

Aus der Klinik für Chirurgie des Stütz- und Bewegungsapparates

- Sektion für Unfallchirurgie -

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Jürgens

**Die 16S rRNA-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Erregernachweis
bei kulturell aseptischen Tibiapseudarthrosen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Stefan Bark

aus Lübeck

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Justus Gille

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Michael Reppel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2013

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.10.2013

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung.....	9
2. Grundlagen.....	11
2.1 Definition, Klassifikation und Ursachen von Pseudarthrosen	11
2.1.1 Definition	11
2.1.2 Klassifikation	11
2.1.3 Ursachen.....	12
2.1.3.1 Biologische Ursachen.....	14
2.1.3.2 Mechanische Ursachen	14
2.1.3.3 Infektiöse Ursachen.....	15
2.2 Diagnostik von Pseudarthrosen	17
2.2.1 Klinische Diagnostik	17
2.2.2 Bildgebende Diagnostik.....	19
2.2.3 Mikrobiologische und histologische Diagnostik	21
2.3 Die Tibiaschaftfraktur.....	22
2.4 Die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	23
2.4.1 Grundlagen.....	23
2.4.2 Die 16S rRNA-Gensequenzierung.....	24
3. Material und Methoden	26
3.1 Patientenkollektiv und Studiendesign.....	26
3.2 Operatives Vorgehen	27
3.3 Mikro- und molekularbiologische Methoden.....	28
3.3.1 Bakterien-Kultur.....	28
3.3.2 DNA-Isolation	28
3.3.3 16S rRNA-PCR und -Gensequenzierung.....	29
3.3.4 PDH-PCR.....	30
3.4 Datenerhebung	31
3.4.1 Allgemeine Daten	31
3.4.1.1 AO-Klassifikation geschlossener Frakturen langer Röhrenknochen.....	32
3.4.1.2 Klassifikation offener Frakturen nach Gustilo.....	33
3.4.1.3 Klassifikation der Weichteilschäden geschlossener Frakturen nach Tscherne	33

3.4.2 Scores und klinische Nachuntersuchung	34
3.4.3 Radiologische Nachuntersuchung	35
3.4.4 Statistik.....	35
4. Ergebnisse.....	37
4.1 Bakterien-Kultur und PCR.....	37
4.1.1 Pseudarthrosen-Gruppe	37
4.1.2 Kontroll-Gruppe	37
4.2 Präoperative Daten der Pseudarthrosen- und Kontroll-Gruppe	37
4.2.1 Patientenkollektiv.....	38
4.2.2 Laborergebnisse.....	39
4.2.3 Klassifikation der Frakturen sowie des Weichteiltraumas.....	41
4.2.3.1 AO-Klassifikation	41
4.2.3.2 Offene und geschlossene Frakturen	42
4.2.3.3 Klassifikation der offenen Frakturen nach Gustilo	42
4.2.3.4 Klassifikation der geschlossenen Frakturen nach Tscherne	43
4.2.4 Initiale osteosynthetische Versorgung der Frakturen	44
4.2.5 Operative Pseudarthrosenrevision.....	45
4.2.6 Krankheitsverlauf.....	46
4.3 Nachuntersuchung.....	47
4.3.1 Gesamtscore in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O´Beirne.....	47
4.3.2 Gesamtscore Merchant und Dietz	49
4.3.3 Beweglichkeit des Kniegelenkes sowie Sprunggelenkes	51
4.3.4 Beinlängenverkürzung.....	53
4.3.5 Arbeitsfähigkeit.....	54
4.3.6 Radiologische Durchbauung.....	54
5. Diskussion	56
5.1 Patientenkollektiv.....	57
5.2 Material und Methoden	60
5.3 Ergebnisse.....	62
5.3.1 PCR.....	62
5.3.2 Nachuntersuchungsergebnisse	66

6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis.....	71
8. Anhang	80
8.1 Score nach Merchant und Dietz	80
8.2 Score in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O´Beirne	81
8.3 Verwendete Materialien	82
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	83
9.1 Abbildungsverzeichnis	83
9.2 Tabellenverzeichnis	84
10. Danksagung	85
11. Lebenslauf	86

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
cm ³	Kubikzentimeter
H ₂ O	Wasser
Abb.	Abbildung
AO	Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese
Asp	Aspartat
BMP	Bone morphogenetic protein
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et altera
Fa.	Firma
ggf.	gegebenenfalls
Gly	Glycin
IGF	Insulin-like growth factor
ml	Milliliter
o.g.	oben genannt
OSG	oberes Sprunggelenk
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PSA	Pseudarthrose
RNA	Ribonukleinsäure
sog.	so genannt
Staph.	Staphylokokkus

USG	Unteres Sprunggelenk
u.v.m.	und viele mehr
u.U.	unter Umständen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung und Fragestellung

Pseudarthrosen stellen trotz zunehmender Fortschritte in Diagnostik und Therapie ein großes Problem für jeden Unfallchirurgen, operativ tätigen Orthopäden und nicht zuletzt die betroffenen Patienten dar. Von einer Pseudarthrose wird gesprochen, wenn 6 Monate nach initialen Trauma die knöcherne Konsolidierung einer Fraktur bzw. Osteotomie ausbleibt [119].

Mit einer Inzidenz von bis zu 5% nach elektiven Eingriffen, wie z.B. Osteotomien und bis zu 10% nach operativer Frakturbehandlung, ist die Rate dieser sog. „Falschgelenke“ als hoch einzustufen [68, 83]. Bei Patienten mit bekannten Risikofaktoren für eine ausbleibende Frakturheilung (z.B. Diabetes mellitus [66], Nikotinabusus [60]) kann die Rate auf über 30% ansteigen [90]. Gerade im berufsgenossenschaftlichen Heilverfahren stellen Pseudarthrosen und deren Therapie einen nicht zu unterschätzenden Kostenfaktor dar, da Patienten mit dieser Heilungsstörung einen erheblichen Anteil am Patientenkollektiv in berufsgenossenschaftlichen Unfallkliniken ausmachen [57]. Berücksichtigt man die Arbeitsausfallzeiten und die folgenden Kompensationsleistungen liegen die Kosten im Rahmen von Knochenbruchheilungsstörungen im 9-stelligen Bereich [36].

Am häufigsten finden sich Pseudarthrosen an der diaphysären Tibia [23, 52]. Das ist zum einen der Tatsache geschuldet, dass die Fraktur des Unterschenkels den häufigsten Knochenbruch der unteren Extremität darstellt und zum anderen den ungünstigen Weichteilverhältnissen dieser Region [38]. Der Unterscheidung zwischen aseptischen und septischen (infizierten) Pseudarthrosen kommt dabei eine entscheidende Rolle in Hinblick auf die weitere Therapieplanung zu [45].

Eine komplexe Form der Knochenbruchheilungsstörung stellt die infekt-assoziierte Pseudarthrose dar. Das diagnostische Standardverfahren zum Nachweis bakterieller Erreger im Rahmen dieses septischen Geschehens ist die mikroskopische Untersuchung des Gewebes sowie die Anfertigung einer Bakterienkultur. Allerdings wird diesen Verfahren eine niedrige Sensitivität angelastet [29]. Gerade im Fall von Low-grade-Infektionen ist der kulturelle

Nachweis von Bakterien häufig nicht oder nur sehr schwer möglich [58, 124]. Im Rahmen der Primärversorgung von Tibiafrakturen konnte bereits der Nachweis bakterieller DNA mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. PCR) in Fällen negativer Kulturen erbracht werden [107]. Dabei besticht die Methode der PCR mit einer hohen Sensitivität und Spezifität in Hinblick auf die Detektion bakterieller DNA [30]. Es wird daher postuliert, dass die diagnostische Lücke in Fällen negativer Kulturen mittels einer bakterienspezifischen 16S rRNA-PCR geschlossen werden kann.

Da sich Behandlungsdauer sowie Genesungsprozess im Rahmen infekt-assoziiertes Pseudarthrosen langwieriger gestalten und die Ausheilungsergebnisse schlechter sein können als bei aseptischen Prozessen, ist das klinische Outcome der Patienten ein entscheidender Erfolgsparameter der Therapie [22, 52, 53].

In dieser Arbeit finden daher folgende Fragestellungen Berücksichtigung:

1. Lässt sich mittels 16S rRNA-PCR bakterielles Genom in kulturell aseptischen metadiaphysären Pseudarthrosen nachweisen?
2. Ist die 16S rRNA-PCR zum Nachweis bakterieller Erreger bei metadiaphysären Tibiapseudarthrosen der Bakterien-Kultur überlegen?
3. Wie stellt sich das klinische Outcome von Tibiapseudarthrosen dar und welchen Einfluss hat der Nachweis bakterieller 16S rRNA mittels PCR darauf?

2. Grundlagen

2.1 Definition, Klassifikation und Ursachen von Pseudarthrosen

2.1.1 Definition

Nach der gängigen Definition von Weber und Czech handelt es sich bei der Pseudarthrose um einen Knochenbruch der nach sechs Monaten nicht geheilt ist [119]. Nach Wirth und Kortmann definiert sich die Pseudarthrose durch einen über mindestens sechs Monate persistierenden Bruchspalt und damit dem Ausbleiben der knöchernen Heilung mit Ausbildung eines „Falschgelenkes“ [57, 122]. Praktisch von entscheidender Bedeutung in diesem Zusammenhang ist das rechtzeitige Erkennen einer Knochenbruchheilungsstörung anhand radiologischer Befunde sowie der klinischen Pseudarthrose-Zeichen [36, 59], um ggf. rechtzeitig therapeutisch reagieren zu können. Den angegebenen Zeitraum von sechs Monaten gilt es dabei kritisch zu hinterfragen, da es unter Umständen, bei offensichtlichen Fehlheilungen, schon vor Ablauf der sechs Monate zum Einsatz therapeutischer Maßnahmen kommen sollte [14].

