staph. aureus [3x]	Staph. aureus
6	Infekt	Ja	Typ IV	Staph. hominis	Propionibacterium acnes	Propionibacterium acnes Streptococcus sanguinis	Propionibacterium acnes
4	Infekt	Ja	Typ II	Staph. aureus [2x]	Staph. aureus	Staph. aureus [3x]	Kein Erregernachweis
25	Infekt	Ja	Typ II	Staph. aureus [2x]	Staph. aureus	Staph. aureus [3x]	-
30	Infekt	Ja	Typ I	Propionibacterium acnes [2x]	-	Propionibacterium acnes [3x]	-
29	Infekt	Nein	Typ I	Staph. warneri Staph. cohnii	-	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis
8	Kontrolle	Ja	-	Propionibacterium acnes [2x] Micrococcus luteus	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Koagulase-negative Staphylokokken
10	Kontrolle	Ja	Typ IV	Staph. epidermidis [2x]	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	-
12	Kontrolle	Ja	Typ IV	Staph. epidermidis	Kein Erregernachweis	Staph. epidermidis	-
23	Kontrolle	Ja	Typ IV	Propionibacterium acnes	Propionibacterium acnes	Propionibacterium acnes [2x]	-
7	Kontrolle	Nein	Typ IV	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis
9	Kontrolle	Nein	Typ IV	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis

**Legende:** IK = Infektionskriterien, Staph. = Staphylococcus, Strept. = Streptococcus, o.n.A. = ohne nähere Angabe, Angaben in eckigen Klammern symbolisieren multiple Nachweise

Fortsetzung Tabelle 8: Übersicht der Resultate aller diagnostischen Untersuchungsmethoden (geordnet nach Gruppe, Erfüllung der Infektionskriterien, PCR-Resultat)

Nr.	Gruppe	Erfüllung der IK	Histopathologie (nach Morawietz)	Kultur (Sonikat)	Kultur (Implantatabstrich)	Kultur (Gewebe periimplantär)	Multiplex-PCR (Gewebe)
33	Kontrolle	Nein	-	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis
14	Kontrolle	Nein	Typ IV	Kein Erregernachweis	-	Klebsiella pneumoniae	-
15	Kontrolle	Nein	Typ I	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	Enterococcus faecalis Staph. capitis	-
17	Kontrolle	Nein	Typ I	Ralstonia pickettii (Verdacht auf Kontamination)	-	Propionibacterium acnes	-
22	Kontrolle	Nein	Typ IV	Staph. haemolyticus Staph. epidermidis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	-
26	Kontrolle	Nein	Typ IV	Propionibacterium acnes Staph. warneri	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	-
27	Kontrolle	Nein	Typ IV	Propionibacterium acnes	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	-
31	Kontrolle	Nein	Typ I	Staph. epidermidis	Kein Erregernachweis	Kein Erregernachweis	-
36	Kontrolle	Nein	Typ IV	Staph. epidermidis	-	Kein Erregernachweis	-

**Legende:** IK = Infektionskriterien, Staph. = Staphylococcus, Strept. = Streptococcus, o.n.A. = ohne nähere Angabe, Angaben in eckigen Klammern symbolisieren multiple Nachweise

Die histopathologischen Befunde generierten 6 positive Ergebnisse (Typ II oder Typ III), von denen 3 in der Pseudarthrosen-Gruppe vorkamen. Am häufigsten trat der histologische Typ IV (n = 19) auf, welcher auf große Anteile in der Kontroll-Gruppe (n = 10) und Pseudarthrosen-Gruppe (n = 8) zurückzuführen war. Mikrobiologische Kulturen des Sonikats, des Implantatabstrichs und des periimplantären Gewebes führten zu 28, 10 bzw. 18 positiven Resultaten (davon 13, 6 bzw. 8 in der Pseudarthrosen-Gruppe). Der Nachweis des Bakteriums *Ralstonia pickettii* durch die Sonikation ist laut mikrobiologischem Befund hochgradig verdächtig bezüglich einer Kontamination und wurde folglich als negatives Ergebnis gewertet. Die Analyse mittels Multiplex-PCR ergab 7 Pathogen-positive Analysen – 4 davon entstammen der Pseudarthrosen-Gruppe (siehe Tabelle 8). In 3 Fällen konnten sowohl die Kulturen von Implantatabstrich / periimplantärem Gewebe als auch die Multiplex-PCR und die Kulturen des Sonikats parallel positive Ergebnisse in der Pseudarthrosen-Gruppe erzielen (siehe Abbildung 7). Am häufigsten traten simultan pathologische Befunde in den verschiedenen mikrobiologischen Kulturen auf (n = 6). Bei 4 Patienten lag ausschließlich ein positives Resultat der Sonikationskultur vor. In jeweils einem Fall waren nur die Multiplex-PCR oder die Kultur des Implantatabstrichs bzw. des periimplantären Gewebes pathologisch.

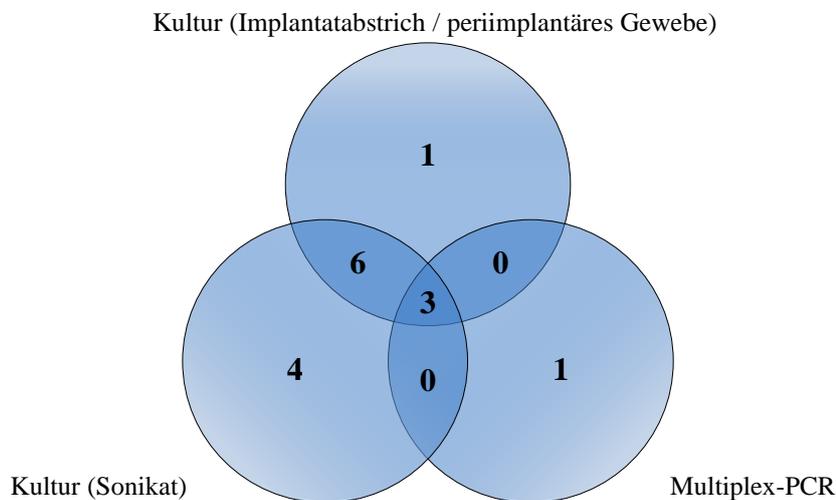


Abbildung 7: Darstellung positiver Untersuchungsbefunde und ihre Relationen zueinander innerhalb der Pseudarthrosen-Gruppe (mehrfach-identische Resultate einer Methode eines Patienten nur einfach einberechnet)

### 3.3 Pathogennachweise und -häufigkeiten

Gruppenübergreifend konnten insgesamt 74 positive Erregernachweise erzielt werden (multiple, identische Pathogennachweise einer Untersuchungsmethode eines Patienten nur

singulär einbezogen). Davon waren 35 der Sonikation, 11 der Kultur des Implantatabstrichs, 21 der Kultur des periimplantären Gewebes sowie 7 der Multiplex-PCR zuzuordnen.

Tabelle 9: Abundanz der detektierten Pathogene aller diagnostischen Methoden (geordnet nach ihrer Häufigkeit)

Detektierte Pathogene	Gesamt	Pseudarthrosen	Infekt	Kontrolle
<i>Propionibacterium acnes</i>	21	9	5	7
<i>Staphylococcus epidermidis</i> <sup>a</sup>	17	11	0	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	2	9	0
<i>Staphylococcus lugdunensis</i> <sup>a</sup>	3	3	0	0
Koagulase-negative Staphylokokken <sup>a</sup> o.n.A.	3	2	0	1
<i>Staphylococcus warneri</i> <sup>a</sup>	3	1	1	1
<i>Staphylococcus hominis</i> <sup>a</sup>	2	1	1	0
<i>Staphylococcus capitis</i> <sup>a</sup>	2	1	0	1
<i>Micrococcus luteus</i>	2	1	0	1
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i> <sup>a</sup>	1	1	0	0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	1	0	0
Anaerobe grampositive Kokken (o.n.A.)	1	1	0	0
Mikrokokken (o.n.A.)	1	1	0	0
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	0	1	0
<i>Staphylococcus cohnii</i> <sup>a</sup>	1	0	1	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <sup>a</sup>	1	0	0	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	0	1
<i>Ralstonia pickettii</i>	1	0	0	1
<b>Gesamt</b>	<b>74</b>	<b>35</b>	<b>18</b>	<b>21</b>

**Legende:** o.n.A. = ohne nähere Angabe im Befund; mehrfach-identische Resultate einer Methode nur einfach einberechnet  
Alle aufgezählten Staphylokokken mit Ausnahme von *Staphylococcus aureus* sind Koagulase-negative Vertreter (<sup>a</sup>).<sup>87,100</sup>

Innerhalb der Pseudarthrosen-Gruppe wurden 35 Pathogene detektiert – 15 durch Sonikation, 7 über Implantatabstrich, 9 mittels Kultur des periimplantären Gewebes sowie 4 via PCR. Die Infekt-Gruppe war durch 18 Mikroorganismen charakterisiert, von denen 7 mittels Sonikation, 3 durch den Implantatabstrich, 6 über periimplantäres Gewebe sowie 2 via PCR ermittelt wurden. Auch bei der Kontroll-Gruppe zeigten sich Pathogene (n = 21). Die mikrobiologischen Analysen des Sonikats, des Implantatabstrichs und des periimplantäres Gewebes eruierten 13, 1 bzw. 6 Erreger. Die Multiplex-PCR lieferte den Nachweis eines Pathogens (siehe Tabelle 8).

Die am häufigsten detektierten Erreger (analoge Resultate einer Untersuchungsmethode eines Patienten nur einfach einberechnet) in der Gesamtpopulation waren *Propionibacterium acnes* mit 28 % (n = 21), *Staphylococcus epidermidis* mit 23 % (n = 17) sowie *Staphylococcus aureus* mit 15 % (n = 11). In der Pseudarthrosen-Gruppe traten mehrheitlich *Staphylococcus epidermidis* (n = 11 bzw. 31 %) und *Propionibacterium acnes* (n = 9 bzw. 26 %) auf. *Staphylococcus aureus* (n = 9) erwies sich mit 50 % als häufigster Erreger in der Infekt-Gruppe. Die Kontroll-Gruppe inkludierte vor allem *Propionibacterium acnes* (n = 7) und *Staphylococcus epidermidis* (n = 6). Bei Betrachtung aller Koagulase-negativen Staphylokokken ergaben sich 33, 20, 3 bzw. 10 Zählungen in der Gesamt-, Pseudarthrosen-, Infekt- bzw. Kontroll-Gruppe (siehe Tabelle 9).

Die Ergebnisse der Gesamtpopulation zeigten unter Berücksichtigung aller diagnostischen Methoden in 18 Fällen singuläre sowie bei 15 weiteren Patienten multipel-differente Erregernachweise. In 5 Fällen existierten keine Pathogendetektionen. Während sich die Pseudarthrosen-Gruppe mit 7 singulären und 8 polymikrobiellen Nachweisen präsentierte, gab es in der Infekt- und Kontroll-Gruppe 4 bzw. 7 singuläre sowie 2 bzw. 5 polymikrobielle Befunde (siehe Tabelle 8).

### 3.4 Differenzierte Betrachtung anhand der Infektionskriterien

Von insgesamt 38 Patienten erfüllten 18 die Infektionskriterien (siehe Abbildung 8). Bei den verbliebenen 20 lagen aseptische Fälle vor. Der größte absolute Anteil an den erfüllten Infektionskriterien war mit 9 von 17 Patienten auf die Pseudarthrosen-Gruppe zurückzuführen (53 %). Die Infekt-Gruppe trug mit 5 von 6 Studienteilnehmern den größten relativen Anteil innerhalb einer Population bei (83 %). Auch in der Kontroll-Gruppe existierten bei 15 Patienten 4 septische Fälle (27 %). Die mikrobiologischen Kulturen des Sonikats offerierten dabei 4 positive Befunde (siehe Abbildung 8). Ein Patient (siehe Tabelle 8, Fall 29) erfüllte trotz präoperativer Einordnung in die Infekt-Gruppe nicht die Infektionskriterien (kulturnegative Infektion).