2.1.2 Klassifikation

Die Klassifikation einer Pseudarthrose hat entscheidenden Einfluss auf die Wahl der Therapiemethode und damit dem Outcome einer angewandten Behandlung [34].

Unterschieden werden können Pseudarthrosen in angeborene und erworbene Formen. Die erworbenen Falschgelenke sind als aseptisch oder septisch (infiziert) zu klassifizieren [91]. Die gängigste Einteilung richtet sich nach der Klassifikation von Weber und Czech aus dem Jahr 1973, in der sie aufgrund der biologischen Eigenschaften zwischen reaktiven (vitalen) und inaktiven (avitalen) Pseudarthrosen unterscheiden (siehe Abb. 1) [119].

Zu den reaktiven Formen gehören:

1. biologisch reaktionsfähiger Typ (hypertroph, kallusreich, Abb. 1, A1), auch Elefantenfußpseudarthrose genannt,

2. biologisch weniger stark reaktionsfähiger Typ (kallusarm, Abb. 1, A2), auch Pferdefußpseudarthrose genannt und
3. biologisch reaktionsloser Typ (oligotroph, kalluslos, Abb. 1, A3).

Zu den inaktiven Typen werden folgende Formen gerechnet:

1. Drehkeilpseudarthrose: Ein intermediäres Fragment ist in der Zirkulation schwerstgestört bzw. nekrotisch (Abb. 1, B1),
2. Defektpseudarthrose: Die Frakturrenden der Hauptfragmente sind vaskularisiert, aufgrund der fehlenden Knochensubstanz im Defekt besteht jedoch eine osteologisch tote Zone. Frakturfragmente können bereits beim Unfall oder infolge einer posttraumatischen Osteitis durch Sequestrierung bzw. Nekrose verlorengegangen sein (Abb. 1, B2) und
3. Atrophe Pseudarthrose: Reparationsvorgänge sind zum Stillstand gekommen, so dass eine fehlende Vitalität resultiert (Abb. 1, B3).

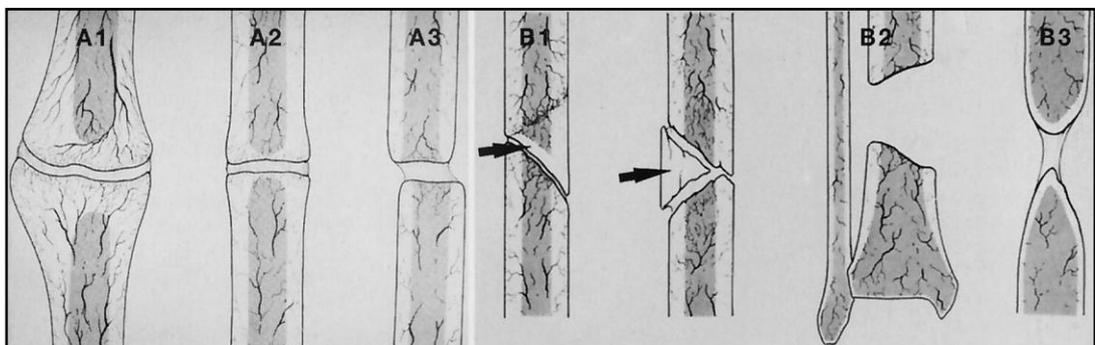


Abb. 1: Klassifikation der Pseudarthrosen nach Weber und Czech [119]

A1: Hypertroph, kallusreich (Elefantenfuß). **A2:** kallusarm (Pferdefuß). **A3:** Oligotroph, kalluslos
B1: Drehkeilpseudarthrose. **B2:** Defektpseudarthrose. **B3:** Atrophe Pseudarthrose

2.1.3 Ursachen

Im Rahmen der physiologischen Knochenbruchheilung kann eine direkte (primäre) und eine indirekte (sekundäre) Form unterschieden werden.

Die primäre Frakturheilung ist gekennzeichnet durch eine direkte Knochenneubildung ohne narbiges Zwischengewebe. Voraussetzungen hierfür sind ausreichender Kontakt der Frakturrenden sowie Stabilität und gute Durchblutung der Fragmente. Es kommt zu einer direkten Überbrückung des

Bruchspaltes mit Haversschen Kanälen, von denen dann die Neubildung des Knochens ausgeht. Häufig lässt sich dieses nur mittels einer stabilen Osteosynthese erreichen [91].

Die sekundäre Frakturheilung läuft typischerweise über ein narbiges Zwischenstadium (Kallus) ab [91, 105]. Hierbei lassen sich die folgenden drei Phasen unterscheiden, die zeitlich überlappend ablaufen können:

1. Die Entzündungsphase (bis zu 4 Wochen),
2. folgend die Reparative Phase, welche unterteilt wird in Granulationsphase und Phase der Kallushärtung (über Monate) und
3. die Remodellierungsphase (3 bis 24 Monate) [10].

Um eine regelrechte Konsolidierung der Fraktur erreichen zu können, bedarf es in diesen Phasen einem komplexen Regelkreis von Osteovaskularisation, Osteoregeneration und Osteostabilisation [97]. Dabei muss das exakte Zusammenspiel der auf molekularer und zellulärer Ebene beteiligten Mediatoren und Zellen stimmen, um auf Gewebeebene eine suffiziente Frakturheilung erreichen zu können. Jacobs et al. beschreiben den Prozess der körpereigenen Knochenneubildung und -reparatur mit den Begriffen Osteogenese, Osteokonduktion und Osteoinduktion [47]. Die Osteoinduktion beinhaltet eine aktive Rekrutierung pluripotenter Zellen, die sich zu Chondro- und Osteoblasten umwandeln können, wobei verschiedenste Mediatoren wie IGF-1, IGF-2, PDGF, BMP u.v.m. an der Heilung beteiligt sind [44, 47]. Es konnte gezeigt werden, dass die Proliferationskapazität der pluripotenten Zellen, auch undifferenzierte mesenchymale Stammzellen genannt, bei atrophen Pseudarthrosen signifikant erniedrigt ist [99]. Zudem wurden abnorme Phänotypen von Osteoblasten im Bereich von Pseudarthrosen entdeckt, die eine Rolle bei der Ausbildung dieser spielen sollen [61, 62]. Bis heute sind diese komplizierten Regulationsprozesse im Rahmen von verzögerten oder ausbleibenden Knochenheilungen nicht vollends verstanden und bilden weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Die Abläufe bei ausbleibender Frakturheilung sind komplex und in der Literatur ausführlicher beschrieben [44, 47, 61-63, 93, 94, 99]. Trotz der Tatsache, dass viele zur Frakturheilung erforderliche Mediatoren und ihre Rolle im Rahmen der

Knochenbruchheilung bekannt sind, kann mit diesen Erkenntnissen die Entstehung einer verzögerten bzw. ausbleibenden Frakturheilung bis heute nicht verhindert werden.

In der Entstehung von Knochenbruchheilungsstörungen konnten zudem zahlreiche Risikofaktoren ausgemacht werden, die einen negativen Einfluss auf die Konsolidierung einer Fraktur haben. Zu diesen negativen Prädiktoren gehören Nikotinabusus, Adipositas, Diabetes mellitus, verminderte Blutsauerstoffsättigung und steigendes Alter des betroffenen Patienten [40, 41, 60].

Ätiologisch können Pseudarthrosen auf biologische oder mechanische Ursachen sowie auf Infektionen zurückgeführt werden [23]. Häufig besteht eine sich gegenseitig beeinflussende Kombination dieser Faktoren.

2.1.3.1 Biologische Ursachen

Betrachtet man die biologischen Ursachen, so lässt sich eine fehlende Gefäßversorgung bzw. eine kortikale Durchblutungsstörung als Hauptursache feststellen [23, 105]. Die Perfusionsstörungen des Knochens können zum einen durch das Trauma selbst, aber auch iatrogen entstehen, indem die venöse oder arterielle Gefäßversorgung des frakturierten Knochens zerstört wird und es konsekutiv zum Absterben des Knochens kommt [48]. Da jeder Reparationsvorgang des Knochens einer hohen Stoffwechselaktivität bedarf, muss es zu einer Neubildung von Gefäßen aus der Markhöhle, dem Periost oder den Muskelansätzen kommen. Sind aber die arteriellen sowie die venösen Gefäßquellen zerstört, ist eine Regeneration des Knochens limitiert [105].

2.1.3.2 Mechanische Ursachen

Mechanisch bedingte Heilungsstörungen resultieren aus einer Instabilität zum falschen Zeitpunkt sowie einem mangelnden Kontakt der Fragmente [105]. Ein nicht ausreichender Kontakt der jeweiligen Bruchenden kann aus einer Interposition von Weichteilen resultieren sowie auch Folge unzureichend durchgeführter Osteosynthesen sein [34]. Zilkens konnte zeigen, dass die

Inzidenz von Pseudarthrosen mit zunehmender Verbreitung der Osteosynthesen erheblich zugenommen hat [125], da eine technisch schlecht oder falsch ausgeführte Frakturstabilisation eine wesentliche Rolle in der Ätiologie spielt [85]. Die Wichtigkeit des Fragmentkontaktes liegt darin begründet, dass leichte Bewegungen der Bruchenden gegeneinander sowie eine Dehnung des interfragmentären Gewebes einen Triggermechanismus für die Heilung darstellen [105].

Auch eine mangelnde Stabilität kann zu den mechanischen Faktoren gezählt werden. Wird ein Knochen zu früh belastet, so kommt es u.U. zu einem Bruch neu gebildeter Knochenbrücken sowie zu einer Zerreißung von Bindegewebszügen. Es besteht die Gefahr, dass der Knochen seine Potenz zur Knochenneubildung verliert und eine Pseudarthrose entsteht [105].