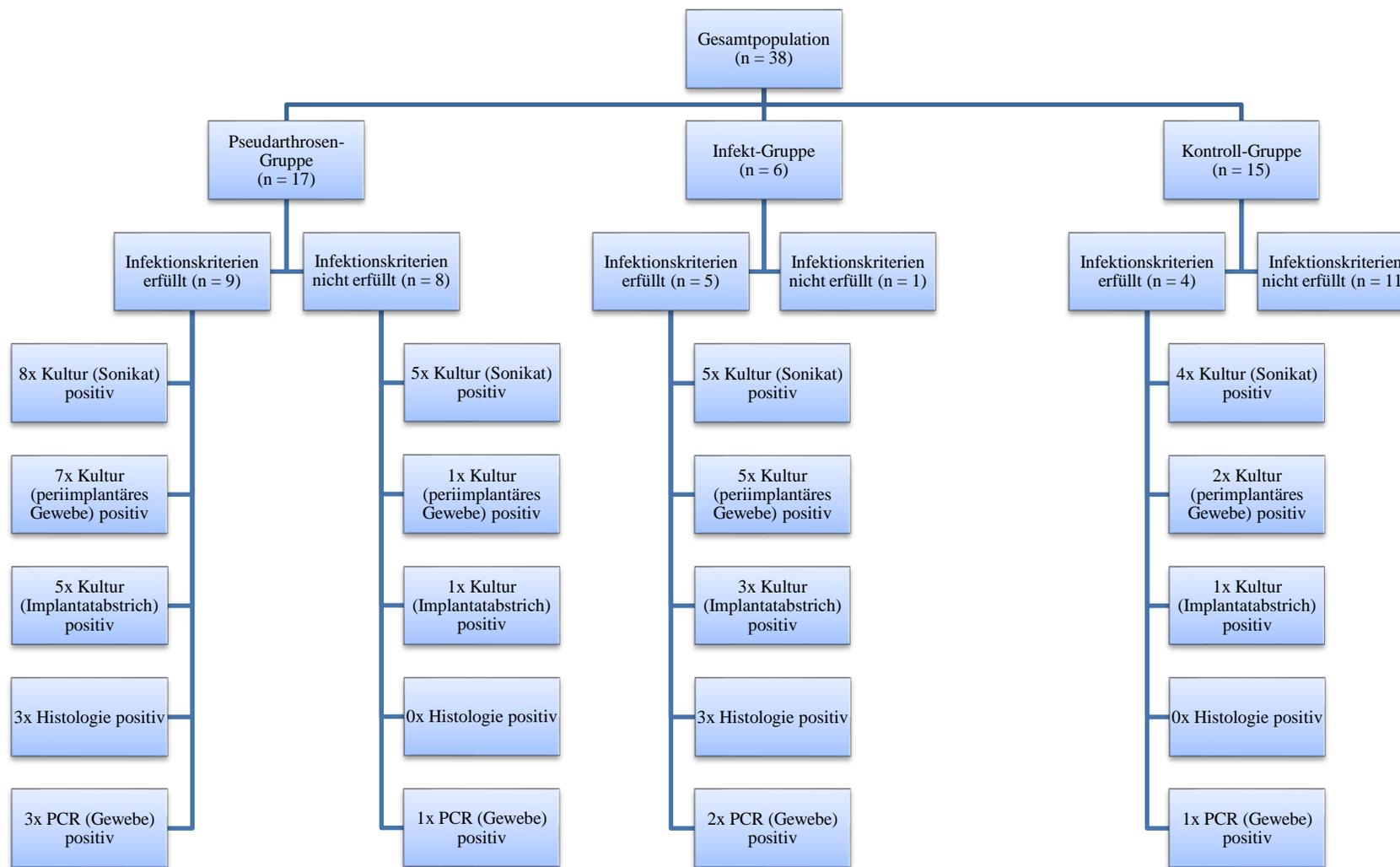


Abbildung 8: Übersicht zur Erfüllung der Infektionskriterien und Beitrag einzelner Diagnostikmethoden (mehrfach-identische Befunde einer Methode nicht einberechnet), Achtung: PCR ist nicht in den Infektionskriterien enthalten, dennoch zur Veranschaulichung ebenfalls dargestellt

In diesem Kasus lag ein positiver Befund der Sonikation mit 2 singulären Erregernachweisen vor, was nicht zur Erfüllung der Kriterien ausreichte.

Die Pseudarthrosen-Gruppe wies 9 septische und 8 aseptische Fälle auf (siehe Abbildung 9). Bei 3 septischen Patienten wurden positive Befunde mittels PCR erzielt (33 %). In 2 Fällen (Patientennummer 13 und 19, siehe Tabelle 8) konnten die Infektionskriterien ausschließlich aufgrund der positiven Histologie erfüllt werden. Zusätzlich dazu existierten bei den aseptischen Patienten weitere 5 positive Befunde via Analyse des Sonikats (63 %).

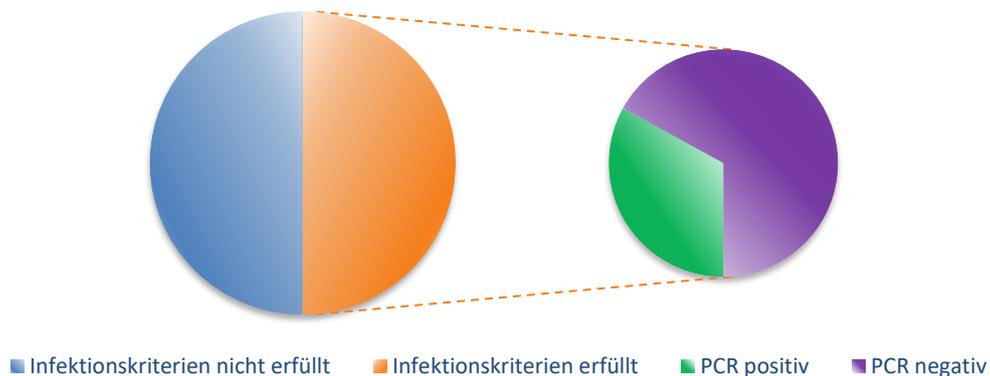


Abbildung 9: Anteil an erfüllten Infektionskriterien und positiven PCR-Befunden in der Pseudarthrosen-Gruppe; 9 septische Pseudarthrosen stehen 8 aseptischen gegenüber (entspricht näherungsweise einem Verhältnis von 1:1)

### 3.5 Gegenüberstellung der PCR zu anderen diagnostischen Methoden

Bei der individuellen Betrachtung aller 25 PCR-Ergebnisse gab es 7 positive Befunde (28 %). Von diesen 7 Fällen konnten mikrobiologisch 6 mittels Sonikation, 3 via Implantatabstrich sowie 4 über periimplantäres Gewebe bestätigt werden (siehe Abbildung 10a).

Auf die 4 PCR-positiven Patienten aus der Pseudarthrosen-Gruppe entfielen dabei 3 positive Befunde der Sonikation sowie je 2 positive Analysen der Kulturen vom Implantatabstrich und periimplantärem Gewebe. Das eine positive PCR-Ergebnis aus der Kontroll-Gruppe wurde durch Befunde der Kulturen des Sonikats unterstützt.

Hervorzuheben ist, dass in einem Fall (Patient 16) eine Pathogendetektion (Koagulase-negative Staphylokokken) mittels PCR vorlag, während die anderen Untersuchungsmethoden keinen Erregernachweis ergaben (siehe Abbildung 10b).

Marcus Nitzsche: Infektionsdiagnostik bei Pseudarthrose – Eine Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Ergebnisse

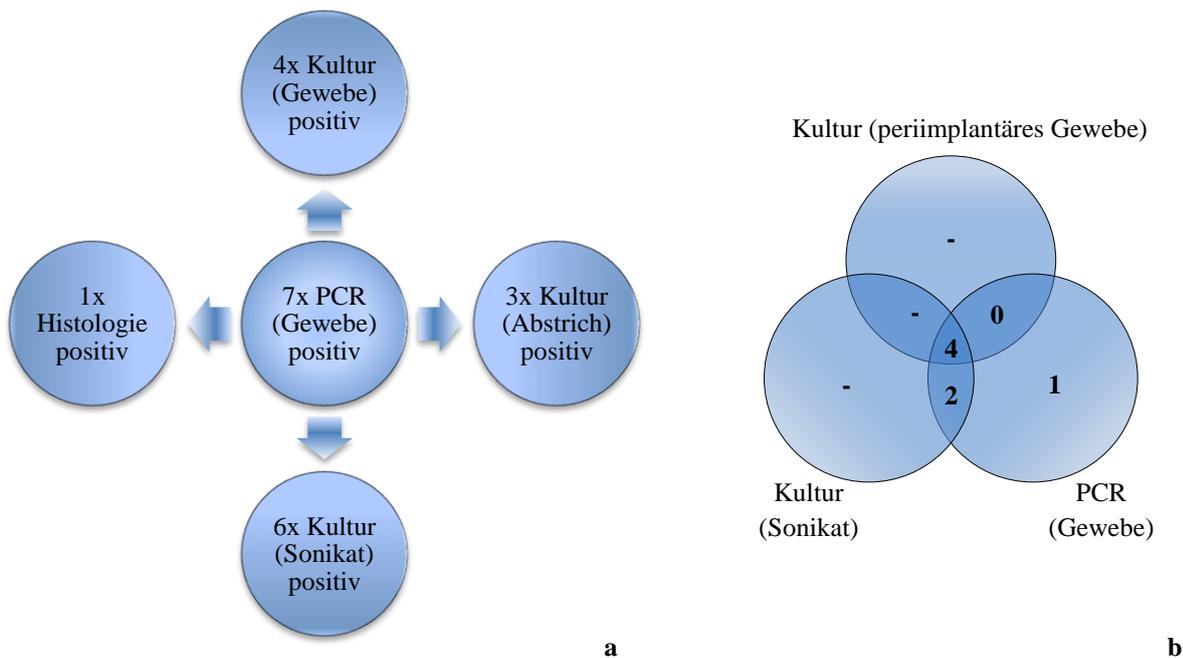


Abbildung 10: Befunde von PCR-positiven Patienten in absoluten Zahlen (10 a) sowie deren Relationen (10 b)

Bei dem Vergleich der PCR-Ergebnisse, welche ebenfalls auf periimplantärem Gewebe basieren, mit dem konventionellen, mikrobiologischen Goldstandard (Kulturen des periimplantären Gewebes) innerhalb der Pseudarthrosen-Gruppe zeigten sich insgesamt 9 konkordante und 8 diskordante Ergebnisse (siehe Tabelle 10). Während beide Untersuchungsmethoden in 2 Fällen das identische Pathogen detektierten, ergaben sie bei 7 weiteren Patienten konkordant keinen Erregernachweis.

Tabelle 10: Vergleich der PCR zur konventionellen Kultur von periimplantärem Gewebe (Pseudarthrosen-Gruppe)

Konkordanz	Anzahl der Fälle
Konkordant positiv (PCR + / Gewebekultur +), Pathogene identisch	2 / 8 (25 %)
Konkordant negativ (PCR - / Gewebekultur -)	7 / 9 (78 %)
Diskonkordant (PCR - / Gewebekultur +)	6 / 8 (75 %)
Diskonkordant (PCR + / Gewebekultur -)	2 / 9 (22 %)
<b>Gesamt Konkordant:</b>	<b>9 / 17 (53 %)</b>
<b>Gesamt Diskonkordant:</b>	<b>8 / 17 (47 %)</b>

**Legende:** Die Prozentangaben wurden gerundet.

Bei Betrachtung der mikrobiologischen Untersuchungen des Sonikats, des Implantatabstrichs und des periimplantären Gewebes ergaben sich 14 Kultur-positive Patienten in der Pseudarthrosen-Gruppe (82 %). Die Analyse mittels PCR konnte von diesen Fällen 3 Erreger erfassen (siehe Abbildung 11). Von den anderen 11 Patienten mit Kultur-positiven und PCR-negativen Resultaten wies ein Patient ein Pathogen auf, welches das Erregerpanel des Multiplex-PCR-Systems nicht enthielt (Fallnummer 1: *Micrococcus luteus*).

Der *klinischen* PCR-Performance (Berechnung unter Berücksichtigung aller Mikroorganismen) mit Pathogenerfassungen bei 3 von 14 Patienten (21 %) stand durch diesen Ausnahmefall eine *analytische* PCR-Performance (Ausschluss von nicht im Erregerpanel enthaltenen Organismen) mit mikrobiologischen Nachweisen bei 3 von 13 Patienten (23 %) gegenüber. Die verbliebenen Erreger waren in dem Verzeichnis detektierbarer Pathogene aufgelistet (siehe Tabelle 5). Dies betraf sowohl die 6 Kultur-positiven, monomikrobiellen Infektionen (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus lugdunensis*) als auch die 8 polymikrobiellen Entzündungen (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* sowie *Streptococcus dysgalactiae* in heterogenen Kombinationen). Während die PCR-Ergebnisse bei ersteren in 2 von 6 Fällen (33 %) positiv waren, zeigten sie bei den polymikrobiellen Infektionen in 1 von 8 Fällen ein partikulär positives Resultat (13 %). Hierbei wurde analog zu den kulturellen Befunden *Propionibacterium acnes* nachgewiesen. Der ebenfalls im Erregerpanel enthaltene Mikroorganismus *Staphylococcus warneri* konnte nicht detektiert werden (siehe Abb. 11). Anderweitig lagen keine positiven PCR-Resultate bei polymikrobiellen Befunden vor.

In diesem Zusammenhang sei weiterhin erwähnt, dass gruppenübergreifend insgesamt 4 verschiedene Pathogene bei 5 Patienten über mikrobiologische Analysen nachgewiesen wurden, welche nicht im Erregerpanel des PCR-Systems enthalten waren:

- *Micrococcus luteus* (Fallnummer 1, Pseudarthrosen-Gruppe),
- *Micrococcus luteus* (Fallnummer 8, Kontroll-Gruppe),
- *Ralstonia pickettii* (Fallnummer 17, Kontroll-Gruppe) mit Verdacht auf Kontamination,
- *Staphylococcus saccharolyticus* (Fallnummer 20, Pseudarthrosen-Gruppe) sowie
- *Staphylococcus cohnii* (Fallnummer 29, Infekt-Gruppe).