2.1.3.3 Infektiöse Ursachen

Infekt- oder septische Pseudarthrosen treten häufig nach offenen Frakturen, ausgedehnten Weichteilschäden und Traumen mit ausgedehnten Gefäßzerreiungen auf [41]. Das beteiligte Bakterium ist in erster Linie Staphylokokkus aureus, aber auch Pseudomonas, Staphylokokkus epidermidis, Enterkokken und zunehmend multiresistente Erreger wie ORSA (Oxacillin-resistenter Staphylokokkus aureus), MRSA und ESBL (Extended-Spectrum Beta-Lactamase) sind an dieser Stelle zu nennen. Eine quantitative Auflistung der häufigsten Erreger lässt sich aus Abbildung 2 ersehen [41, 69].

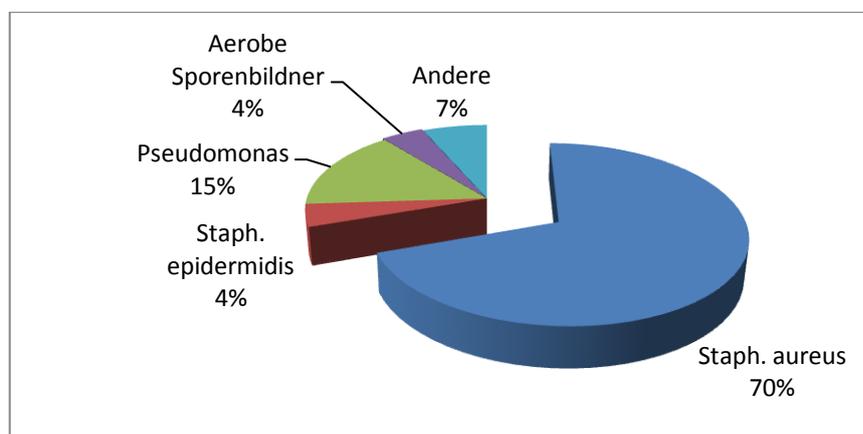


Abb. 2: Häufigkeit von Keimen bei Infektpseudarthrosen (in %, modifiziert nach [39, 41, 71])

Nach aktuellen Studien liegt der Anteil der Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRSA) der *Staphylokokkus aureus* Spezies als ursächliches Bakterium einer infizierten Pseudarthrose bereits bei 50 % [39, 71].

Aber nicht nur die unfallbedingte Kontamination des Frakturgebietes bei offenen Frakturen, sondern auch ein intraoperatives Einbringen von Keimen kann ursächlich angeschuldete werden [91].

Infektpseudarthrosen gehen häufig mit Knochendefekten einher, die im Gegensatz zu sog. Defektpseudarthrosen eher kurzstreckig sind, in schweren Fällen aber ebenfalls mit einem erheblichen Substanzverlust imponieren können [95]. Bakterielle Endo- und Exotoxine können die Perfusion des geschädigten Knochens stören und so das nekrotische Knochen- und Weichteilgebiet vergrößern. In Anwesenheit infektiöser Keime und im Zusammenhang mit der lokalen Instabilität der Fragmentenden kommt es zur Bildung eines Granulationsgewebes, welches keine osteogenetische Potenz mehr besitzt [22, 53]. Es resultieren Resorptionsvorgänge mit dem Ziel infiziertes Weichteil- und Knochengewebe zu entfernen, wobei auch neugebildeter Knochen resorbiert wird und konsekutiv ein knöcherner Defekt entsteht [91]. Komplizierend kommt zu diesem Krankheitsbild hinzu, dass häufig Begleiterkrankungen vorliegen, welche die Therapie der Infektpseudarthrosen zu einer sehr komplexen und somit komplizierten Problematik werden lassen [41].

Neueste Studien konnten zeigen, dass Genmutationen, wie z.B. des TLR 4 Gens W/1 (Asp299Gly), zu einer gestörten Erkennung und Elimination von Bakterien führen [7]. Toll-like-Rezeptoren (TLR) stellen einen Hauptbestandteil der angeborenen Immunabwehr dar. Sie sind in der Lage bestimmte Bestandteile von Zellwänden gram-negativer Bakterien zu erkennen. Tritt der TLR 4 in Kontakt mit einem Erreger, kommt es nach dem Antigen-Antikörper Prinzip zu einer Bindung des Rezeptors am Bakterium, woraufhin eine Kaskade von Abwehrreaktionen ausgelöst wird [7]. Ist dieser Rezeptor gestört, so bedingt dies u.U. ein langwieriges Verbleiben von Bakterien im Frakturgebiet und somit eine verzögerte bzw. ausbleibende Frakturheilung [108, 109].

Ein wesentliches Problem im Kontext der Infekt-pseudarthrosen sind die Low-grade-Infektionen [45, 109]. Diese Art der Infektion stellt ein septisches Geschehen mit Keimbefall dar, wobei dieser durch ein niedriges pathogenes Potential gekennzeichnet ist und initial häufig mit einem symptomlosen Intervall auftritt [123]. Eine manifeste Infektion ist gekennzeichnet durch typische klinische Zeichen, einen mikrobiologischen Keimnachweis oder einer histologisch nachweisbaren granulozytären Entzündung. Im Falle von Low-grade-Infekten lassen sich diese Punkte allenfalls in einer milden Form finden und der kulturelle Keimnachweis gelingt nur selten [82]. Dies liegt darin begründet, dass es sich meist um Staphylokokken-Stämme handelt, die mit klassischen Methoden nicht zuverlässig kultivierbar sind. Diese Bakterienstämme werden als Small Colony Variants (SCV) bezeichnet [58, 124]. SCV befinden sich in einem nicht vermehrungsfähigen, intrazellulären Stadium und siedeln sich im Biofilm an der Grenzschicht zu künstlichen Oberflächen an [82, 92].

Viele Autoren fordern daher Nachweisverfahren mit höherer Sensitivität und Spezifität in Bezug auf Low-grade-Infekte, da ein sicherer Nachweis dieser Infektionsart wesentliche therapeutische Konsequenzen mit sich bringen würde [76, 102, 115]. Der Nachweis der bakteriellen 16S rRNA mittels PCR, wie er in der vorliegenden Arbeit verfolgt wird, stellt einen Lösungsansatz dieser Problematik dar, da ein negativer Nachweis von Bakterien mittels Kultur oder Histologie kein Ausschlusskriterium einer Infektion darstellt [32, 100].

2.2 Diagnostik von Pseudarthrosen

2.2.1 Klinische Diagnostik

An erster Stelle der diagnostischen Bemühungen steht die Anamnese. Speziell sollten hier Voroperationen sowie Symptome bzw. Krankheiten in Erfahrung gebracht werden, die die Knochenheilung negativ beeinflussen könnten [3]. Des Weiteren sollte der Unfallhergang erfragt werden. Wichtig dabei ist die Frage, ob es sich um eine offene oder geschlossene Fraktur gehandelt hat und inwiefern der Weichteilmantel geschädigt wurde. Klinisch treten typischerweise unter Belastung instabilitätsbedingte Schmerzen mit Schwellung im

Frakturgebiet auf. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass sich der Patient völlig frei von Symptomen präsentiert [91].

Inspektorisch muss auf Achsen- und Rotationsfehlstellungen geachtet werden. Auch eine divergente Kondylen- und Innenknöchelposition sowie ein eventueller Beckenschiefstand sollten Beachtung finden [40, 49]. Zudem muss eine anatomische von einer funktionellen Beinlängendifferenz unterschieden werden [50]. Eine Untersuchung der angrenzenden Gelenke ist obligat, da Bewegungseinschränkungen sekundär durch Pseudarthrosen verursacht werden können. Der Grund hierfür liegt im häufig dystrophen Weichteilgewebe um das betroffene Gebiet, welches wie eine große Narbenplatte imponieren kann [53]. Die Begutachtung der Weichteile hat einen hohen Stellenwert, um Fistelungen, die bei infizierten Pseudarthrosen auftreten können [41], oder Entzündungen der Haut nicht zu übersehen. Weitere klinische Befunde können Kraftlosigkeit und falsche Beweglichkeit (Krepitationen) im Pseudarthrosegebiet sein [59]. Die typischen Infektzeichen wie Rubor, Dolor, Calor, Tumor und Functio laesa sind speziell im Frakturgebiet von septischen Pseudarthrosen anzutreffen [69], wobei Fieber und Leukozytose als Zeichen eines systemischen Infektes bei blanden Weichteilverhältnis eher selten auftreten [53]. Problematisch kann die Situation bei den Low-grade-Infekten werden, da diese aufgrund der geringen Virulenz der Erreger klinisch inapparent verlaufen können [123].

Besteht der Verdacht auf eine septische Pseudarthrose kann eine Blutuntersuchung weiteren Erkenntnisgewinn bringen. Dabei sollte neben der Blutkörperchengeschwindigkeit (BSG) eine Bestimmung der Leukozytenzahl sowie des C-reaktiven Proteins (CRP) vorgenommen werden [123]. Bei periprothetischen Infektionen wird über eine Sensitivität von 82 % und eine Spezifität von 85 % in Bezug auf die BSG und eine Sensitivität von 96 % sowie Spezifität von 92 % beim CRP berichtet [101]. Zu beachten ist allerdings, dass systemische Entzündungsprozesse ausgeschlossen sein müssen, um die gewonnenen Infektparameter auch sicher der als septisch verdächtigen Pseudarthrosen zuordnen zu können. Diese Zahlen lassen sich auf die laborchemische Infektionsdiagnostik bei septischen Pseudarthrosen übertragen, da sich das Erregerspektrum und der Entzündungsprozess von

periprothetischen Infektionen mit dem der infizierten Pseudarthrose gleicht [123].

Durch das Fehlen laborchemischer und klinischer Entzündungszeichen lässt sich das Vorhandensein einer Infektpseudarthrose aber nicht ausschließen, so dass bei Pseudarthrosen differentialdiagnostisch an einen Low-grade-Infekt gedacht werden sollte [69, 123].

2.2.2 Bildgebende Diagnostik

Das konventionelle Röntgenbild in 2 Ebenen stellt das bildgebende Mittel der Wahl in der Diagnostik der Pseudarthrosen dar. Die Diagnose einer ausbleibenden Knochenheilung lässt sich in der Mehrzahl der Fälle mittels dieser Methode sichern [3]. Eine Mitbeurteilung der angrenzenden Gelenke sollte ebenfalls als Standard betrachtet werden [41, 59, 123]. Eine Verbreiterung des Bruchspaltes in Zusammenhang mit einem Unruhecallus, Osteolysen und verschiedenen Lockerungszeichen bei liegendem Implantat können Hinweise auf eine vorhandene Instabilität geben [3, 59].



Abb. 3: Hypertrophe („Elefantenfuß“) Tibiapseudarthrose bei einem 35jährigen Patienten 8 Monate nach operativer Versorgung mittels Marknagel

Glatte, abgerundete und durch Kallusbildung verbreiterte Frakturenenden (sog. „Elefanten-„ oder „Pferdefuß“, siehe Abb. 3) legen die Diagnose einer hypertrophen und reaktiven Pseudarthrose nahe. Fehlt die Kallusbildung und sind die Frakturenenden nur gering sklerosiert, kann von einer atrophen und devitalisierten Form ausgegangen werden [50].

Periostale Reaktionen, Lysen, Resorptionszonen und Sequester erhärten den Verdacht auf eine infizierte Pseudarthrose [69]. Liegt im Rahmen eines septischen Geschehens der Verdacht einer Fistelung vor, lässt sich diese mittels Kontrastmittelinjektion darstellen [3].

Die Bildgebung mittels Computertomographie (CT) kann bei anatomisch komplizierten Verhältnissen helfen, da mit ihrer Hilfe eine überlagerungsfreie Darstellung gelingt [59]. Ein Nachweis von Sequestern im Falle von Infektpseudarthrosen ist mit dieser Technik möglich. Es kann ebenfalls eine Aussage über die knöcherne Konsolidierung der Fraktur gemacht werden. Allerdings muss hierfür eine Strahlenbelastung in Kauf genommen und bei einliegenden Implantaten mit Artefakten gerechnet werden [41, 69].

Die Magnetresonanztomographie (MRT) kann sicher eine ausbleibende Kallusbildung erfassen. Eventuell vorhandene Flüssigkeit, im Sinne von Synovialflüssigkeit bei Bildung einer die Frakturenenden überbrückenden Gelenkkapsel, lässt sich signalreich darstellen [59]. Zudem lässt sich mittels MRT eine eventuelle Infektausdehnung im Knochen, insbesondere in der Markhöhle, und der Befall der Weichteile aufzeigen.

Einige Autoren berichten, dass bei Vorliegen metallischer Implantate die Aussagekraft der MRT bzw. CT aufgrund von Artefakten stark eingeschränkt oder die Anwendung kontraindiziert sei [41, 69, 91]. Neuere Software-Programme und weiterentwickelte Osteosynthese-Materialien lassen aber auch diese Probleme immer weiter in den Hintergrund treten, so dass die Anwendung der Schnittbildtechniken selbst bei liegenden Osteosynthesen weitreichende und wichtige Informationen liefert und zudem mit weniger Artefakten als bisher zu rechnen ist [3].

Zum Nachweis der osteogenetischen Aktivität eignet sich die 3-Phasen-Skelettszintigraphie, welche mit osteotropen Radiopharmaka (meist Technetium-99m-Methyldiphosphat) durchgeführt wird [33]. Der Untersucher kann so zwischen reaktionslosen und reaktiven Pseudarthrosen unterscheiden [59]. Bei hypertrophen, reaktiven Pseudarthrosen herrscht eine deutlich gesteigerte Aktivität, wogegen die atrophe, devitalisierte Pseudarthrose eine verminderte oder sogar ausbleibende Aktivität aufweist [50]. Vorsicht ist geboten, wenn in der Szintigraphie eine reaktive Pseudarthrose erkannt wird. Es sollte nicht direkt auf eine hypertrophe bzw. vitale Form geschlossen werden, da septische Geschehnisse ebenfalls zu einer erhöhten Aktivität neigen [91]. Zudem lässt sich mittels dieser Methode die Infektausdehnung bei septischen Formen quantifizieren [69].

Weitere Nachweisverfahren wie z.B. die Gallium-67-Zitrat-Szintigraphie, die Technetium-99m-Antigranulozytenszintigraphie u.a. haben aufgrund differierender Studienlage noch keinen Einzug in den klinischen Alltag gefunden. Die Fluor-18-Desoxyglucose-Positionsemissionstomographie zeigt in Studien vielversprechende Ergebnisse in Hinblick auf eine Infektabklärung, wobei die Fallzahlen in diesen Studien klein sind und sich auf periprothetische Infektionen bei Kniegelenksendoprothesen beziehen [3, 33].

2.2.3 Mikrobiologische und histologische Diagnostik

Eine mikrobiologische Untersuchung in Form einer Kultur sollte bei dem Verdacht auf eine Infektion, aber auch bei resezierten Material von aseptischen Pseudarthrosen durchgeführt werden [69]. Ziel dabei ist es, den bzw. die Erreger zu isolieren und eine gezielte antibiotische Therapie ansetzen zu können [33]. Eine antibakterielle Therapie sollte erst nach der Probengewinnung begonnen werden, um die Rate richtig-positiver (Sensitivität) Ergebnisse in Bezug auf die Detektion von Bakterien nicht zu verfälschen [9]. Es werden Untersuchungen in geeigneten Nährmedien auf Aerobier und Anaerobier sowie Pilze empfohlen [5]. Von einigen Autoren wird die zusätzliche Inkubation in Blutkulturflaschen vorgeschlagen [56]. Im Falle einer Fistelung wird von Gollwitzer et al. eine Kürettage des Fistelganges empfohlen, um eventuelle Kontaminationen mit Keimen der Hautflora zu vermeiden [33]. Ein

negatives Kulturergebnis ist dabei nicht zwangsweise beweisend für eine Keimfreiheit, da mit bis zu 30 % falsch-negativer Ergebnisse zu rechnen ist [32, 100].

Während der Probeentnahme muss auf eine streng sterile Entnahme geachtet werden, um eine Kontamination und somit falsch-positive Ergebnisse zu verhindern [33].

Histologisches Hauptkriterium eines bakteriellen Infektes ist das Vorhandensein segmentkerniger Granulozyten. Zudem können Lymphozyten und Plasmazellen am Ort des Geschehens vorhanden sein, aber nicht in der Quantität wie die Segmentkernigen [123].

Die Entnahme des Gewebes aus repräsentativen Arealen sowie multiple Entnahmen von Proben sind zu empfehlen, um die Rate an falsch-negativen Ergebnissen zu minimieren [4, 25, 65].

2.3 Die Tibiaschaftfraktur

Ungefähr 40 % aller Schaftbrüche langer Röhrenknochen betreffen den Unterschenkel [104]. Den hauptsächlichen Unfallmechanismus stellen Motorradunfälle sowie schwere Autounfälle mit polytraumatisierten Patienten dar. Daraus erklärt sich, dass die Tibiaschaftfraktur selten isoliert, sondern häufig in Kombination mit multiplen Verletzungen auftritt. Auffällig ist ein Überwiegen des männlichen Geschlechts [73, 103].

Eine besondere Problematik stellt die Weichteilsituation an der Tibia dar. Die nur sehr dünne ventromediale Weichteilabdeckung sowie die durch straffe Bindegewebssepten in Logen unterteilte Muskulatur prädisponieren zu offenen Frakturen sowie zum Kompartmentsyndrom. Offene Tibiaschaftfrakturen stellen 25 % aller Unterschenkelschaftbrüche dar. Die Inzidenz einer Drucksteigerung durch Blutungen in den Muskellogen und konsekutiver Ausbildung eines Kompartmentsyndroms liegt im Falle von Tibiafrakturen bei etwa 10 % [11, 26]. Auch von vermehrt bei dieser Fraktur auftretenden Wundheilungsstörungen und Defekten im Weichteilmantel wird berichtet [89]. Weiterhin auffällig ist die erhöhte Rate an Infektionen, Knochenheilungsstörungen und Osteomyelitiden, was auf die kritische

Durchblutungssituation in diesem Gebiet zurückgeführt werden kann [98]. Pseudarthrosen sowie Spätkomplikationen wie posttraumatische Arthrosen aufgrund von Fehlstellungen können im Zusammenhang mit Tibiaschaftfrakturen ebenfalls aufgeführt werden [104].

2.4 Die Polymerase-Ketten-Reaktion

2.4.1 Grundlagen

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) oder Polymerase-Ketten-Reaktion stellt eine in vitro-Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten dar und beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten:

1. Denaturierung: Die Reaktionslösung wird auf 95°C erhitzt, wodurch es zum Aufbrechen der zu kopierenden doppelsträngigen DNA in Einzelstränge kommt.
2. Hybridisierung: Die Temperatur wird auf 55°C herabgesetzt und es kommt zu einer Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge. Dies geschieht nur, wenn der Primer und die zu vervielfältigende DNA komplementär sind. Ist dies der Fall folgt der dritte Schritt.
3. Verlängerung: Die Temperatur wird wieder auf 72°C erhöht und die Polymerasen beginnen die Desoxynukleotidtriphosphate an die Primer anzubauen und es findet die DNA-Neusynthese statt [75].

Die Reaktionslösung einer PCR enthält folgende Bestandteile:

- die zu kopierende doppelsträngige DNA,
- Polymerasen (Enzyme), die die DNA kopieren,
- synthetisch hergestellte DNA-Sequenzen, sog. Oligonukleotidprimer, die als Startpunkt für die DNA-Synthese dienen und
- vier Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), welche an die Primer synthetisiert werden.