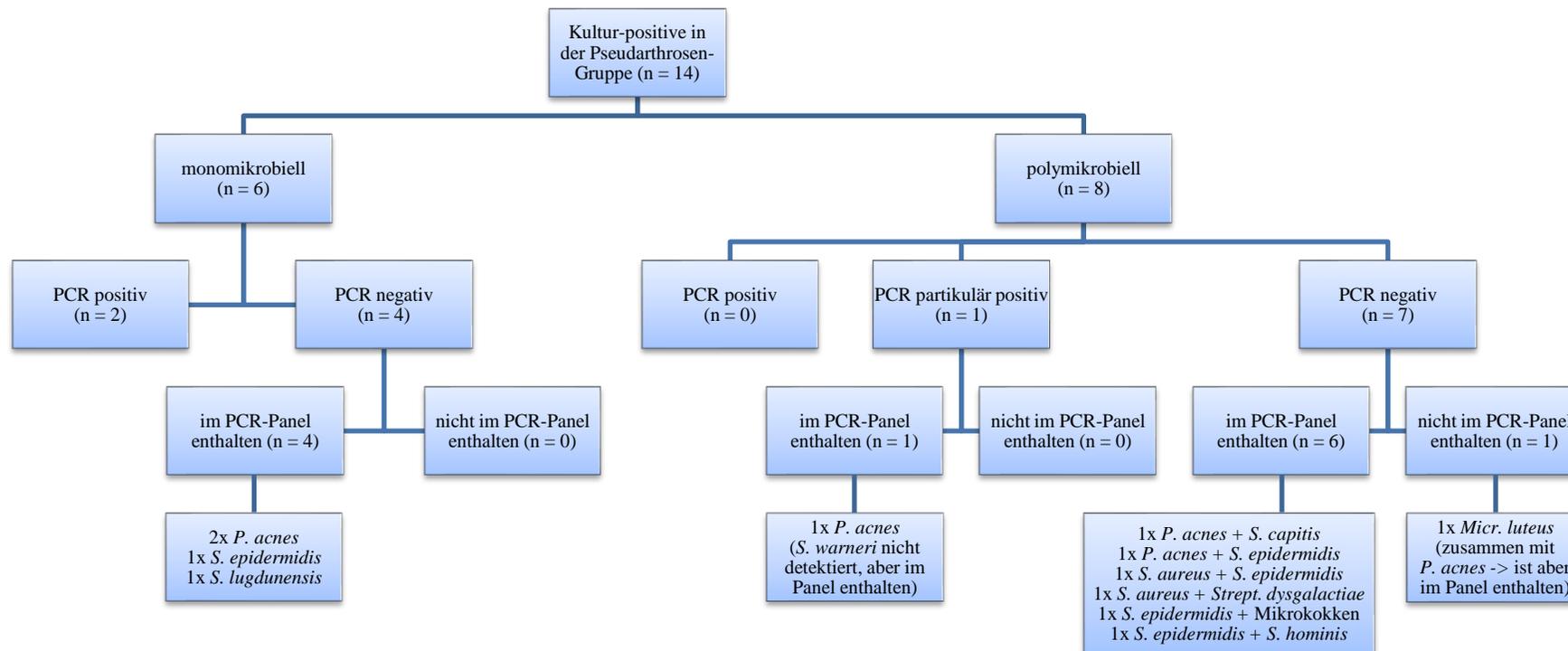


Abbildung 11: Klinische und analytische Performance der PCR bei Kultur-positiven Patienten innerhalb der Pseudarthrosen-Gruppe (PCR-Panel siehe Tabelle 5), Kultur-positiv bezieht sich hierbei auf die mikrobiologischen Analysen des Sonikats, des Implantatabstrichs sowie des periimplantären Gewebes; n entspricht der jeweiligen Fallanzahl, auf welche die Parameter zutreffen; partikulär positiv steht für die Detektion einer Teilmenge an Erregern bei polymikrobiellen Infektionen; Pathogen-Abkürzungen: S. = Staphylococcus, Strept. = Streptococcus, P. = Propionibacterium, Micr. = Micrococcus

### 3.6 Statistische Gütekriterien der verschiedenen diagnostischen Methoden

Eine detaillierte Auflistung der errechneten statistischen Parameter liefert die Tabelle 11. Während die histopathologische Begutachtung gruppenübergreifend mit 38 % die niedrigste Sensitivität zeigte, erzielte sie die höchste Spezifität (100 %). Innerhalb der Pseudarthrosen-Gruppe offerierte das PCR-Verfahren mit 33 % die geringste Sensitivität. Hinsichtlich der Spezifitäten ergaben sich bei dieser diagnostischen Methode stets Werte über 87 %. Die höchste Sensitivität konnte mit 89 % bei der Kultur des Sonikats ermittelt werden. Zudem stellte diese Verfahrensweise die Untersuchungsmethode mit der niedrigsten Spezifität dar (38 %). Die Kultur des periimplantären Gewebes lieferte gruppenübergreifend Parameter größer als 77 %.

Tabelle 11: Statistische Analyse der durchgeführten Diagnostikmethoden zur Identifikation einer Infektion

Diagnostische Methode zum Infektionsnachweis	Statistischer Parameter	Studiengruppen			
		Gesamt	Pseudarthrosen	Infekt	Kontrolle
<b>Histopathologie</b>	Sensitivität	38	38	60	0
	Spezifität	100	100	100	100
	PPV	100	100	100	-
	NPV	63	55	33	77
<b>Kultur (Sonikat)</b>	Sensitivität	94	89	100	100
	Spezifität	45	38	0	55
	PPV	61	62	83	44
	NPV	90	75	-	100
<b>Kultur (Implantatabstrich)</b>	Sensitivität	60	63	100	25
	Spezifität	93	83	-	100
	PPV	90	83	100	100
	NPV	68	63	-	73
<b>Kultur (periimplantäres Gewebe)</b>	Sensitivität	78	78	100	50
	Spezifität	80	88	100	73
	PPV	78	88	100	40
	NPV	80	78	100	80
<b>Multiplex-PCR (periimplantäres Gewebe)</b>	Sensitivität	46	33	67	100
	Spezifität	92	88	100	100
	PPV	86	75	100	100
	NPV	61	54	50	100

**Legende:**

Werte entsprechen gerundeten Prozentangaben, PPV = positiv prädiktiver Wert, NPV = negativ prädiktiver Wert einige statistische Parameter konnten mathematisch nicht ermittelt werden (Ursache: Division durch null)

## 4 Diskussion

### 4.1 Erörterung der Ergebnisse inklusive Literaturvergleich

Das komplexe Krankheitsbild der Pseudarthrose, insbesondere Formen mit septischer Pathogenese, erfordert eine frühzeitige diagnostische Abklärung.<sup>84</sup> Bei den mikrobiologischen Analysen von Gewebeproben (aktueller Goldstandard) wird jedoch eine mehrtägige Wartezeit auf die Resultate sowie die unzureichende Sensitivität (unter anderem durch eine vorherige Einnahme von Antibiotika) kritisiert.<sup>27,84,87,101</sup> Primär sollte daher untersucht werden, ob die innovative Multiplex-PCR von periimplantären Gewebeproben im Vergleich zum Goldstandard bessere Resultate hinsichtlich der Pathogendetektion erzielen kann. In diesem Kontext wurde die dem Krankheitsbild übergeordnete Hypothese aufgestellt, dass der Anteil an septischen Pseudarthrosen bisher unterschätzt wurde. Da auch die Sonikation ein vielversprechendes Verfahren darstellt, ist der Nutzen dieser Technik im Vergleich zum Goldstandard als sekundäre Fragestellung anzusehen.

Bei der Erläuterung der Untersuchungsergebnisse ist primär herauszustellen, dass laut des Unyvero Systems alle Messungen und ihre Resultate valide waren. Diese Angabe, welche nach Abschluss jeder Analyse offeriert wurde, beruhte auf den parallel vollzogenen Kontrollmessungen. Neben der korrekten Ausführung der Laborarbeit ist folglich zu konstatieren, dass die Multiplex-PCR-Analyse von periimplantären Gewebeproben bei Pseudarthrose-Patienten mit Osteosynthesen ein arriviertes Konzept darstellt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Studie zeigen, dass in 53 % aller Pseudarthrosen-Fälle die Infektionskriterien erfüllt waren (siehe Abbildung 9). Demnach ist bei der Hälfte von septischen Ausprägungsformen dieses Krankheitsbildes auszugehen. Von den 8 Teilnehmern mit Pseudarthrosen ohne erfüllte Kriterien für eine Infektion wiesen 5 Patienten positive Befunde via Sonikation auf, sodass, falls es sich nicht um Kontaminationen handelte, theoretisch sogar 14 von 17 Pseudarthrosen (82 %) auf infektiologischen Ursachen basieren könnten (siehe Abbildung 8).

In der Literatur werden zu dieser Thematik überwiegend deutlich niedrigere Zahlenangaben bis maximal 15 % vermerkt.<sup>28,102-104</sup> Aus einer genaueren Betrachtung vergangener Studien resultieren jedoch Werte, die von weniger als 10 % bis über 80 % reichen (siehe Tabelle 12).<sup>31,84,105</sup> Abweichende Zahlen lassen sich einerseits durch stark abweichende Populationsgrößen erklären. Andererseits spielen selbstverständlich auch die verwendeten diagnostischen Methoden eine

relevante Rolle. So zeigten die Untersuchungen von *Renz* und *Dapunt* mit den mikrobiologischen Analysen des Sonikats Erregernachweise bei 85 % beziehungsweise 57 %.<sup>105,106</sup> Inwiefern

Tabelle 12: Übersicht der Raten an septischen Pseudarthrosen in Studien

Studienautor (Jahr)	Population / Lokalisation	Durchgeführte analytische Diagnostikmethoden	Infektionsraten bei den analysierten Pseudarthrosen
<b>Renz et al. (2018)<sup>105</sup></b>	20 / kein Fokus	Klinik, Kultur (Sonikat, Gewebe) [Anm.: primär keine Pseudarthrosen-Studie, nur als Subpopulation vorliegend]	17 / 20 (85 %) [Anm.: hierbei keine sichere Unterscheidung zwischen <i>delayed union</i> und <i>non-union</i> ]
<b>Rollo et al. (2017)<sup>25</sup></b>	71 / Clavicula	Kultur (Gewebe)	22 / 71 (31 %)
<b>Wang et al. (2017)<sup>47</sup></b>	42 / kein Fokus	Kultur (Gewebe)	35 / 42 (83 %)
<b>Gausden et al. (2017)<sup>107</sup></b>	20 / Clavicula	Kultur (Gewebe) [Anm.: nur bei 18 von 20 erfolgte kulturelle Analyse]	15 / 18 (83 %) [Anm.: insgesamt 17 positiv, davon 2 Kontaminationen]
<b>Olszewski et al. (2016)<sup>108</sup></b>	666 / kein Fokus	Kultur (Gewebe) [Anm.: nur bei 453 Patienten mit Risikofaktoren erfolgte Kultur]	91 / 453 (20 %)
<b>Dapunt et al. (2015)<sup>106</sup></b>	49 / lange Röhrenknochen	Kultur (Gewebe) Kultur (Sonikat) Kultur (Wundabstrich) Histopathologie (Gewebe) 16S rDNA PCR (Sonikat)	5 / 49 (10 %) 28 / 49 (57 %) 3 / 44 (7 %) 3 / 32 (9 %) 5 / 42 (12 %)
<b>Palmer et al. (2014)<sup>31</sup></b>	34 / lange Röhrenknochen	Kultur (Gewebe, Abstrich) PCR (Gewebe)	8 / 34 (24 %) 30 / 34 (88 %)
<b>Amorosa et al. (2013)<sup>109</sup></b>	104 / diaphysäre Pseudarthrosen	Kultur (Gewebe) [Anm.: nur bei 87 Patienten vollständiges Follow-Up]	25 / 87 (29 %)
<b>Gille et al. (2012)<sup>84</sup></b>	23 / tibiale Pseudarthrosen	Kultur (Gewebe) 16S rRNA PCR (Gewebe)	0 / 23 (0 %) 2 / 23 (9 %)
<b>Simpson et al. (2002)<sup>48</sup></b>	60 / kein Fokus	Kultur (Gewebe) Histopathologie (Gewebe) [Anm.: nur bei 45 Patienten Übereinstimmung von Klinik und mikrobiologischer Analyse]	31 / 45 (69 %) 35 / 45 (78 %)

**Legende:** Prozentangaben entsprechen gerundeten Werten, Anm. = Anmerkung, rDNA = ribosomal deoxyribonucleic acid, rRNA = ribosomal ribonucleic acid

derartige Nachweise die Realität widerspiegeln bleibt fraglich, wenn, wie bei der Studie von *Dapunt*, auch in der Kontrollgruppe positive Pathogendetektionen bei 40 % der Patienten existieren.<sup>27,106</sup> Da die konventionelle Standarddiagnostik mittels kultureller Anzucht von periimplantärem Gewebe jedoch lediglich in 10 % Mikroorganismen nachweisen konnte, scheint es sich bei der Sonikation dennoch um ein vielversprechendes Verfahren zu handeln.<sup>106</sup> Auch einzelne PCR-Analysen ergaben mit 88 % erheblich häufigere Erregernachweise.<sup>31</sup> Sogar einige kulturelle Untersuchungen von periimplantärem Gewebe erreichten Werte über 80 %.<sup>47,107</sup> Ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse gestaltet sich jedoch schwierig, da teilweise unterschiedliche Voraussetzungen und Gegebenheiten bei den Studienpopulationen existierten. Während die Studien von *Simpson* und *Rollo* auch Patienten mit vorheriger konservativer Therapie enthielten, fokussierten sich die Untersuchungen von *Renz*, *Gausden*, *Dapunt*, *Palmer* und *Amorosa* auf Verläufe bei operativer, osteosynthetischer Versorgung.<sup>25,31,48,105-107,109</sup> Zusammenfassend lässt sich hinsichtlich der übergeordneten Hypothese konstatieren, dass die eigenen Ergebnisse mit einer infizierten Pseudarthrosen-Quote von 53 % solide in der Spannbreite der in Tabelle 12 visualisierten Studien vertreten sind. Welchen Anteil septische Pseudarthrosen tatsächlich einnehmen, wird sich durch weitere Studien mit größeren Populationen sowie die Weiterentwicklung der diagnostischen Methoden zeigen. Vermutlich ist er jedoch ausgeprägter als die propagierten 15 %.<sup>28</sup>

Hinsichtlich der primären Fragestellung ist festzustellen, dass die Multiplex-PCR von periimplantären Gewebeproben eine evident geringere Sensitivität bei vergleichbarer Spezifität zur konventionellen mikrobiologischen Kultur aufwies (siehe Tabelle 11). Bei den 9 septischen Pseudarthrosen besaß die Analyse mittels PCR mit nur 3 positiven Nachweisen eine marginale Übereinstimmung zu den Infektionskriterien (Sensitivität 33 %). Bei den anderen 6 Messungen konnte diese Untersuchungsmethode keine Pathogene detektieren, weshalb die Befunde in zwei Drittel der septischen Fälle als negativ zu werten waren (siehe Abbildung 9). Diesbezüglich offerierte die konventionelle Kultur von Gewebeproben mit 7 positiven Befunden eine deutlich höhere Sensitivität (78 %) in der Pseudarthrosen-Gruppe. Aufgrund der geringen Anzahl an falsch-positiven Resultaten ergaben sich für beide Untersuchungsmethoden jedoch gute Spezifitäten von jeweils 88 % (siehe Tabelle 11). Gruppenübergreifend erwies sich die Multiplex-PCR sogar als das spezifischere Verfahren (92 % versus 80 %), was auf die geringen Werte der Kultur in der Kontroll-Gruppe zurückzuführen ist.

Bei dem Vergleich dieser Werte mit dem aktuellen wissenschaftlichen Forschungsstand der

Polymerase-Kettenreaktion fällt auf, dass dieses Verfahren bei Pseudarthrosen- beziehungsweise Osteosynthesen-Studien kaum erforscht ist (abgesehen von den in der Tabelle 12 dargestellten).<sup>105</sup> Ein Unikat in diesem Sektor stellen die Untersuchungen von *Renz* dar, welche bei explantierten orthopädischen Implantaten für die PCR des Sonikats Sensitivitäten von 71 % bzw. 77 % (klinische versus analytische Performance) sowie eine Spezifität von 92 % ermitteln konnten.<sup>105</sup> Intensivere Bestrebungen zur Validierung von molekularen Verfahren gab es hingegen im Bereich der periprothetischen Infektionen. Dafür existiert bereits eine Meta-Analyse von *Qu*, in welcher für die PCR eine Sensitivität von 86 % sowie eine Spezifität von 91 % errechnet wurde.<sup>110</sup> *Li* kritisierte hierbei die inkohärente Inklusion bestimmter Studien und korrigierte nachfolgend die Werte auf 79 % beziehungsweise 86 %.<sup>111</sup> Einzelne Studien zu dieser Thematik variieren dabei in den Sensitivitäten von 56 % bis 96 % sowie den Spezifitäten von 74 % bis 100 %.<sup>83,112-118</sup>

Auch Forschungsprojekte, bei denen das identische Multiplex-PCR-System (Unyvero i60 ITI System, Curetis GmbH, Holzgerlingen, Deutschland) wie in unserer Studie verwendet wurde, offerieren divergierende Resultate der statistischen Parameter (siehe Tabelle 13). Erneut differieren die Angaben für Sensitivitäten mit 31 % bis 79 % stärker als die der Spezifitäten mit 94 % bis 100 %.<sup>89,119,120</sup> Die eigenen Ergebnisse mit Spezifitäten von 92 %, 88 % und 100 % für die Gesamt-, Pseudarthrosen- und Infekt-Gruppe sind folglich vergleichbar zu denen aus der Literatur (siehe Tabelle 11). Die in der Studie ermittelten Sensitivitäten von 46 %, 33 % und 67 % für die PCR-Messungen in den jeweiligen Gruppen entsprechen eher den inferioren Angaben anderer Studien (siehe Tabelle 13). Demnach handelt es sich bei den statistischen Gütekriterien der eigenen Studie um Zahlenwerte, welche unverkennbar mit den Resultaten anderer Forschungsgruppen korrespondieren. Während das PCR-Verfahren eine akzeptable Spezifität lieferte, generierte es, analog zur wissenschaftlichen Literatur, hinsichtlich der Sensitivität unzureichende Ergebnisse. Eine mögliche Erklärung hierfür offeriert eine Studie von *Ryu*, welche bei periprothetischen Gelenkinfektionen Sensitivitäten von 16 % und 78 % für die PCR-Analysen von periprothetischem Gewebe sowie Synovialflüssigkeit feststellte (Werte sind bei den zuvor beschriebenen Zusammenfassungen nicht enthalten).<sup>121</sup> Demnach ist nicht nur die Untersuchungsmethode selbst, sondern auch das zugrunde liegende Material entscheidend. Als potenzieller Erklärungsansatz dient dabei die Theorie, dass periprothetische Gelenkinfektionen charakteristischerweise mit mikrobiellen Biofilmen auf der Implantatoberfläche assoziiert sind, in denen sich die ursächlichen Mikroorganismen befinden.<sup>121</sup> Dahingegen ist es möglich, dass das periprothetische Gewebe nur geringfügige Akkumulationen der Pathogene aufweist, welche zudem inhomogen verteilt sein können.<sup>121</sup> Da die zu

Tabelle 13: Übersicht statistischer Parameter von PCR-Studien bei periprothetischen Gelenkinfektionen unter Verwendung des Unyvero Implant & Tissue Infection (ITI) Multiplex-PCR Systems der Firma Curetis

Studienautor (Jahr)	Population (Probenanzahl)	Untersuchungsgrundlage der Multiplex-PCR	Statistische Parameter
<b>Malandain et al. (2018)<sup>122</sup></b>	239 (440)	Biopsie + Knochen + periprothetisches Gewebe + Synovialflüssigkeit	Konkordanz der PCR mit konventioneller Kultur: 256 / 440 (58 %)
<b>Renz et al. (2017)<sup>119</sup></b>	111 (111)	Sonikationsflüssigkeit	Sensitivität 51 % Spezifität 94 %
<b>Lausmann et al. (2017)<sup>89</sup></b>	60 (60)	Gelenkpunktat	Sensitivität 79 % Spezifität 100 %
<b>Villa et al. (2017)<sup>123</sup></b>	47 (53)	DTT Gewebe  Synovialflüssigkeit	Sensitivität 34 %  Sensitivität 44 %
<b>Suda et al. (2017)<sup>120</sup></b>	28 (32)	Synovialmembran	Sensitivität 31 % Spezifität 100 %
<b>Prieto-Borja et al. (2017)<sup>124</sup></b>	68 (88)	Sonikationsflüssigkeit	Sensitivität 61 % Spezifität 98 %
<b>Hischebeth et al. (2016)<sup>125</sup></b>	31 (62)	Sonikationsflüssigkeit  Synovialflüssigkeit  Sonikationsflüssigkeit + Synovialflüssigkeit	Sensitivität 50 % Spezifität 100 %  Sensitivität 56 % Spezifität 100 %  Sensitivität 67 % Spezifität 100 %
<b>Borde et al. (2015)<sup>101</sup></b>	28 (79)	Gewebe	Konkordanz der PCR mit konventioneller Kultur: 23 / 28 (82 %)

**Legende:** Prozentangaben entsprechen gerundeten Werten, DTT = dithiothreitol zur Präparation von Gewebe<sup>123</sup>

analysierenden Gewebeproben bei derzeitigen PCR-Messungen jedoch auf eine maximale Größe limitiert sind (Unyvero System: 27 mm<sup>3</sup>), ist somit ein Probenentnahmefehler (*sampling error*) denkbar.<sup>87,121</sup> Trotz der Präsenz einer Infektion kann die molekulare Untersuchung einer Gewebeprobe diese folglich nicht immer detektieren. Vorstellbare Modifikationen zur Verbesserung der Sensitivität wären demnach die Analyse von multiplen Gewebeproben analog

zur mikrobiologischen Untersuchung sowie die Expansion der maximal erlaubten Gewebegröße für eine Messung.<sup>121</sup> Als weiterer Grund für die geringen Sensitivitäten können, trotz vollzogener Testreihen zur Determination, zu hohe Grenzwerte (*cut-off values*) für die Detektion von Mikroorganismen in Betracht gezogen werden, welche beim Unyvero ITI System erregerabhängig zwischen  $10^4$  und  $10^8$  Pathogenen pro Milliliter liegen.<sup>87,119,125</sup> Insbesondere bei chronischen, niedriggradigen Infektionen besteht die Möglichkeit, dass die mikrobielle Quantität signifikant unterhalb dieser Grenzwerte liegt.<sup>119</sup> Eine dahingehende Anpassung spiegelt daher eine weitere Verbesserungsmöglichkeit wider. Sollten diese Maßnahmen zukünftig nicht den erhofften Erfolg generieren, ist gegebenenfalls eine Substitution des Ausgangsmaterials durch Synovial- oder Sonikationsflüssigkeit erforderlich. Zusammenfassend zeigt das PCR-Verfahren überwiegend vielversprechende Spezifitäten bei verfahrens- und materialabhängig unzureichenden Sensitivitäten, welche unter anderem durch die erläuterten Modifikationen arrivieren könnten. Basierend auf den eigenen Daten kann aktuell keine Empfehlung zur routinemäßigen Detektion mittels molekularer PCR-Untersuchung von Gewebeproben erfolgen (niedrige Sensitivität).

Eine weitaus beträchtlichere Übereinstimmung mit den Infektionskriterien wies die mikrobiologische Analyse des Sonikats auf. Anhand der eigenen Resultate kann hinsichtlich der sekundären Fragestellung eine eindeutige Empfehlung zur Implementierung der Sonikation erfolgen. Von den 9 Pseudarthrose-Fällen mit erfüllten Infektionskriterien zeigten 8 positive Befunde. Dies ist selbstverständlich aber auch darauf zurückzuführen, dass das Verfahren Bestandteil der Kriterien war. In der Infekt-Gruppe manifestierten sich sogar alle 5 Individuen mit erfüllten Infektionskriterien als positiv (siehe Abbildung 8). Dementsprechend resultierten Sensitivitäten von 94 %, 89 % und 100 % in der Gesamt-, Pseudarthrosen- beziehungsweise Infekt-Gruppe (siehe Tabelle 11). Die kulturelle Anzucht der Sonikation ist somit ein Verfahren, welches geeignet ist, um periimplantäre Infektionen zu detektieren. Aufgrund von 5 positiven Befunden in der Pseudarthrosen-Gruppe bei unerfüllten Infektionskriterien sowie 4 pathologischen Ergebnissen in der Kontroll-Gruppe bei insbesondere dadurch erfüllten Kriterien stellt sich, wie bereits von anderen Autoren beschrieben, die Frage, inwiefern diese Methode wirklich optimalere Erregernachweise generiert oder lediglich vulnerabel für falsch-positive Resultate durch Kontaminationen ist.<sup>126</sup> Diese Tatsache spiegelt sich entsprechend in den niedrigen Spezifitäten von 45 %, 38 %, 0 % sowie 55 % der jeweiligen Subpopulationen wider (siehe Tabelle 11). Eine mögliche Begründung hierfür ist vermutlich auch in den festgelegten Infektionskriterien zu sehen, welche einen singulären Pathogennachweis in der Sonikation nicht als ausreichend erachteten.

Für die Applikation von Sonikation bei Osteosynthesen existieren keine Leitlinien-Empfehlungen. Dahingegen präsentiert der Vergleich mit der Literatur, zumindest für die Sensitivitäten von periprothetischen Gelenkinfektionen, vergleichbare Daten. Zwei vorliegende Meta-Analysen von *Liu* und *Zhai* offerieren hierfür Sensitivitäten von 79 % beziehungsweise 80 % sowie Spezifitäten von jeweils 95 %.<sup>126,127</sup> *Trampuz* legte in zwei weiteren Studien den überlegenen Wert der mikrobiologischen Analyse des Sonikats im Vergleich zu periprothetischem Gewebe dar (Sensitivitäten: 75 % versus 54 % und 78,5 % versus 60,8 %).<sup>128,129</sup> Als Erklärung dient dabei die Theorie, dass, vor allem bei vorheriger Antibiotikatherapie, die innerhalb des Biofilms überlebenden Mikroorganismen mithilfe der Sonikation in der resultierenden Flüssigkeit detektiert werden können.<sup>73,129</sup> Gewebeproben können die sessilen Pathogene nicht erfassen, sodass in diesen Fällen falsch-negative Befunde resultieren.<sup>58,130</sup> Trotzdem für die Detektion von Infektpseudarthrosen und implantatassoziierten Infektionen mittels Sonikation nur wenige Studien existieren, scheint jedoch auch bei diesen Krankheitsentitäten die mikrobiologische Analyse des Sonikats sensitiver als die der periimplantären Gewebeproben zu sein.<sup>27,106,131</sup> Folglich ist es logisch, dass *Renz* die Implementierung der Sonikation in die Diagnostik implantatassoziiierter Infektionen befürwortet.<sup>58</sup> Eine Kombination aus dem molekularen PCR-Verfahren und dem Analysematerial Sonikat könnte, wie bereits einige Studien belegen, sogar einen größeren Wert besitzen als die mikrobiologische Untersuchung der Gewebeproben oder des Sonikats.<sup>113,116,132</sup>

Die kulturelle Anzucht der periimplantären Gewebeproben, welche den aktuellen Standard in der Diagnostik von Infektpseudarthrosen darstellt, zeigte in der Pseudarthrosen-Gruppe gute Sensitivitäten (78 %) und Spezifitäten (88 %).<sup>27,133</sup> Aufgrund einer geringeren Anzahl an falsch-positiven Befunden im Vergleich zur Sonikation (gruppenübergreifend 4 versus 11), ergaben sich deutlich bessere Werte hinsichtlich der Spezifitäten, welche stets mindestens 72 % beziehungsweise in der Pseudarthrosen-Gruppe fast 90 % und in der Infekt-Gruppe sogar 100 % betragen. Die eigenen Daten bestätigen durch die guten Sensitivitäten und Spezifitäten die Notwendigkeit zur standardmäßigen Durchführung dieses Verfahrens.

Auch hier existiert die Problematik, dass die meisten Studien periprothetische Gelenkinfektionen untersuchten. Als statistische Parameter werden dafür unter anderem Sensitivitäten von 70 % bis 90 % sowie Spezifitäten von 67 % bis 91 % angegeben.<sup>127</sup> Es existieren jedoch auch Studien, welche Spezifitäten von fast 100 % ermittelten.<sup>134</sup> Die Bereiche dieser Werte sind gänzlich vergleichbar mit denen aus der eigenen Osteosynthesen-Studie. Im Zusammenhang mit der marginalen Konkordanz beider Methoden (siehe Tabelle 10) stellt sich die Frage, inwiefern die

molekulare PCR-Analyse von Gewebeproben einen vorteiligen Nutzen gegenüber den konventionellen Kulturen aufweist. Anhand der eigenen Daten kann als einziger, dafür aber relevanter Nachteil der kulturellen Diagnostik die mehrtägige beziehungsweise mehrwöchige Dauer bis zum abschließenden Befund genannt werden. Aufgrund der soliden Sensitivitäten sowie Spezifitäten scheint es sich aktuell mangels besserer, etablierter ökonomischer Diagnostikmethoden um den derzeitigen, legitimen Goldstandard zu handeln. Dieses erfährt jedoch zunehmend Konkurrenz durch die innovativen Techniken der PCR und Sonikation beziehungsweise der Kombination aus beiden Verfahren, welche progressiv weiterentwickelt und erforscht werden.