Die Polymerasen synthetisieren aus den Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP's) Polynukleotide, welche die Bausteine der neu zu synthetisierenden DNA darstellen. Die Primer sind Mehrfachnukleotide und markieren den

Startpunkt der DNA-Neusynthese. Die Sequenzdaten der Primerregion müssen bekannt sein, um einen Passenden auswählen zu können. Die 16S rRNA-PCR bedient sich sog. Universalprimer, deren Prinzip in Abschnitt 2.4.2 erläutert wird.

2.4.2 Die 16S rRNA-Gensequenzierung

Die in dieser Studie angewandte molekulardiagnostische Methode bedient sich der Tatsache, dass sich der Proteinaufbau der Ribosomen von Prokaryonten, zu denen Bakterien gezählt werden, von der Ribosomen-Struktur eukaryontischer Zellen, zu denen menschliche Zellen gerechnet werden, grundlegend unterscheidet.

Das Ribosom der Bakterienzelle ist mit 70S (S = Svedberg-Einheit) kleiner als das menschliche Ribosom, welches eine Größe von 80S besitzt. Diese im Zytoplasma vorhandenen und für die Proteinsynthese zuständigen Zellorganellen lassen sich weiterhin in 2 Untereinheiten (UE) aufgliedern, die sich ebenfalls in ihrem Proteinaufbau sowie der ribosomalen RNA-Struktur (rRNA) unterscheiden. Das eukaryontische 80S-Ribosom unterteilt sich in eine 60S und 40S Untereinheit, während die Bakterienzelle aus 50S und 30S Untereinheiten besteht [43]. In Abbildung 4 ist der Aufbau eines prokaryontischen Ribosoms schematisch aufgezeigt.

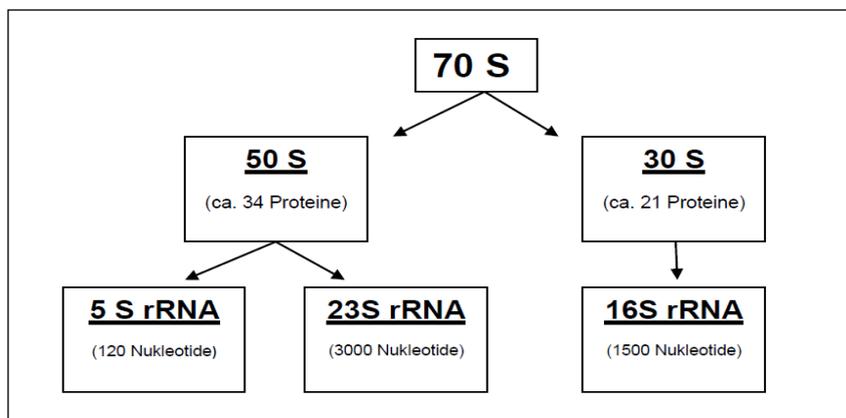


Abb. 4: Schematischer Aufbau des bakteriellen 70S-Ribosoms (modifiziert nach: [43])

Aus Abbildung 4 wird weiterhin ersichtlich, dass die 16S rRNA für die 30S UE der Bakterienzelle spezifisch ist. Insgesamt ist daher der Nachweis von 16S rRNA beweisend für das Vorhandensein bakteriellen Genoms.

Die bakterielle 16S rRNA wird von mehreren Genen kodiert und daher werden diese 16S rRNA-Gene auch als 16S rDNA bezeichnet. Die für die 16S rRNA kodierenden Gene sind universell verbreitet und liegen über das Genom häufig in mehreren Kopien verteilt vor. Die 16S rRNA-Gene umfassen ungefähr 1500 Basenpaare und setzen sich aus hochkonservierten, variablen und hypervariablen Genabschnitten zusammen. Die hochkonservierten Abschnitte sind praktisch für alle Bakterien identisch und bilden die Voraussetzung für den Einsatz von Universalprimern bei der 16S rRNA PCR. Die variablen Bereiche umfassen etwa 500 Basenpaare und sind für die Identifikation der Bakterienspezies geeignet, so dass eine Einteilung der Bakterien bis auf Gattungs- und Speziesebene möglich ist [121].

Bei Nachweis bakterieller 16S rRNA kann diese sequenziert, d.h. die Abfolge der Nukleotide bestimmt werden. Dann können die amplifizierten Produkte einer Sequenzanalyse unterzogen werden. Sequenzanalyse bedeutet, dass die gefundene 16S rRNA-Sequenz mit denen in Datenbanken gespeicherten Sequenzen verglichen wird, um die amplifizierten Gene einer Bakterien-Spezies bzw. -Gattung zuordnen zu können. Die in dieser Arbeit benutzte National Center for Biotechnology Investigation Blast database zählt in diesem Zusammenhang zu einer der größten Datenbanken [8, 112].

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv und Studiendesign

In die vorliegende Studie wurden 35 Patienten eingeschlossen, von denen sich 23 einer Pseudarthrosenrevision nach stattgehabter metadiaphysärer Tibiafraktur unterzogen. Als Kontroll-Gruppe dienten 12 Patienten mit Tibiaschaftfraktur, die sich im gleichen Zeitraum einer offenen Reposition mit interner Fixation unterzogen. Die Operation sowie die Nachbehandlung und Nachuntersuchung fand im Berufsgenossenschaftlichen Krankenhaus Hamburg-Boberg sowie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Lübeck statt. Die mikro- und molekularbiologisch basierten Untersuchungen erfolgten im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, UKSH - Campus Lübeck.

Insgesamt handelte es sich um 8 Frauen (34,8 %) und 15 Männer (65,2 %) in der Pseudarthrosen-Gruppe, während die Kontroll-Gruppe 2 Frauen (16,7 %) und 10 Männer (83,3 %) umfasste.

Aufnahme in diese Studie fanden nur Patienten, die keine klinischen Zeichen einer Infektion zeigten. Eine Antibiotika-Therapie bis 14 Tage präoperativ, das Vorliegen systemischer Erkrankungen sowie Begleiterkrankungen, die das muskuloskeletale System (z.B. rheumatoide Arthritis) betrafen, Frakturen mit Gelenkbeteiligung und das Vorliegen einer Schwangerschaft waren als weitere Ausschlusskriterien definiert. Alle Patienten waren über 18 Jahre alt und wurden präoperativ über die Studie sowie den Eingriff aufgeklärt und das Einverständnis dokumentiert. Das Vorliegen einer Pseudarthrose wurde vor Beginn der Studie mit 6 Monaten ausbleibender Frakturheilung definiert.

Die konsekutive klinische Nachuntersuchung der Patienten erfolgte frühestens 6 Monate nach der Index-OP (Pseudarthrosen-Revision bzw. Frakturversorgung) anhand zweier Scores sowie einer Auswertung vorliegender Röntgenbilder.

Beim Studiendesign handelte es sich um eine multizentrische prospektive Studie zur Prüfung eines diagnostischen Tests sowie einer konsekutiven Nachuntersuchung der beiden Patientenkollektive.

Die Studie erfolgte nach positivem Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Aktenzeichen: 10-089).

3.2 Operatives Vorgehen

Der operativen Versorgung von Tibiapseudarthrosen lag der im folgenden skizzierte therapeutische Algorhythmus zugrunde [69].

Alle Patienten erhielten präoperativ die gleiche Vorbereitung. Die Haut wurde mit Cutasept H (Bode Chemie, Deutschland) desinfiziert. Als perioperative Infektprophylaxe wurde 2 Gramm Cefazolin verabreicht (Basocef, Deltaselect GmbH, Deutschland), wobei diese erst nach Entnahme der Gewebeproben erfolgte.

Im ersten Schritt folgte während der Index-OP eine Gewebeentnahme aus dem Pseudarthrose- bzw. Frakturgebiet zur mikro- und molekularbiologischen Aufarbeitung. Die Proben wurden einer Bakterienkultur sowie einer PCR zur Detektion bakterieller 16S rRNA zugeführt.

Im Falle von aseptischen Pseudarthrosen wurde das nekrotische Gewebe reseziert und eine stabile Reosteosynthese vorgenommen. Eine Auffüllung knöcherner Defekte erfolgte mittels autologen Knochens aus dem Beckenkamm [69].

Bei intraoperativem Verdacht auf eine Infektion, wäre ein Débridement inklusive der Entfernung des gesamten infizierten Weichteil- sowie Knochengewebes erfolgt, wie dies in einer aktuellen Arbeit von Oheim et al. beschrieben und empfohlen wird [80]. Nach Einlegen von Antibiotikaketten wäre die Stabilisation der Pseudarthrose mittels AO- bzw. Ilizarov-Fixateur erfolgt. Dieses Vorgehen war jedoch in keinem der untersuchten Fälle erforderlich.

Aufgrund der aktuellen Studienlage wurde eine routinemäßige postoperative Antibiotikatherapie für 5 Tage verabreicht [18].

3.3 Mikro- und molekularbiologische Methoden

Die mikro- und molekularbiologischen Untersuchungen wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, UKSH - Campus Lübeck angefertigt.

Intraoperativ entnommenes Gewebe von beiden Patientengruppen (Studienpatienten und Kontroll-Gruppe) wurde standardmäßig in 2 Portionen geteilt, die jeweils ca. 1 cm³ groß waren. Die gewonnenen Gewebeproben wurden in 2 ml Reagenz 1 (aus NucleoSpin Extract II Kit, Fa. Machery / Nagel, Deutschland) plus Betamercaptoethanol bei – 30°C aufbewahrt und nach Eintreffen im Labor für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, UKSH – Campus Lübeck bis zur Extraktion der DNA bei – 80°C gelagert.

Alle Untersuchungsschritte mit gewonnener Bakterien-DNA wurden jeweils vor und nach der PCR in separat dafür vorgesehenen Räumen und mit separaten Geräten und Pipetten ausgeführt, um die Gefahr einer Kontamination der Proben mit Fremd-DNA zu minimieren. Alle Untersuchungsschritte wurden nach Empfehlungen der jeweiligen Hersteller mit den im Text sowie im Anhang aufgeführten Kits ausgeführt.