Die mikrobiologischen Kulturen der Implantatabstriche offerierten niedrige Sensitivitäten von maximal 63 % (Ausnahme Infekt-Gruppe) bei guten Spezifitäten von jeweils über 80 % (siehe Tabelle 11). Unterstützt werden diese Daten durch die wissenschaftliche Literatur, welche die Analyse intraoperativer Abstriche als nicht ausreichend sensitiv einstuft.<sup>22,27,135</sup> Daher kann keine Empfehlung zur routinemäßigen Durchführung von Implantatabstrichen erfolgen.

Die histopathologischen Begutachtungen der periimplantären Gewebeproben ergaben schlechte Sensitivitäten von maximal 60 % bei sehr guten Spezifitäten von jeweils 100 % (siehe Tabelle 11). Die eigenen Daten stimmen insofern mit den Angaben der Literatur überein, als dass die histopathologische Diagnostik ein hochspezifisches Verfahren darstellt. Hinsichtlich der Sensitivitäten wurden in anderen Studien bessere Ergebnisse erzielt. So zeigte eine Pseudarthrosen-Studie von *Simpson*, bei der die Anwesenheit von durchschnittlich mindestens einem neutrophilen Granulozyten pro Hauptgesichtsfeld als positiv hinsichtlich einer präsenten Infektion zählte, eine Sensitivität von 87 % sowie eine Spezifität von 100 %.<sup>48</sup> Während bei periprothetischen Gelenkinfektionen *Janz* basierend auf der Klassifikation der periprothetischen Membran eine Sensitivität und Spezifität von 87 % beziehungsweise 100 % ermitteln konnte, liegen für den *CD15 Focus Score* Sensitivitäten von 83 % bis 91 % sowie Spezifitäten von 86 % bis 92 % vor.<sup>94,99,136</sup> Obwohl die histopathologische Analyse keinen Erregernachweis und somit keine spezifische Antibiotikatherapie offeriert, kann sie dennoch bei fragwürdigen, positiven mikrobiologischen Befunden den Verdacht einer Kontamination durch den eigenen negativen Befund erhärten.<sup>27,98</sup> Eine histopathologische Begutachtung wird daher empfohlen.

Hinsichtlich der häufigsten Erreger wurde eine eindeutige Majorität an Staphylokokken analysiert. Mit insgesamt 10 verschiedenen Vertretern (siehe Tabelle 9, PCR-Befund *Koagulase-negative Staphylokokken ohne nähere Angabe* einberechnet) und einem Anteil von 44 bei 74 Nachweisen

repräsentierten sie die Mehrheit an Pathogenen. Dies wird insofern durch die wissenschaftliche Literatur unterstützt, als dass Staphylokokken für mehr als 50 % der Protheseninfektionen verantwortlich sind.<sup>137</sup> Der häufigste einzelne Mikroorganismus gehörte dagegen nicht der Gattung der Staphylokokken an, sondern den Propionibakterien (*Propionibacterium acnes*). Während die Bakterien *Propionibacterium acnes* sowie *Staphylococcus epidermidis* vor allem bei den Pseudarthrosen ursächlich beteiligt waren, zeigte sich der Erreger *Staphylococcus aureus* besonders bei der präoperativ bereits entzündungsverdächtigen Infekt-Gruppe. Auch diese Konstellationen spiegeln sich teilweise in der Literatur wider. Für periimplantäre Infektionen bei Osteosynthesen zählen *Staphylococcus aureus* (30 %) und Koagulase-negative Staphylokokken (22 %) zu den häufigsten Pathogenen.<sup>56,67</sup> Bei den Protheseninfektionen hingegen werden für kultivierte Mikroorganismen folgende Werte angegeben: Koagulase-negative Staphylokokken 30 – 43 %, *Staphylococcus aureus* 12 – 23 %, Mischflora 10 – 11 %, Streptokokken 9 – 10 %, Enterokokken 3 – 7 %, gramnegative Stäbchen 3 – 6 % und Anaerobier 2 – 4 %.<sup>56,67,138-140</sup> Auch ein Artikel, welcher im Jahr 2016 über die medizinische Fachzeitschrift *Lancet* publiziert wurde, bestätigt diese mikrobiologische Rangordnung periprothetischer Infektionen für Europa.<sup>141</sup> Analog zu den Angaben der Fachliteratur für Osteosynthesen zeigte sich in der Infekt-Gruppe *Staphylococcus aureus* als häufigster Erreger. Weiterhin ergaben in der vorliegenden Studie die Koagulase-negativen Staphylokokken nach Addition der einzelnen Pathogenanzahlen die am häufigsten vertretene Erregergruppe in der Gesamt-, Pseudarthrosen- sowie Kontroll-Gruppe. Lediglich der hohe Anteil an positiven Befunden mit dem anaeroben Bakterium *Propionibacterium acnes* (28 % der Gesamtpopulation, 26 % in der Pseudarthrosen-Gruppe) divergiert bezüglich der zuvor beschriebenen unter 5 % liegenden Angabe aus der Literatur. Dies kann durch den limitierenden Faktor einer kleinen Studienpopulation bedingt sein. Allerdings wurde bereits in einer Studie von *Gausden* gezeigt, dass *Propionibacterium acnes* möglicherweise einen nicht unerheblichen Stellenwert in der Pathogenese von Pseudarthrosen nach primärer Osteosynthese besitzt.<sup>107</sup> Das häufige Auftreten dieses Mikroorganismus in der eigenen Studie würde die Relevanz dieses Pathogens unterstützen.

Innerhalb der Pseudarthrosen-Gruppe existierte ein Fall (Nummer 16), bei dem ausschließlich die PCR-Analyse einen Erregernachweis offerierte (siehe Abbildung 7). In diesem Kasus stellte sich die Frage, ob die Detektion auf eine Kontamination zurückzuführen oder diese Methode den anderen Untersuchungsmitteln hierbei überlegen war. Da es sich bei den nachgewiesenen Koagulase-negativen Staphylokokken um typische Erreger für periimplantäre Infektionen handelt, welche mit 22 % zu den häufigsten ursächlichen Pathogenen zählen, ist eher letzteres zu

vermuten.<sup>56,67</sup> Wahrscheinlich lag bei diesem Patienten eine für Koagulase-negative Staphylokokken charakteristische chronische, niedrig-virulente Infektion vor, welche von den anderen Diagnostikmethoden nicht erfasst wurde.<sup>56</sup> Falls diese Vermutung zutreffen sollte, würde dies einen entsprechenden Vorteil der PCR gegenüber den Vergleichsmethoden bedeuten.

Bei Betrachtung der PCR-Resultate ist weiterhin festzuhalten, dass von den gruppenübergreifend 19 detektierten, unterschiedlichen Pathogenen 4 nicht im Erregerpanel des Multiplex-PCR Systems inkludiert waren (siehe Tabelle 5 und Tabelle 9). Das Vorliegen des Mikroorganismus *Ralstonia pickettii* wurde als Kontamination gewertet, sodass hierdurch keine Benachteiligung der PCR resultierte. In 3 weiteren Fällen (Nummer 8, 20, 29) war der Erreger entweder nicht ursächlich für die Infektion, die PCR hat ein anderes Pathogen nachgewiesen oder es lagen keine erfüllten Infektionskriterien vor (siehe Tabelle 8). Lediglich in einem Fall wurde die gesicherte Entzündung durch einen Mikroorganismus verursacht, welcher nicht im Erregerpanel enthalten war (Nummer 1: *Micrococcus luteus*). Da die PCR-Analyse hierbei einen negativen Befund ergab, beeinflusste das für diesen Kasus unzureichende Angebot an detektierbaren Bakterien das Nukleinsäure-basierte Verfahren negativ. Folglich würde das Unyvero System diesbezüglich wahrscheinlich von einer Erweiterung des Panels in der Zukunft profitieren.

## 4. 2 Schlussfolgerungen

Die Daten dieser Arbeit lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

1. Von 17 inkludierten Patienten mit Pseudarthrosen erfüllten 9 die Infektionskriterien. Somit kann in unserer Kohorte bei 53 % von einer septischen Pathogenese ausgegangen werden. Der in der Literatur propagierte Anteil von bis zu 15 % ist demnach deutlich unterschätzt.<sup>28</sup> Es existiert folglich eine hohe Dunkelziffer.
2. Die routinemäßige, infektiologische Analyse von periimplantären Gewebeproben mittels Multiplex-PCR kann, trotz der kurzen Untersuchungsdauer von 5 Stunden, aufgrund sehr niedriger Sensitivitäten (mit Ausnahme der Kontroll-Gruppe maximal 67 %) nicht zur Diagnostik von Infekt-pseudarthrosen empfohlen werden.
3. Mikrobiologische Kulturen von periimplantären Gewebeproben wiesen moderate Sensitivitäten und Spezifitäten (gruppenübergreifend 78 % bzw. 80 %) auf, weshalb sie, mangels besserer, etablierter Diagnostikmethoden den legitimen Goldstandard darstellen.

4. Die histopathologische Untersuchung periimplantärer Gewebeproben war ein hochspezifisches Diagnostikmittel (100 %) und kann folglich bei einem positiven Befund die Infektion mit großer Wahrscheinlichkeit bestätigen. Bedingt durch die unzureichende Sensitivität ( $\leq 60\%$ ) wird sie jedoch zu Recht nicht als primärer Goldstandard betrachtet.
5. Die kulturelle Anzucht des Implantatabstrichs kann aufgrund der niedrigen Sensitivität nicht empfohlen werden.
6. Das einzige Verfahren, welches mit einer hochwertigen Sensitivität ( $> 88\%$ ) überzeugen konnte, war die kulturelle Untersuchung des Sonikats. Anhand der eigenen Daten erfolgt daher die Empfehlung bei dem Verdacht einer Pseudarthrose die mikrobiologische Analyse des Sonikats durchzuführen.
7. Aufgrund der niedrigen Spezifität (stets  $< 56\%$ ) sollten zusätzlich zur Sonikation histopathologische Analysen und konventionelle Kulturen von Gewebeproben erfolgen.
8. Wegen des hohen Anteils an periimplantären Infektionen bei Pseudarthrosen besteht ein dringender Bedarf für Diagnostikmethoden mit hohen Sensitivitäten, wie es die mikrobiologische Analyse des Sonikats in Ansätzen zeigte.

Zusammenfassend ist anhand der eigenen Resultate festzustellen, dass sich die infektiologische Analyse von Gewebeproben mittels Multiplex-PCR zu den konventionellen Diagnostikmethoden unterlegen darstellte. Während die mikrobiologische Untersuchung von Gewebeproben höhere Sensitivitäten aufwies, präsentierte die histopathologische Befundung optimalere Spezifitäten. Der kurzen Diagnosedauer der PCR standen dabei höhere Materialkosten gegenüber. Final kann daher anhand der ermittelten Daten keine generelle Empfehlung zur standardmäßigen Analyse von periimplantären Gewebeproben mittels Multiplex-PCR bei Pseudarthrosen ausgestellt werden.

#### 4.3 Erörterung der Methodik und Limitationen der Studie

Als Stärken dieser Studie sind vor allem die Integration von zwei Kontrollgruppen zu nennen. Neben der Existenz einer negativen Kontrollgruppe („Kontroll-Gruppe“), dessen Patienten zur geplanten, aseptischen Implantatentfernung operiert wurden, lag eine positive Kontrollgruppe („Infekt-Gruppe“) mit klinischen periimplantären Infektionen vor. Somit bestanden parallel zur primär relevanten Pseudarthrosen-Gruppe zwei weitere Subpopulationen zum Vergleich. Diese Einteilung beruhte auf der klinischen Einschätzung vor der Operation und ist unabhängig von

einer finalen Erfüllung der Infektionskriterien erstellt worden, sodass innerhalb der Infekt-Gruppe auch aseptische und in der Kontroll-Gruppe septische Fälle (siehe Infektionskriterien) auftreten konnten. Dies ermöglichte eine differenziertere Auswertung der einzelnen diagnostischen Methoden. Dabei ist zu pointieren, dass auch die Vielzahl an angewendeten, ausgewerteten und verglichenen Verfahren (Kulturen des periimplantären Gewebes, Implantatabstrichs und Sonikats sowie die histopathologische und moderne nukleinsäureabhängige Analyse periimplantärer Gewebeprobe(n)) als Besonderheit anzusehen ist. So wurde die Sonikationsflüssigkeit, aufgrund von besseren Resultaten in vergangenen Studien, nicht nur auf konventionellen Agarplatten, sondern auch in Blutkulturflaschen angezüchtet.<sup>93</sup>

Eine weitere Qualität war das vielseitig aufgestellte Erregerpanel des Multiplex-PCR-Systems. Aus den über 60 genetischen Markern, welche 114 Zielsequenzen abdeckten, resultierte eine Spannbreite von mehr als 70 detektierbaren Pathogenen (siehe Tabelle 5).<sup>91</sup> Damit offerierte das Unyvero i60 ITI System (Curetis GmbH, Holzgerlingen, Deutschland) nicht nur eine hohe Quantität an potenziell-ursächlichen Mikroorganismen, sondern auch typische Biofilm-bildende Erreger (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. sowie *Candida* sp.).<sup>91</sup> Zudem lag nach dem finalem Zusammenbau der Kartusche ein physikalisch geschlossenes System vor, welches, verglichen mit den anderen Methoden, das Kontaminationsrisiko reduzierte.<sup>87</sup>

Hervorzuheben ist weiterhin, dass für die Multiplex-PCR-Analyse ausschließlich periimplantäre Gewebeprobe(n) verwendet wurden. Die Option auch Sonikationsflüssigkeiten, Gelenkflüssigkeiten, Abstrichtupfer, Katheterspitzen, Exsudate, Transsudate, Drainageflüssigkeiten sowie Knochenfragmente zu untersuchen verdeutlicht, welche Perspektiven derartige Geräte beziehungsweise Verfahrensweisen hinsichtlich der verschiedenen Fachrichtungen und Indikationen in Zukunft bieten könnten.<sup>87</sup> Dies wird komplettiert durch die kurze Zeitspanne, nach welcher bereits Resultate vorlagen. Während konventionelle, kulturelle Verfahren bis zu zwei Wochen andauerten, offerierte die Multiplex-PCR Ergebnisse nach etwa 5 Stunden.<sup>87</sup> Dies ermöglicht insbesondere im klinischen Alltag eine frühzeitige Anpassung der therapeutischen Strategie. Da nicht nur Pathogene, sondern auch deren Antibiotikaresistenzen detektiert werden, kann zudem eine Adaptation des antimikrobiellen Regimes erfolgen.

Als Limitation dieser Arbeit ist vor allem die relativ geringe Patientenzahl zu nennen. Obwohl fast die Hälfte der in die Studie eingeschlossenen Patienten der Pseudarthrosen-Gruppe angehörten (17 von 38), handelte es sich dennoch um eine kleine Population. Während die Kontroll-Gruppe immerhin 15 Individuen aufwies, betrug die Anzahl in der

Infekt-Gruppe lediglich 6. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls zu erwähnen, dass sich die einzelnen Patienten durch unterschiedliche Charakteristika (z. B. Frakturlokalisierung) auszeichneten. Weitere wissenschaftlich-fundierte Studien mit größeren Populationen sind daher in der Zukunft anzustreben. Da die Studie zur Gegenüberstellung des derzeitigen Goldstandards (Kultur periimplantärer Gewebeprobe) mit neueren Methoden (PCR, Sonikation) diente, wurde, analog zu ähnlichen Studien in der aktuellen Forschung, keine Randomisierung durchgeführt.<sup>105</sup>

Ein weiterer Kritikpunkt ist, wie bereits in der Einleitung dieser Promotionsarbeit beschrieben, der Mangel an einheitlichen Definitionen. Trotzdem sich in Deutschland eine fehlende ossäre Konsolidierung nach 6 Monaten etabliert hat, gibt es international keine uniforme Festlegung.<sup>22,23</sup> Hierbei steht vor allem der Aspekt der individuellen Frakturheilung mit vielfältigen Einflussfaktoren (Risikofaktoren für die Entwicklung einer Pseudarthrose: siehe Tabelle 2) im Fokus, welcher eine homogene Charakterisierung erschwert.<sup>23</sup> Aufgrund des Fehlens einer international anerkannten Definition einer Pseudarthrose, wurde sich für die Einordnung innerhalb der Studie an der in Deutschland legitimen Festlegung von 6 Monaten orientiert.

Des Weiteren existieren nach bestem Erkenntnisstand keine international renommierten Kriterien für die Determination von implantatassoziierten Infektionen bei Osteosynthesen. Im Gegensatz dazu werden für periprothetische Infektionen zwei Major- und fünf Minorkriterien der *International Consensus Group* basierend auf dem *International Consensus Meeting on Periprosthetic Joint Infections* aus dem Jahr 2013 verwendet.<sup>141-143</sup> Für den Implantat-Typ Osteosynthese liegen stattdessen unter anderem die von *Renz* designierten Merkmale (siehe Tabelle 4) vor.<sup>58</sup> Da es sich bei den Patienten in der Studie ausschließlich um Entfernungen von Osteosynthesen handelte, wurden die empfohlenen Charakteristika für letztere als Grundlage zur Aufstellung der Infektionskriterien herangezogen. Die in der Tabelle 4 enumerierten Aspekte Anamnese, Klinik und Radiologie dienten der präoperativen Gruppeneinteilung. Im routinemäßigen Ablauf an der Charité fanden bei den Explantation der Osteosynthesen keine Gelenkpunktionen statt, sodass keine Untersuchungen der Synovialflüssigkeit beziehungsweise der Zellzahl durchgeführt wurden. Geringfügig modifiziert resultierten als finale Major-Kriterien ein identischer Erregernachweis in mindestens zwei mikrobiologischen Kulturen (Gewebeprobe, Implantatabstrich, Sonikat) oder ein positiver histopathologischer Befund. Für letzteren wurde an der Charité standardmäßig die Klassifikation der periprothetischen Membran nach Morawietz und Krenn angewendet, wobei die Typen II und III als infektionsverdächtig zählten.<sup>98</sup> Bei Erfüllung eines dieser beiden Kriterien galt im Rahmen der

Studie eine manifeste Infektion als gesichert. Da die Histopathologie ein Major-Kriterium darstellte, lagen bei den aseptischen Fällen folglich negative histopathologische Befunde vor.

Es bleibt fraglich, inwiefern eine histopathologische Begutachtung auf der Grundlage von Granulozyten pro Gesichtsfeld (Grenzwert: > 5 Granulozyten in 400-facher Vergrößerung) andere, möglicherweise bessere Resultate erzielen würde.<sup>58</sup> Bei periprothetischen Infektionen wird derzeit sogar die Implementierung eines neuen Scores, *CD15 Focus Score* genannt, diskutiert.<sup>99</sup> Dieses unkomplizierte Verfahren zeigte in ersten Studien diesbezüglich vielversprechende Sensitivitäten sowie Spezifitäten und basiert auf der Quantität von CD15-positiven Granulozyten.<sup>99,136</sup> Er ermöglicht zusätzlich zur Feststellung eines infektiösen Geschehens sogar eine Differenzierung zwischen niedrig-virulenten und hochgradig-virulenten Mikroorganismen.<sup>99</sup> In diesem Zusammenhang gibt es bereits Intentionen und erste Umsetzungen zur automatisierten Durchführung mithilfe einer speziellen Software namens *CD15-Quantifier*.<sup>136</sup> Inwiefern sich dieser Score zukünftig etablieren wird beziehungsweise auf Infektionen bei Osteosynthesen übertragbar ist, bleibt abzuwarten.

Eine weitere Einschränkung existiert in der Auswertung der positiven Befunde. Während für die Erfüllung der Infektionskriterien ein Pathogen in zwei Befunden vorliegen musste, reichte für den positiven Befund einer Methode der Nachweis eines beliebigen Mikroorganismus aus. Dabei erfolgte keine weitere Differenzierung hinsichtlich der Übereinstimmung des Erregers zur Erfüllung der Infektionskriterien, da allein festgestellt werden sollte, ob eine diagnostische Untersuchungsmethode eine potenzielle (möglicherweise sogar polymikrobielle) Infektion nachweisen kann. Zudem sei erwähnt, dass eine weitere Limitation der Studie die in einigen Fällen unvollständige Anzahl an Untersuchungsbefunden ist.

Hinsichtlich der PCR-Analysen gab es außerdem die Einschränkung, dass als Grundlage für die Messung teilweise nur eine periimplantäre Gewebeprobe (in wenigen Fällen zwei oder drei Biopsien) zur Verfügung stand. Möglicherweise könnte auch die standardmäßige Einbeziehung mehrerer Gewebeproben, welche dann präanalytisch entsprechend der maximalen Größenvorgabe präpariert werden, optimalere Resultate zur Folge haben.

Abschließend ist auch der finanzielle Aspekt nicht zu vernachlässigen. Während die PCR-Analyse ein vielfach schnelleres Ergebnis als die kulturellen Verfahren offeriert, sind die Kosten für die notwendigen Geräte sowie die Kartuschen inklusive Zubehör nicht unerheblich und sollten bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse und Diskussion des optimalen Verfahrens inkludiert werden.

#### 4. 4      Fazit und Ausblick

Frakturen stellen ein gesellschaftlich-relevantes Problem dar, welches insbesondere bei unphysiologischen Heilungsprozessen zur häufigen Komplikation einer Pseudarthrose führen kann.<sup>27</sup> Aufgrund der Tatsache, dass lokale Infektionen ätiologisch ausschlaggebend sein können und diese septischen Formen andere Behandlungskonzepte erfordern, wird eine frühzeitige, korrekte sowie interdisziplinäre Diagnostik und Therapie als essenziell angesehen.<sup>22</sup>

Die molekulare Analyse mittels Multiplex-PCR bietet hierbei den exorbitanten Vorteil einer schnellen Diagnostik innerhalb von fünf Stunden. Trotz der hohen Spezifität kann derzeit, aufgrund der unzureichenden Sensitivität in der eigenen Studie sowie der wissenschaftlichen Forschungen anderer Autoren (siehe Tabellen 11 und 13), keine Empfehlung zur routinemäßigen Durchführung bei dem Verdacht einer Pseudarthrose ausgesprochen werden. Weitere Studien mit größeren Populationen inklusive einiger Modifikationen (zum Beispiel Expansion der maximal erlaubten Gewebegröße, Adaptation der erregerabhängigen Grenzwerte beziehungsweise *cut-off values* oder Substitution des Analysematerials durch Sonikationsflüssigkeit) sind notwendig, um den tatsächlichen Nutzen dieses Verfahrens für die zukünftige (Infekt-)Pseudarthrosen- und Osteosynthesen-Diagnostik zu eruieren. Die Veröffentlichung einer evidenzbasierten, medizinischen Leitlinie für posttraumatische Pseudarthrosen ist im Jahr 2019 geplant.<sup>144</sup>

Hinsichtlich der primären Fragestellung ist zu konstatieren, dass sich die PCR in der eigenen Studie inferior bzw. in der aktuellen wissenschaftlichen Forschung allgemein nicht superior zu den konventionellen Techniken darstellt. Die Kultur des Sonikats scheint hinsichtlich der Sensitivität (vor allem bei vorheriger Antibiotikatherapie und Existenz eines Biofilms) die zukunftsträchtigste Methode zu sein, weshalb eine Implementierung in das standardmäßige, diagnostische Prozedere bei Pseudarthrosen empfohlen wird. Aufgrund einer nicht unerheblichen Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen, sollten jedoch stets die konventionellen mikrobiologischen und histopathologischen Analysen der Gewebeproben parallel erfolgen (siehe Tabelle 11).

Final bleibt zu resümieren, dass der Anteil an septischen Pseudarthrosen wahrscheinlich ausgeprägter ist als bisher angenommen wurde. Es existiert eine hohe Dunkelziffer an derartigen Fällen, weshalb die Evolution der diagnostischen Methoden eine enorme Relevanz aufweist. Möglicherweise ist in diesem Zusammenhang sogar eine kritische Betrachtung des international renommierten Diamant-Konzepts (siehe Tabelle 3) erforderlich. Wie umfangreich die Quote an Infektpseudarthrosen wirklich ist, wird sich durch zukünftige Forschungsergebnisse zeigen.

## Literaturverzeichnis

1. Hinnenkamp H, Lück M, Brenscheidt S. Unfallstatistik 2015. Unfalltote und Unfallverletzte 2015 in Deutschland. Dortmund: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA); 2017.
2. Saß A, Varnaccia G, Rommel A. Sturzunfälle in Deutschland. Faktenblatt zu GEDA 2010: Ergebnisse der Studie: "Gesundheit in Deutschland aktuell 2010". Berlin: Robert Koch-Institut; 2016.
3. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P. Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie. 7. überarbeitete Auflage: Georg Thieme Verlag KG; 2014:302-322.
4. Court-Brown CM, Caesar B. Epidemiology of adult fractures: A review. *Injury* 2006;37:691-7.
5. AO Trauma. AO/OTA Fracture and Dislocation Classification Compendium 2018 Revisions. Switzerland: AO Foundation; 2017:1-24.
6. AO Trauma. Müller AO Classification of Fractures – Long Bones. AO Foundation; 2010:1-10.
7. Kellam JF, Meinberg EG, Agel J, Karam MD, Roberts CS. Introduction: Fracture and Dislocation Classification Compendium-2018: International Comprehensive Classification of Fractures and Dislocations Committee. *Journal of orthopaedic trauma* 2018;32 Suppl 1:S1-s10.
8. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 2007;38 Suppl 4:S3-6.
9. Rausch V, Seybold D, Königshausen M, Koller M, Schildhauer TA, Gessmann J. [Basic principles of fracture healing]. *Der Orthopäde* 2017;46:640-7.
10. Everding J, Roßlenbroich S, Raschke MJ. Ultraschall und Stoßwelle in der Pseudarthrosentherapie: Sinnvoll oder nicht und wann? *Trauma und Berufskrankheit* 2017;19:260–6.
11. Ruter A, Mayr E. [Pseudarthrosis]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 1999;70:1239-45.
12. Miska M, Schmidmaier G, Weber M-A. Bildgebung bei fehlender Frakturheilung/Pseudarthrosen. *Kompodium Orthopädische Bildgebung*: Springer-Verlag GmbH Deutschland; 2017 411-26.
13. Rössler H, Rütther W, Steinhagen J. Orthopädie und Unfallchirurgie. 19. Auflage: Elsevier Urban & Fischer Verlag; 2005:200-204.
14. Calori GM, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L. Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury* 2007;38 Suppl 2:S11-8.
15. Bizarro J, Regazzoni P. Principles of fracture fixation. *AO Trauma*; 2016:1-12.
16. Calori GM, Phillips M, Jeetle S, Tagliabue L, Giannoudis PV. Classification of non-union: need for a new scoring system? *Injury* 2008;39 Suppl 2:S59-63.
17. Rüedi T, Buckley RE, Moran CG. Reposition, Zugänge und Osteosynthesetechniken. *AO Prinzipien des Frakturenmanagements*: Georg Thieme Verlag KG; 2008:228-33.
18. Calori GM, Mazza EL, Mazzola S, Colombo A, Giardina F, Romano F, Colombo M. Non-unions. Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases 2017;14:186-8.
19. Raschke MJ, Gasch A. Verzögerte Frakturheilung: Möglichkeiten des Operateurs. *Trauma und Berufskrankheit* 2012;14:85–9.
20. Josten C, Schmidt C. [Postoperative complications in trauma surgery]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2009;80:790-806.