3.3.1 Bakterien-Kultur

Die Proben wurden in Brain-Heart Infusion Broth (Fa. bioMérieux, Nürtingen, Deutschland), TVLS medium [16] und in Nährmedien nach Lodenkämper [64] eingimpft sowie auf Columbia-Blut-Platten (aerob, 5 % CO₂) und Brucella Agar (anaerob, beide bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) ausgestrichen und bebrütet.

Die Inkubation und Beobachtung der Kulturen erfolgte für 14 Tage. Die gefundenen Bakterien unterliefen einer Empfindlichkeitsprüfung entsprechend dem Deutschen Institut für Normung (DIN 58 940) [21].

3.3.2 DNA-Isolation

Vor der DNA-Extraktion musste die Aufbereitung und Homogenisation des zu untersuchenden Proben-Materials erfolgen. Dieser vorbereitende Schritt wurde mit dem Precellys-System der Fa. Peqlab (Gerät: Precellys 24, Beads:

Keramik Kit, Fa. Peqlab, Deutschland) durchgeführt. Das Material wurde in o.g. Keramik-Beads für zweimal 30 Sekunden bei 6500 Umdrehungen / Minute homogenisiert.

Die anschließende DNA-Extraktion erfolgte mit dem QiaAmp DNA Minikit (Fa. Qiagen, Deutschland). Die Zellen wurden mit Proteinkinase K enzymatisch lysiert und die DNA adsorbierte an eine Membran, während die übrigen Zellbestandteile passierten. In zwei folgenden Waschschrritten wurden Zelltrümmer, Proteine und sonstige Bakterienbestandteile entfernt und die DNA mit AE-Puffer von der Membran eluiert. Das Eluat enthielt die gereinigte und isolierte DNA. Die verwendeten Substanzen waren im o.g. QiaAmp DNA Minikit enthalten.

3.3.3 16S rRNA-PCR und -Gensequenzierung

Die 16S rRNA-PCR mit anschließender Sequenzierung beinhaltete folgende Schritte:

1. Durchführung PCR

Mit der extrahierten DNA konnte die PCR durchgeführt werden, um vorhandene bakterielle 16S rRNA zu amplifizieren.

Die Sequenzen der benutzten Universal-Primer (16S rDNA-Gen, Fa. TIB / MOLBIOL, Deutschland) sind in Tabelle 1 aufgeführt:

Primer	Sequenz
Forward	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
Reverse	5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AG-3'

Tab. 1: Sequenzen der Universal-Primer der 16S rRNA-PCR

Der Ansatz für die PCR wurde mit Hilfe des Moltaq-Kits 16S DNA free 100 U (Fa. Molzym, Deutschland) vorgenommen, in welchem alle Reagenzien enthalten waren.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Fa. Roche (Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Das 16S rRNA-PCR-Protokoll beinhaltete folgende Arbeitsschritte: 92°C für 10 Minuten, gefolgt von jeweils 30 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, bei 60°C für 90 Sekunden und bei 72°C für 120 Sekunden.

2. Aufreinigung des PCR-Produktes

Nach der PCR erfolgte die Aufreinigung des Produktes laut der Angaben des Herstellers mit dem PCR-Kombi-Kit der Firma Seqlab (Deutschland). Dabei wurden die verbliebenen Primer, Nukleotide sowie Polymerasen aus der vorangegangenen PCR-Reaktion entfernt.

3. Sequenzierung des PCR-Produktes und Sequenzanalyse

Anschließend erfolgte eine Elektrophorese der PCR-Produkte mittels eines Gels der Firma Invitrogen (USA). Um eine Sequenzierung vornehmen zu können, musste bei der PCR ein ca. 500 Basenpaar großes Produkt entstanden sein, welches eine Bande in der Elektrophorese hervorrief. In einer zur Qualitätssicherung mitgeführten Negativ-Kontrolle durfte keine Bande sichtbar sein. Als Negativ-Kontrolle diente H₂O (aus Moltaq-Kits 16S DNA free 100 U, Fa. Molzym, Deutschland) und als Positiv-Kontrolle extrahierte Bakterien-DNA mit bekannt positivem Ergebnis. Abschließend wurden die Amplifikate durch die Firma Seqlab (Deutschland) sequenziert und mit Hilfe der National Center for Biotechnology Investigation Blast Database analysiert [8, 112].

3.3.4 PDH-PCR

Um den Erfolg der Extraktion zu überprüfen, wurde die extrahierte DNA einer PDH-PCR zugeführt (Gerät: LightCycler LC 2.0, Fa. Roche). Durch den Nachweis des ubiquitär vorkommenden Pyruvatdehydrogenase-Gens (PDH) sollte aufgezeigt werden, dass humane DNA extrahiert wurde. Das PDH-Gen unterliegt einer konstanten Expression und wird wenig reguliert, so dass es zum Nachweis humaner DNA geeignet ist. Eventuell vorhandene bakterielle DNA wurde mittels der bereits beschriebenen 16S rRNA-PCR nachgewiesen. Die Primer-Sequenzen für die PDH-PCR sind in Tabelle 2 aufgeführt. Beide Primer wurden von der Fa. TIB / MOLBIOL (Deutschland) bezogen.

Primer	Sequenz
PDH 1	5` GGT ATG GAT GAG GAG CTG GA 3`
PDH 2	5` CTT CCA CAG CCC TCG ACT AA 3`

Tab. 2: Primer-Sequenzen der PDH-PCR

Die Proben für die PDH-PCR wurden mit dem Testkit LC-Fast Start DNA Master SYBR Green (Fa. Roche, Deutschland) angesetzt.

Als Negativ-Kontrolle diente H₂O aus dem Testkit und als Positiv-Kontrolle humane Plazenta-DNA.

Die Befundauswertung wurde anhand der Schmelzkurven vorgenommen, welche vom benutzten Gerät (LightCycler LC 2.0, Fa. Roche) erstellt werden. Die Analyse von Schmelzkurven bietet die Möglichkeit ein PCR-Produkt aufgrund seines Schmelzverhaltens zu identifizieren und zu charakterisieren, da jedes DNA-Fragment bei einer bestimmten Temperatur schmilzt. Im Falle eines positiven Ergebnisses war humane DNA vorhanden und bei einem negativen Ergebnis befand sich keine humane DNA in der Probe bzw. die PCR war inhibiert.

3.4 Datenerhebung

3.4.1 Allgemeine Daten

Erfasst wurden die demographischen und klinischen Daten in pseudonymisierter Form. Diese enthielten das Alter und Geschlecht des Patienten, die betroffene Seite, das präoperative CRP und die Leukozyten-Zahl, den Frakturtyp nach AO und den Grad der Weichteilverletzung nach Tscherne bei geschlossenen sowie nach Gustilo bei offenen Frakturen.

In beiden Gruppen wurde die initiale osteosynthetische Versorgung der Fraktur erfasst, während in der PSA-Gruppe zusätzlich die Dauer der Pseudarthrose, die Anzahl der Voroperationen sowie die osteosynthetische Versorgung bei Revision registriert wurde.

Ebenfalls erfasst wurden Begleiterkrankungen, Implantatgröße, OP- und Nachuntersuchungs-Datum sowie Komplikationen.

3.4.1.1 AO-Klassifikation geschlossener Frakturen langer Röhrenknochen

Müller entwickelte basierend auf der Einteilung von Unterschenkelfrakturen von Johner et al. die „Müller AO Classification of Long Bones Fractures“ [49, 74].

Im Folgenden soll die Systematik der AO-Einteilung von Frakturen der langen Röhrenknochen erläutert werden:

1. Jedem Körperteil bzw. Knochen wird eine Zahl zugeordnet, im Falle der Tibia und Fibula jeweils die 4.
2. Der Knochen wird in ein proximales, diaphysäres und distales Segment eingeteilt und der Reihenfolge von proximal nach distal nummeriert, d.h. die Diaphyse bekommt die Ziffer 2.
3. Weiterhin werden die Frakturformen alphabetisch nach Schwere aufgeführt. Bei diaphysären Frakturen finden sich in der Gruppe A die einfachen Frakturen, in Gruppe B Frakturen mit Fragment(en) und in Gruppe C die Mehrfragment- bzw. Trümmer- oder Etagenfrakturen wieder. Die proximalen und distalen Typen werden nach extraartikulär (A), teils artikulär (B) und komplett artikulär (C) eingeteilt.
4. Diese Gruppen werden dann nochmals in Untergruppen aufgegliedert und nummeriert. In Gruppe A finden sich die Spiralfrakturen (1), die Schrägfrakturen (2) und die Querfrakturen (3). In Gruppe B unterscheidet man Frakturen mit Drehkeil (1), einem Biegungskeil (2) sowie mehreren Biegungskeilen (3). Gruppe C wartet mit mehreren Drehkeilen (1), einem Zweietagenbruch (2) und als Trümmerfraktur (3) auf.

Mittels dieser Einteilung lassen sich Aussagen über die Biomechanik des Unfallmechanismus sowie der Schwere der knöchernen Verletzung ableiten [49, 74]. So lassen z.B. Mehrfragmentfrakturen (C1-3) meist auf Hochrasanztraumen (z.B. Verkehrsunfall) schließen. Aus der AO-Klassifikation können konsekutiv Anhaltspunkte für ein Therapiekonzept abgeleitet sowie Aussagen zur Prognose gemacht werden [6, 26].

3.4.1.2 Klassifikation offener Frakturen nach Gustilo

Eine möglichst genaue Klassifikation der Weichteilschäden ist auch bei offenen Frakturen essentiell für die Auswahl eines geeigneten Therapieregimes [96].