21. Bishop JA, Palanca AA, Bellino MJ, Lowenberg DW. Assessment of compromised fracture healing. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2012;20:273-82.
22. Steinhausen E, Glombitza M, Bohm HJ, Hax PM, Rixen D. [Non-unions. From diagnosis to healing]. *Der Unfallchirurg* 2013;116:633-47; quiz 48-9.
23. Everding J, Rosslenbroich S, Raschke MJ. [Pseudarthroses of the long bones]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2018;89:73-88.
24. Täger G, Hilger F, Seifritz U, Podleska L. Knochenaugmentation bei hypo- und atrophischen Pseudarthrosen. *Trauma und Berufskrankheit* 2016;18:203-7.
25. Rollo G, Pichierri P, Marsilio A, Filipponi M, Bisaccia M, Meccariello L. The challenge of nonunion after osteosynthesis of the clavicle: is it a biomechanical or infection problem? *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases* 2017;14:372-8.
26. Mills LA, Aitken SA, Simpson A. The risk of non-union per fracture: current myths and revised figures from a population of over 4 million adults. *Acta orthopaedica* 2017;88:434-9.
27. Steinhausen E. Low-Grade-Infekt. Muss jede Pseudarthrose biopsiert werden? *Trauma und Berufskrankheit* 2017;19:267-71.
28. Grechenig S, Pfeifer C, Krutsch W, Hilber F, Nerlich M, Berner A. [Complication management for failed bone fracture healing: pseudarthrosis]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2015;86:919-24.
29. Schmidmaier G, Moghaddam A. [Long Bone Nonunion]. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 2015;153:659-74; quiz 75-6.
30. Meiners J, Gerlach U, Magerlein S, Jurgens C, Faschingbauer M. [Pseudo-arthroses]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2009;80:979-86.
31. Palmer MP, Altman DT, Altman GT, Sewecke JJ, Ehrlich GD, Hu FZ, Nistico L, Melton-Kreft R, Gause TM, 3rd, Costerton JW. Can we trust intraoperative culture results in nonunions? *Journal of orthopaedic trauma* 2014;28:384-90.
32. Raschke MJ, Roßlenbroich S, Everding J. Pseudarthrosen: Immer 6 Monate warten oder muss früher etwas passieren? *Trauma und Berufskrankheit* 2017;19:255–9.
33. Antonova E, Le TK, Burge R, Mershon J. Tibia shaft fractures: costly burden of nonunions. *BMC musculoskeletal disorders* 2013;14:42.
34. Jain AK, Sinha S. Infected nonunion of the long bones. *Clinical orthopaedics and related research* 2005:57-65.
35. Tonnesen PA, Heerfordt J, Pers M. 150 open fractures of the tibial shaft--the relation between necrosis of the skin and delayed union. *Acta orthopaedica Scandinavica* 1975;46:823-35.
36. Santolini E, West R, Giannoudis PV. Risk factors for long bone fracture non-union: a stratification approach based on the level of the existing scientific evidence. *Injury* 2015;46 Suppl 8:S8-s19.
37. Copuroglu C, Calori GM, Giannoudis PV. Fracture non-union: who is at risk? *Injury* 2013;44:1379-82.
38. Panteli M, Pountos I, Jones E, Giannoudis PV. Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights. *Journal of cellular and molecular medicine* 2015;19:685-713.
39. Schütz L. Pseudarthrosen am Humerusschaft. *Trauma und Berufskrankheit* 2016;18:189–92.
40. Runkel M, Rommens PM. [Pseudoarthrosis]. *Der Unfallchirurg* 2000;103:51-63.

41. van Basten Batenburg M, Houben IB, Blokhuis TJ. The Non-Union Scoring System: an interobserver reliability study. *European journal of trauma and emergency surgery : official publication of the European Trauma Society* 2017.
42. Reed AA, Joyner CJ, Brownlow HC, Simpson AH. Human atrophic fracture non-unions are not avascular. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2002;20:593-9.
43. Paley D, Catagni MA, Argnani F, Villa A, Benedetti GB, Cattaneo R. Ilizarov treatment of tibial nonunions with bone loss. *Clinical orthopaedics and related research* 1989:146-65.
44. Militz M, Hackl S, Hungerer S, Öhlbauer M, Bühren V. Infektpseudarthrosen: Wann werden wir aktiv? *Trauma und Berufskrankheit* 2014;16:444–51.
45. Cierny G, 3rd, Mader JT, Penninck JJ. A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Clinical orthopaedics and related research* 2003:7-24.
46. Calori GM, Colombo M, Mazza EL, Mazzola S, Malagoli E, Marelli N, Corradi A. Validation of the Non-Union Scoring System in 300 long bone non-unions. *Injury* 2014;45 Suppl 6:S93-7.
47. Wang S, Yin P, Quan C, Khan K, Wang G, Wang L, Cui L, Zhang L, Zhang L, Tang P. Evaluating the Use of Serum Inflammatory Markers for Preoperative Diagnosis of Infection in Patients with Nonunions. *BioMed research international* 2017;2017:9146317.
48. Simpson AH, Wood MK, Athanasou NA. Histological assessment of the presence or absence of infection in fracture non-union. *Injury* 2002;33:151-5.
49. Krappinger D, Lindtner RA, Zegg M, Dal Pont A, Huber B. [Masquelet technique for the treatment of large dia- and metaphyseal bone defects]. *Operative Orthopädie und Traumatologie* 2015;27:357-68.
50. Everding J, Freistuhler M, Stolberg-Stolberg J, Raschke MJ, Garcia P. [Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of pseudarthrosis : New experiences with an old technology]. *Der Unfallchirurg* 2017;120:969-78.
51. Cacchio A, Giordano L, Colafarina O, Rompe JD, Tavernese E, Ioppolo F, Flamini S, Spacca G, Santilli V. Extracorporeal shock-wave therapy compared with surgery for hypertrophic long-bone nonunions. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2009;91:2589-97.
52. Schofer MD, Block JE, Aigner J, Schmelz A. Improved healing response in delayed unions of the tibia with low-intensity pulsed ultrasound: results of a randomized sham-controlled trial. *BMC musculoskeletal disorders* 2010;11:229.
53. Leighton R, Watson JT, Giannoudis P, Papakostidis C, Harrison A, Steen RG. Healing of fracture nonunions treated with low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS): A systematic review and meta-analysis. *Injury* 2017;48:1339-47.
54. Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. The diamond concept--open questions. *Injury* 2008;39 Suppl 2:S5-8.
55. Calori GM, Giannoudis PV. Enhancement of fracture healing with the diamond concept: the role of the biological chamber. *Injury* 2011;42:1191-3.
56. Renz N, Feihl S, Dlaska CE, Schutz MA, Trampuz A. [Osteosynthesis-associated infections : Epidemiology, definition and diagnosis]. *Der Unfallchirurg* 2017;120:454-60.
57. Darouiche RO. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2001;33:1567-72.
58. Renz N, Muller M, Perka C, Trampuz A. [Implant-associated infections - Diagnostics]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2016;87:813-21.
59. Borens O, Helmy N. [Infected osteosynthesis]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2016;87:822-30.

60. Zimmerli W. [Orthopaedic implant-associated infections: Update of antimicrobial therapy]. *Der Orthopade* 2015;44:961-6.
61. Scheuermann-Poley C, Wagner C, Hoffmann J, Moter A, Willy C. [The significance of biofilm for the treatment of infections in orthopedic surgery : 2017 Update]. *Der Unfallchirurg* 2017;120:461-71.
62. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science (New York, NY)* 1987;237:1588-95.
63. Geipel U, Herrmann M. [The infected implant. Part 1: bacteriology]. *Der Orthopade* 2004;33:1411-26; 27-8.
64. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet (London, England)* 2001;358:135-8.
65. Li YH, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel, Switzerland)* 2012;12:2519-38.
66. Aparna MS, Yadav S. Biofilms: microbes and disease. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 2008;12:526-30.
67. Kleber C, Schaser KD, Trampuz A. [Complication management of infected osteosynthesis: Therapy algorithm for peri-implant infections]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2015;86:925-34.
68. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, NY)* 1999;284:1318-22.
69. Dresing K. [Infections in trauma and orthopedic surgery]. *Operative Orthopädie und Traumatologie* 2013;25:220-4.
70. McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirtliff M, Kathju S, Stoodley P. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future microbiology* 2014;9:987-1007.
71. Hoiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, Hall-Stoodley L, Høla V, Imbert C, Kirketerp-Møller K, Lebeaux D, Oliver A, Ullmann AJ, Williams C. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2015;21 Suppl 1:S1-25.
72. Kriegsmann J, Hopf T, Jacobs D, Arens N, Krenn V, Schmitt-Wiedhoff R, Kriegsmann M, Heisel C, Biehl C, Thabe H, Schmitz RP, Lehmann M, Otto M. [Applications of molecular pathology in the diagnosis of joint infections]. *Der Orthopade* 2009;38:531-8.
73. Renz N, Cabric S, Janz V, Trampuz A. [Sonication in the diagnosis of periprosthetic infections : Significance and practical implementation]. *Der Orthopade* 2015;44:942-5.
74. Mayer J, Reischl U, Jilg W. Klinische Bedeutung der Polymerase-Kettenreaktion in der Infektiologie. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (DMW)* 1994;119:1625-9.
75. Volkenandt M, Löhr M, Dicker AP. Genamplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (DMW)* 1990;115:670-6.
76. Gallo J, Raska M, Dendis M, Florschütz AV, Kolar M. Molecular diagnosis of prosthetic joint infection. A review of evidence. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 2004;148:123-9.
77. Trampuz A, Steckelberg JM, Osmon DR, Cockerill FR, Hanssen AD, Patel R. Advances in the laboratory diagnosis of prosthetic joint infection. *Reviews in Medical Microbiology* 2003;14:1-14.
78. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie: Georg Thieme Verlag KG*; 2006:492-493.

79. Radstrom P, Backman A, Qian N, Kraghsbjerg P, Pahlson C, Olcen P. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and streptococci using a seminested PCR strategy. *Journal of clinical microbiology* 1994;32:2738-44.
80. Ni H, Knight AI, Cartwright K, Palmer WH, McFadden J. Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. *Lancet (London, England)* 1992;340:1432-4.
81. Benslimani A, Fenollar F, Lepidi H, Raoult D. Bacterial zoonoses and infective endocarditis, Algeria. *Emerging infectious diseases* 2005;11:216-24.
82. Goldenberger D, Kunzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *Journal of clinical microbiology* 1997;35:2733-9.
83. Bemmer P, Plouzeau C, Tande D, Leger J, Giraudeau B, Valentin AS, Jolivet-Gougeon A, Vincent P, Corvec S, Gibaud S, Juvin ME, Hery-Arnaud G, Lemarie C, Kempf M, Bret L, Quentin R, Coffre C, de Pinieux G, Bernard L, Burucoa C. Evaluation of 16S rRNA gene PCR sensitivity and specificity for diagnosis of prosthetic joint infection: a prospective multicenter cross-sectional study. *Journal of clinical microbiology* 2014;52:3583-9.
84. Gille J, Wallstabe S, Schulz AP, Paech A, Gerlach U. Is non-union of tibial shaft fractures due to nonculturable bacterial pathogens? A clinical investigation using PCR and culture techniques. *Journal of orthopaedic surgery and research* 2012;7:20.
85. Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *The International journal of artificial organs* 2012;35:923-34.
86. Charité - Universitätsmedizin Berlin. Neufassung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis vom 20.06.2012 (AMB Charité Nr. 092, S. 658). In: Charité - Universitätsmedizin Berlin. 10117 Berlin, Deutschland.  
[https://www.charite.de/fileadmin/user\\_upload/portal/charite/presse/publikationen/amtl-mitteilungsblatt/2018/AMB180329-208.pdf](https://www.charite.de/fileadmin/user_upload/portal/charite/presse/publikationen/amtl-mitteilungsblatt/2018/AMB180329-208.pdf) (letzter Zugriff: 05.05.2018, 13:41 Uhr). 2018:1791-800.
87. Curetis GmbH. Handbuch Unyvero: ITI Implant & Tissue Infection Anwendung. Art. Nr. 00208 Rev. 4.0. D-71088 Holzgerlingen, Germany 2016:2-66.
88. Curetis AG. Handbuch Unyvero™ System. Art. Nr. 00146 V3.0. D-71088 Holzgerlingen, Germany 2014.
89. Lausmann C, Zahar A, Citak M, Branes J, Schmidl S, Frommelt L, Gehrke T, Gebauer M. Are There Benefits In Early Diagnosis Of Prosthetic Joint Infection With Multiplex Polymerase Chain Reaction? *Journal of bone and joint infection* 2017;2:175-83.
90. Curetis GmbH. Unyvero ITI Implant & Tissue Infection Application. In: Curetis GmbH. D-71088 Holzgerlingen, Germany.  
[http://www.unyvero.com/fileadmin/Dokumente/Unyvero/Download/Broschueren/000201\\_Unyvero\\_ITI\\_Brochure\\_EN\\_Rev\\_3.pdf](http://www.unyvero.com/fileadmin/Dokumente/Unyvero/Download/Broschueren/000201_Unyvero_ITI_Brochure_EN_Rev_3.pdf) (letzter Zugriff: 29.11.2017, 18:36 Uhr).
91. Luedke G, Barth S, Klein M, Motejadded H, Thiel R, Brenner M, Thews A, Boos A. Curetis Unyvero™ System – A New Molecular Device for the Rapid Detection of Microorganisms and Antibiotic Resistance Genes. In: Curetis GmbH. D-71088 Holzgerlingen, Germany 2014.
92. Curetis AG. Unyvero System. In: Curetis GmbH. D-71088 Holzgerlingen, Germany.  
[http://www.unyvero.com/fileadmin/Dokumente/Unyvero/Download/Broschueren/00125\\_UnyveroSystemBrochureV4.pdf](http://www.unyvero.com/fileadmin/Dokumente/Unyvero/Download/Broschueren/00125_UnyveroSystemBrochureV4.pdf) (letzter Zugriff: 29.11.2017, 18:41 Uhr).
93. Janz V, Trampuz A, Perka CF, Wassilew GI. Reduced culture time and improved isolation rate through culture of sonicate fluid in blood culture bottles. *Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine* 2017;25:635-40.