Die Klassifikation nach Gustilo et al. beinhaltet den Grad der Weichteilschädigung, die Art der Fraktur und das Ausmaß der Kontamination. In Tabelle 3 ist diese aufgezeigt. Es können mehrere Typen unterschieden werden und Typ III mit drei weiteren Unterpunkten noch genauer differenziert werden kann [37].

Gustilo /	Beschreibung
Anderson	
Typ I	Oberflächliche, saubere Wunde, weniger als 1 cm Durchmesser, einfache Schräg- bzw- Querfraktur, keine Trümmerfraktur
Typ II, IIIA	II: Tiefe kontaminierte Wunde (> 1 cm), Weichteilquetschung, aber adäquate Weichteildeckung des Knochens, drohendes Kompartiment, Trümmerfraktur IIIA: Weichteildefekt > 5 cm, sonst wie Typ II
IIIB	Ausgedehntes Weichteiltrauma (Kontusion, Décollement), Periostverlust, manifestes Kompartiment, Trümmerfraktur
IIIC	Ausgedehntes Weichteiltrauma (Kontusion, Décollement), Periostverlust, manifestes Kompartiment, Trümmerfraktur, zusätzlich rekonstruktionspflichtige arterielle Gefäßverletzung

Tab. 3: Klassifikation der offenen Frakturen nach Gustilo et al. [37]

3.4.1.3 Klassifikation der Weichteilschäden geschlossener Frakturen nach Tscherne

Bereits in den 60er Jahren wurde gefordert, dass die Verletzungsschwere der Weichteile als Grundlage für die Behandlung und Prognose verwendet wird, da die Prognose der Knochenbruchheilung wesentlich von der Weichteilsituation und weniger vom Grad der Knochenverletzung abhängig ist [6].

Da aus der AO-Klassifikation keine Rückschlüsse auf die Weichteilsituation bei geschlossenen Frakturen gezogen werden können, haben Tscherne et al. eine Einteilung vorgenommen. In dieser ist die Weichteilschädigung bei geschlossenen Frakturen aufgeführt und in Tabelle 4 dargestellt [79].

Grad	Beschreibung
1	Keine oder nur unbedeutende Weichteilverletzung
2	Oberflächliche Schürfwunde und Kontusion durch Fragmentdruck
3	Tiefe kontaminierte Schürfung und lokalisierte Kontusionsherde
4	Ausgedehnte Hautkontusionsquetschung oder subkutanes Décollement, Kompartmentsyndrom, Gefäßruptur

Tab. 4: Einteilung der Weichteilschäden bei geschlossenen Frakturen nach Tscherne et al. [79]

3.4.2 Scores und klinische Nachuntersuchung

Zur Objektivierung der Nachuntersuchung wurden 2 Scores verwendet, die im Folgenden kurz erläutert werden. Im Anhang (unter 8.1 und 8.2) sind die Scores angefügt. Dort lassen sich die einzelnen Parameter sowie die Interpretation der erreichten Punktzahlen ansehen. Daher werden folgend nur die Überpunkte aufgeführt.

Der Score nach Merchant und Dietz [70] wurde für Nachuntersuchungen bei Tibia- und Fibulaschaftfrakturen entwickelt und umfasst folgende Kriterien:

- Bewegungsausmaß des oberen Sprunggelenkes (maximal 10 Punkte)
- Gangbild (maximal 10 Punkte)
- Funktionen des alltäglichen Lebens (maximal 40 Punkte)
- Schmerzen (maximal 40 Punkte).

Der Score in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O'Beirne [28, 78], wie er auch in einer Arbeit von Mückley et al. zur Nachuntersuchung von Tibiapseudarthrosen verwendet wurde [72], enthält folgende Parameter:

- Knieflexion
- Extensionsdefizit im Knie
- OSG-Extension
- OSG-Flexion
- Pronation / Supination
- Beinlängenverkürzung
- Schwellneigung

-
- Schmerzzustand
 - Arbeitsfähigkeit
 - Zufriedenheit

Die einzelnen Parameter werden mit Punkten von 1 (sehr gut) bis 4 (schlecht) bewertet.

3.4.3 Radiologische Nachuntersuchung

Die knöchernen Konsolidierung, Achsstellung, Lage des Implantats und mögliche Arthrosezeichen der angrenzenden Gelenke wurden radiologisch beurteilt. Anhand der Durchgängigkeit der Spongiosabälkchen sowie der Kortikalisdurchbauung wurde die knöchernen Konsolidierung der Fraktur bzw. der Pseudarthrose beurteilt. Bei einer knöchernen Durchbauung von mindestens dreiviertel der kortikalen Zirkumferenz galt die Fraktur bzw. die Pseudarthrose als konsolidiert.

Die prä- und postoperativ sowie im Laufe der Nachbehandlung angefertigten Röntgenbilder wurden im Rahmen der Untersuchung nachbegutachtet.

Die Auswertung erfolgte durch einen verblindeten Facharzt für Radiologie.

3.4.4 Statistik

Die statistischen Erhebungen wurden mittels des Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 19.0, Chicago, IL, USA) mit einer Signifikanz von $p \leq 0,05$ erhoben. Die univariate Varianzanalyse diente der Datenanalyse. Zusammenhänge wurden mittels der Korrelationsanalyse nach Pearson berechnet. Bei Pearson handelt es sich um ein parametrisches Verfahren, d.h. es wird angenommen, dass die Daten normalverteilt sind.

Als Faustregel für den Korrelationskoeffizient gelten folgende Werte:

- Um 0,2 schwache Korrelation,
- um 0,5 mittelstarke Korrelation,
- um 0,8 starke Korrelation und
- eine negative Korrelation lag vor, wenn ein Minus vor dem Wert angegeben war.

Auf einen statistischen Beweis der Normalverteilung, welche eine Voraussetzung für die univariate Varianzanalyse sowie die Korrelationsanalyse nach Pearson darstellt, wurde aufgrund der kleinen Fallzahl verzichtet. Anhand der Boxplots im Ergebnisteil lässt sich aber die Annahme stützen, dass eine Normalverteilung der Daten vorlag, da die Mediane mittig liegen und die Quartile gleichmäßig angeordnet sind.

Die Abbildungen, Tabellen, Diagramme und Boxplots wurden mit Hilfe von Microsoft Word und Excel 2007 sowie SPSS 19.0 erstellt. Die Verwaltung der Patientendaten erfolgte mittels Microsoft Excel 2007.

In den dargestellten Box-Plots sowie für alle Durchschnittswerte wird der Median als statistisches Maß verwendet. Die Box-Plots beinhalten folgende Werte:

- Box = Werte vom 1. bis 3. Quartil, d.h. Box enthält 50 % aller Werte
- Strich in der Mitte der Box = Median
- Striche („Schnurrbarthaare“) = Minimum bis Maximum der Werte
- Punkte = Ausreißer (Werte mehr als 1,5fache größer als Höhe der Box)
- Stern = Extremwerte (Werte mehr als dreimal größer als Höhe der Box)

Die Zahlen an den Punkten bzw. Sternen zeigen den jeweiligen Patienten an.

4. Ergebnisse

4.1 Bakterien-Kultur und PCR

4.1.1 Pseudarthrosen-Gruppe

Alle Kulturen zeigten in der Pseudarthrose-Gruppe negative Ergebnisse, d.h. es konnte kein mikrobiologisches Bakterienwachstum nachgewiesen werden. Somit erfüllten alle Pseudarthrosen-Patienten die Kriterien dieser Studie und konnten eingeschlossen werden.

In der PCR konnte bei 2 Pseudarthrose-Patienten (8,7 %) bakterielle 16S rRNA nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich jeweils um Bakterien der Gattung *Methylobakterium* bzw. *Staphylokokkus*.

4.1.2 Kontroll-Gruppe

In der Kontrollgruppe zeigte eine Kultur (8,3 %) Bakterienwachstum. Es handelte sich dabei um *Streptokokkus suis* sowie Bakterien der Gattung *Enterokokkus*.

Alle PCRs der Kontrollgruppe zeigten negative Ergebnisse, auch im Fall der positiven Kultur, d.h. es konnte kein bakterielles Genom nachgewiesen werden.

4.2 Präoperative Daten der Pseudarthrosen- und Kontroll-Gruppe

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Pseudarthrose- und der Kontroll-Patienten sowie der PCR-negativen und -positiven Patienten bezüglich der Alters- und der Geschlechtsverteilung, der präoperativen Entzündungsparameter, der Einteilung der Frakturen nach der AO-Klassifikation, des Weichteilschadens nach Gustilo sowie nach Tscherne und der initialen osteosynthetischen Versorgung dargestellt. Zudem wird in der Pseudarthrosen-Gruppe die osteosynthetische Versorgung zum Zeitpunkt der Revision, die Dauer der Pseudarthrose sowie die Anzahl der Voroperationen beschrieben.

4.2.1 Patientenkollektiv

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich wird, betrug die Altersspanne in der Pseudarthrosen-Gruppe 20 - 81 Jahre und das mittlere Alter 42 Jahre. Die Kontroll-Gruppe wies eine Altersspanne von 17 - 73 Jahren auf und das mittlere Alter lag bei 48,5 Jahren.

Das Alter der Pseudarthrose-Patienten mit positiver PCR lag im Mittel bei 37,5 Jahren, während das mittlere Alter der PSA-Patienten mit negativer Kultur bei 42 Jahren lag.