94. Janz V, Wassilew GI, Hasart O, Matziolis G, Tohtz S, Perka C. Evaluation of sonicate fluid cultures in comparison to histological analysis of the periprosthetic membrane for the detection of periprosthetic joint infection. *International orthopaedics* 2013;37:931-6.
95. BANDELIN electronic GmbH & Co. KG. BactoSonic – Ultraschall-Spezialgerät zur schonenden Ablösung von Biofilmen. In: BANDELIN electronic GmbH & Co. KG. 12207 Berlin, Deutschland.2016:1.
96. Morawietz L, Gehrke T, Classen RA, Barden B, Otto M, Hansen T, Aigner T, Stiehl P, Neidel J, Schroder JH, Frommelt L, Schubert T, Meyer-Scholten C, König A, Strobel P, Rader Ch P, Kirschner S, Lintner F, Ruther W, Skwara A, Bos I, Kriegsmann J, Krenn V. [Proposal for the classification of the periprosthetic membrane from loosened hip and knee endoprostheses]. *Der Pathologe* 2004;25:375-84.
97. Krenn V, Morawietz L, Jakobs M, Kienapfel H, Ascherl R, Bause L, Kuhn H, Matziolis G, Skutek M, Gehrke T. [Joint endoprosthesis pathology. Histopathological diagnostics and classification]. *Der Pathologe* 2011;32:210-9.
98. Morawietz L, Classen RA, Schroder 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, Strobel P, Rader CP, Kirschner S, Lintner F, Ruther W, Bos I, Hendrich C, Kriegsmann J, Krenn V. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *Journal of clinical pathology* 2006;59:591-7.
99. Krenn VT, Liebisch M, Kolbel B, Renz N, Gehrke T, Huber M, Krukemeyer MG, Trampuz A, Resch H, Krenn V. CD15 focus score: Infection diagnosis and stratification into low-virulence and high-virulence microbial pathogens in periprosthetic joint infection. *Pathology, research and practice* 2017;213:541-7.
100. Hof H, Dörries R. *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*. 3. komplett überarbeitete und erweiterte Auflage: Georg Thieme Verlag KG; 2005:297-306.
101. Borde JP, Hacker GA, Guschl S, Serr A, Danner T, Hubner J, Burrack-Lange S, Ludke G, Helwig P, Hauschild O, Kern WV. Diagnosis of prosthetic joint infections using UMD-Universal Kit and the automated multiplex-PCR Unyvero i60 ITI((R)) cartridge system: a pilot study. *Infection* 2015;43:551-60.
102. Megas P, Saridis A, Kouzelis A, Kallivokas A, Mylonas S, Tyllianakis M. The treatment of infected nonunion of the tibia following intramedullary nailing by the Ilizarov method. *Injury* 2010;41:294-9.
103. Patzakis MJ, Zalavras CG. Chronic posttraumatic osteomyelitis and infected nonunion of the tibia: current management concepts. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2005;13:417-27.
104. Wu CC. Single-stage surgical treatment of infected nonunion of the distal tibia. *Journal of orthopaedic trauma* 2011;25:156-61.
105. Renz N, Cabric S, Morgenstern C, Schuetz MA, Trampuz A. Value of PCR in sonication fluid for the diagnosis of orthopedic hardware-associated infections: Has the molecular era arrived? *Injury* 2018.
106. Dapunt U, Spranger O, Gantz S, Burckhardt I, Zimmermann S, Schmidmaier G, Moghaddam A. Are atrophic long-bone nonunions associated with low-grade infections? *Therapeutics and clinical risk management* 2015;11:1843-52.
107. Gausden EB, Villa J, Warner SJ, Redko M, Pearle A, Miller A, Henry M, Lorch DG, Helfet DL, Wellman DS. Nonunion After Clavicle Osteosynthesis: High Incidence of *Propionibacterium acnes*. *Journal of orthopaedic trauma* 2017;31:229-35.
108. Olszewski D, Streubel PN, Stucken C, Ricci WM, Hoffmann MF, Jones CB, Sietsema DL, Tornetta P, 3rd. Fate of Patients With a "Surprise" Positive Culture After Nonunion Surgery. *Journal of orthopaedic trauma* 2016;30:e19-23.

109. Amorosa LF, Buirs LD, Bexkens R, Wellman DS, Kloen P, Lorich DG, Helfet DL. A single-stage treatment protocol for presumptive aseptic diaphyseal nonunions: a review of outcomes. *Journal of orthopaedic trauma* 2013;27:582-6.
110. Qu X, Zhai Z, Li H, Li H, Liu X, Zhu Z, Wang Y, Liu G, Dai K. PCR-based diagnosis of prosthetic joint infection. *Journal of clinical microbiology* 2013;51:2742-6.
111. Li Z, Yu A. Diagnostic value of a PCR-based technique for prosthetic joint infection. *Journal of clinical microbiology* 2014;52:2281-2.
112. Melendez DP, Greenwood-Quaintance KE, Berbari EF, Osmon DR, Mandrekar JN, Hanssen AD, Patel R. Evaluation of a Genus- and Group-Specific Rapid PCR Assay Panel on Synovial Fluid for Diagnosis of Prosthetic Knee Infection. *Journal of clinical microbiology* 2016;54:120-6.
113. Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wust J, Trampuz A. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *Journal of clinical microbiology* 2010;48:1208-14.
114. Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *Journal of clinical microbiology* 2006;44:1018-28.
115. Panousis K, Grigoris P, Butcher I, Rana B, Reilly JH, Hamblen DL. Poor predictive value of broad-range PCR for the detection of arthroplasty infection in 92 cases. *Acta orthopaedica* 2005;76:341-6.
116. Portillo ME, Salvado M, Sorli L, Alier A, Martinez S, Trampuz A, Gomez J, Puig L, Horcajada JP. Multiplex PCR of sonication fluid accurately differentiates between prosthetic joint infection and aseptic failure. *The Journal of infection* 2012;65:541-8.
117. Vandercam B, Jeumont S, Cornu O, Yombi JC, Lecouvet F, Lefevre P, Irengue LM, Gala JL. Amplification-based DNA analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2008;10:537-43.
118. Gomez E, Cazanave C, Cunningham SA, Greenwood-Quaintance KE, Steckelberg JM, Uhl JR, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Osmon DR, Berbari EF, Mandrekar J, Patel R. Prosthetic joint infection diagnosis using broad-range PCR of biofilms dislodged from knee and hip arthroplasty surfaces using sonication. *Journal of clinical microbiology* 2012;50:3501-8.
119. Renz N, Feihl S, Cabric S, Trampuz A. Performance of automated multiplex PCR using sonication fluid for diagnosis of periprosthetic joint infection: a prospective cohort. *Infection* 2017;45:877-84.
120. Suda AJ, Tinelli M, Beisemann ND, Weil Y, Khoury A, Bischel OE. Diagnosis of periprosthetic joint infection using alpha-defensin test or multiplex-PCR: ideal diagnostic test still not found. *International orthopaedics* 2017;41:1307-13.
121. Ryu SY, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Mandrekar JN, Patel R. Low sensitivity of periprosthetic tissue PCR for prosthetic knee infection diagnosis. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2014;79:448-53.
122. Malandain D, Bemer P, Leroy AG, Leger J, Plouzeau C, Valentin AS, Jolivet-Gougeon A, Tande D, Hery-Arnaud G, Lemarie C, Kempf M, Bret L, Burucoa C, Corvec S. Assessment of the automated multiplex-PCR Unyvero i60 ITI((R)) cartridge system to diagnose prosthetic joint infection: a multicentre study. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2018;24:83.e1-e6.
123. Villa F, Toscano M, De Vecchi E, Bortolin M, Drago L. Reliability of a multiplex PCR system for diagnosis of early and late prosthetic joint infections before and after broth enrichment. *International journal of medical microbiology : IJMM* 2017;307:363-70.

124. Prieto-Borja L, Rodriguez-Sevilla G, Aunon A, Perez-Jorge C, Sandoval E, Garcia-Canete J, Gadea I, Fernandez-Roblas R, Blanco A, Esteban J. Evaluation of a commercial multiplex PCR (Unyvero i60((R))) designed for the diagnosis of bone and joint infections using prosthetic-joint sonication. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* 2017;35:236-42.
125. Hischebeth GT, Randau TM, Buhr JK, Wimmer MD, Hoerauf A, Molitor E, Bekeredjian-Ding I, Gravius S. Unyvero i60 implant and tissue infection (ITI) multiplex PCR system in diagnosing periprosthetic joint infection. *Journal of microbiological methods* 2016;121:27-32.
126. Liu H, Zhang Y, Li L, Zou HC. The application of sonication in diagnosis of periprosthetic joint infection. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2017;36:1-9.
127. Zhai Z, Li H, Qin A, Liu G, Liu X, Wu C, Li H, Zhu Z, Qu X, Dai K. Meta-analysis of sonication fluid samples from prosthetic components for diagnosis of infection after total joint arthroplasty. *Journal of clinical microbiology* 2014;52:1730-6.
128. Trampuz A, Piper KE, Hanssen AD, Osmon DR, Cockerill FR, Steckelberg JM, Patel R. Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination. *Journal of clinical microbiology* 2006;44:628-31.
129. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greenleaf JF, Patel R. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *The New England journal of medicine* 2007;357:654-63.
130. Ludemann CM, Schutze N, Rudert M. [Diagnosis of periprosthetic hip infections]. *Operative Orthopädie und Traumatologie* 2015;27:237-50; quiz 51.
131. Puig-Verdie L, Alentorn-Geli E, Gonzalez-Cuevas A, Sorli L, Salvado M, Alier A, Pelfort X, Portillo ME, Horcajada JP. Implant sonication increases the diagnostic accuracy of infection in patients with delayed, but not early, orthopaedic implant failure. *The bone & joint journal* 2013;95-b:244-9.
132. Esteban J, Alonso-Rodriguez N, del-Prado G, Ortiz-Perez A, Molina-Manso D, Cordero-Ampuero J, Sandoval E, Fernandez-Roblas R, Gomez-Barrena E. PCR-hybridization after sonication improves diagnosis of implant-related infection. *Acta orthopaedica* 2012;83:299-304.
133. Kanakaris NK, Tosounidis TH, Giannoudis PV. Surgical management of infected non-unions: An update. *Injury* 2015;46 Suppl 5:S25-32.
134. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DW, Simpson H, Peto TE, McLardy-Smith P, Berendt AR. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *Journal of clinical microbiology* 1998;36:2932-9.
135. Holzmann T, Schneider-Brachert W. [Microbiological diagnosis of periprosthetic joint infections]. *Der Orthopäde* 2015;44:344-8.
136. Kolbel B, Wienert S, Dimitriadis J, Kendoff D, Gehrke T, Huber M, Frommelt L, Tiemann A, Saeger K, Krenn V. [CD15 focus score for diagnostics of periprosthetic joint infections : Neutrophilic granulocytes quantification mode and the development of morphometric software (CD15 quantifier)]. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2015;74:622-30.
137. Renz N, Trampuz A. Periprosthetische Infektionen: aktueller Stand der Diagnostik und Therapie. *Orthopädie & Rheuma* 2015;18:20 - 8.
138. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *The New England journal of medicine* 2004;351:1645-54.

139. Zimmerli W. [Implant infections. What must an internist know?]. *Der Internist* 2005;46:652-8.
140. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss medical weekly* 2005;135:243-51.
141. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhave A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *Lancet (London, England)* 2016;387:386-94.
142. Parvizi J, Gehrke T, Chen AF. Proceedings of the International Consensus on Periprosthetic Joint Infection. *The bone & joint journal* 2013;95-b:1450-2.
143. Parvizi J, Gehrke T. Definition of periprosthetic joint infection. *The Journal of arthroplasty* 2014;29:1331.
144. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF). Angemeldetes Leitlinienvorhaben: Posttraumatische Pseudarthrose. <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/anmeldung/1/1/012-030.html> (letzter Zugriff: 31.07.2018, 20:46 Uhr).

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marcus Nitzsche, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema Infektionsdiagnostik bei Pseudarthrose – Eine Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 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](http://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 StGB) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Marcus Nitzsche: Infektionsdiagnostik bei Pseudarthrose – Eine Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

## Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Marcus Nitzsche hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

entfällt beziehungsweise aktuell keine existent

Eine Publikation zu dieser Promotionsarbeit im Rahmen der klinischen Studie ist geplant.

---

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

---

Unterschrift Marcus Nitzsche

Marcus Nitzsche: Infektionsdiagnostik bei Pseudarthrose – Eine Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Publikationsliste

## Publikationsliste

entfällt beziehungsweise aktuell keine existent

## Lebenslauf

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

## Danksagung

Zunächst gilt mein Dank PD Dr. med. Sven Märdian, Kommissarischer Geschäftsführender Direktor und Sektionsleiter für Traumatologie und Tumorchirurgie am Charité Campus Virchow-Klinikum (CVK), für die Vergabe und Organisation dieser Promotionsarbeit als Teil des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie (CMSC) der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch Dr. med. Viktor Janz würdigen, welcher als Zweitbetreuer in allen Aspekten mein primärer Ansprechpartner war. Insbesondere bin ich ihm für die Unterstützung bei aufgetretenen Fragen im Rahmen der Arbeit dankbar.

Ich danke beiden ausdrücklich dafür, dass sie mir das Vertrauen für die Durchführung dieses Projekts gegeben haben und mir dadurch die Promotionsarbeit überhaupt ermöglichten.

Ebenfalls hervorzuheben ist die Forschungsgruppe „Infizierte Implantate“ unter der Leitung von PD Dr. med. Andrej Trampuz vom Berlin-Brandenburg Centrum für Regenerative Therapien (BCRT), welche mir das notwendige Messgerät für die Polymerase-Kettenreaktionsanalyse sowie die Laborräume zur Probenbearbeitung zur Verfügung stellten. Ein besonderer Dank gilt dabei seinen Kolleginnen Anna Kolizak sowie Mariagrazia Di Luca, die mich in die Räumlichkeiten, Arbeitsmethoden, Sicherheitsmaßnahmen und den Umgang mit dem Laborgerät einwiesen.

Zudem darf meine Familie nicht unerwähnt bleiben, bei der ich mich abschließend dafür bedanken möchte, dass sie mich uneingeschränkt in allen Phasen meines Lebens, insbesondere jedoch in Vorbereitung auf das Studium und im Rahmen dieser Promotionsarbeit, unterstützt hat. Ohne ihren Rückhalt wäre dieser Weg wahrscheinlich nicht möglich gewesen. Danke!