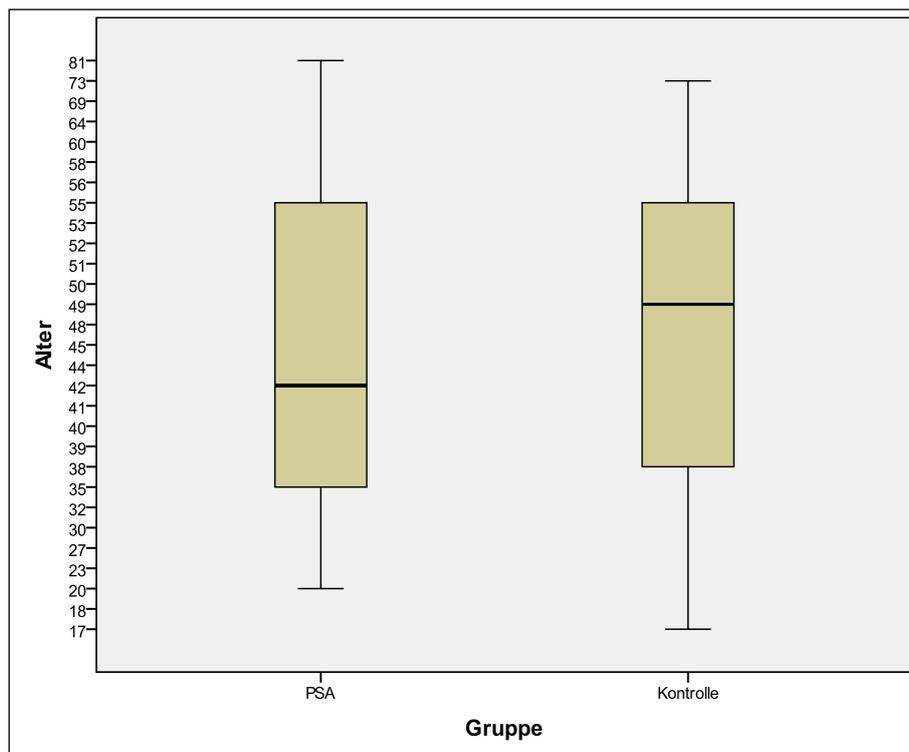


Abb. 5: Boxplots zur Altersverteilung (in Jahren) in der Pseudarthrosen- (PSA) und der Kontroll-Gruppe (Kontrolle)

Bezüglich der Geschlechterverteilung ergab sich, dass in der PSA-Gruppe 6 Frauen (26,1 %) und 17 Männer (73,9 %) waren. In der Kontrollgruppe befanden sich 2 Frauen (16,7 %) und 10 Männer (83,3 %). Somit überwog in beiden Gruppen das männliche Geschlecht.

Alle PCR-positiven Patienten waren männlich (100 %), während in der PCR-negativen Gruppe 15 Männer (71,4 %) und 6 Frauen (28,6 %) waren.

Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Gruppen bezüglich des Alters sowie der Geschlechterverteilung bestanden nicht.

4.2.2 Laborergebnisse

Der Normwert des C-reaktiven Proteins war mit ≤ 5 mg / l definiert.

Das mittlere C-reaktive Proteine (CRP) der PSA-Gruppe lag bei 6,5 mg / l, wobei die Spanne zwischen minimalen und maximalen CRP von 1,70 bis 30,10 mg / l reichte. Die 4 Ausreißer (*8, *7, *9, *15) lagen zwischen 43,3 und 92,7 mg / l. Der mittlere Leukozyten-Wert dieser 4 Patienten betrug 8220 / μ l. Das mittlere CRP der Kontroll-Gruppe lag bei 8,15 mg / l, wobei die Spanne zwischen minimalen und maximalen CRP von 0,30 bis 61,40 mg / l reichte. Der Ausreißer (°34) lag bei 133,0 mg / l (siehe Abb. 6).

Das mittlere CRP lag in der PCR-positiven Gruppe bei 6,5 mg / l und in der PCR-negativen Gruppe bei 7,2 mg / l.

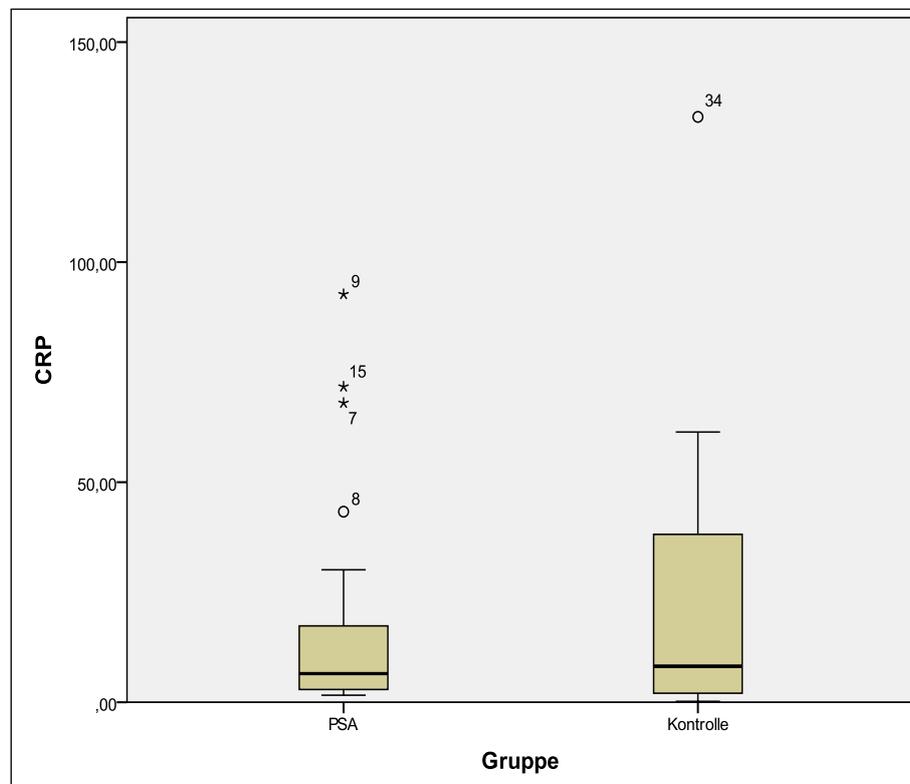


Abb. 6: Boxplots der CRP-Werte (in mg / l) in der Pseudarthrosen- (PSA) und der Kontroll-Gruppe (Kontrolle), [Norm CRP: ≤ 5 mg / l]

Der Normbereich der Leukozyten war mit 1200 – 8000 / μl definiert.

Der mittlere Leukozyten-Wert der PSA-Gruppe lag bei 8840 / μl , wobei die Spanne zwischen minimalen und maximalen Leukozyten-Wert von 3060 bis 15130 / μl reichte. Der mittlere Leukozyten-Wert der Kontroll-Gruppe lag bei 10870 / μl , wobei die Spanne zwischen minimalen und maximalen Leukozyten-Wert von 6110 bis 17210 / μl reichte (siehe Abb. 7).

Die mittlere Leukozyten-Zahl zeigte bei den PCR-positiven Patienten einen Wert von 8350 / μl und den PCR-negativen von 9500 / μl .

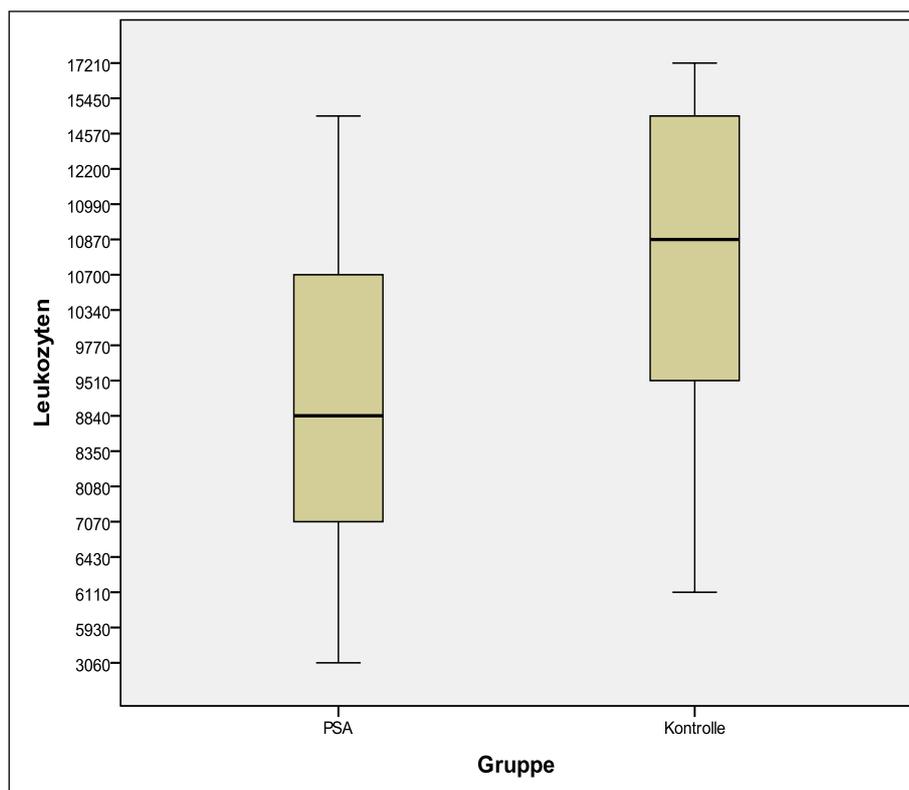


Abb. 7: Boxplots der Leukozyten-Werte (in μl) in der Pseudarthrosen- (PSA) und der Kontroll-Gruppe (Kontrolle), [Norm Leukozyten: 1200 – 8000 / μl]

Die Leukozyten zeigten einen signifikanten Unterschied ($p = 0,045$) zwischen der PSA- und der Kontroll-Gruppe, während zwischen den PCR-positiven und -negativen kein signifikanter Unterschied bestand. Die Leukozyten-Werte waren in der Kontrollgruppe höher als im PSA-Kollektiv. In Bezug auf das CRP ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den jeweiligen Gruppen.

4.2.3 Klassifikation der Frakturen sowie des Weichteiltraumas

4.2.3.1 AO-Klassifikation

Abbildung 8 zeigt die Verteilung der Frakturen in Bezug auf die AO-Klassifikation.

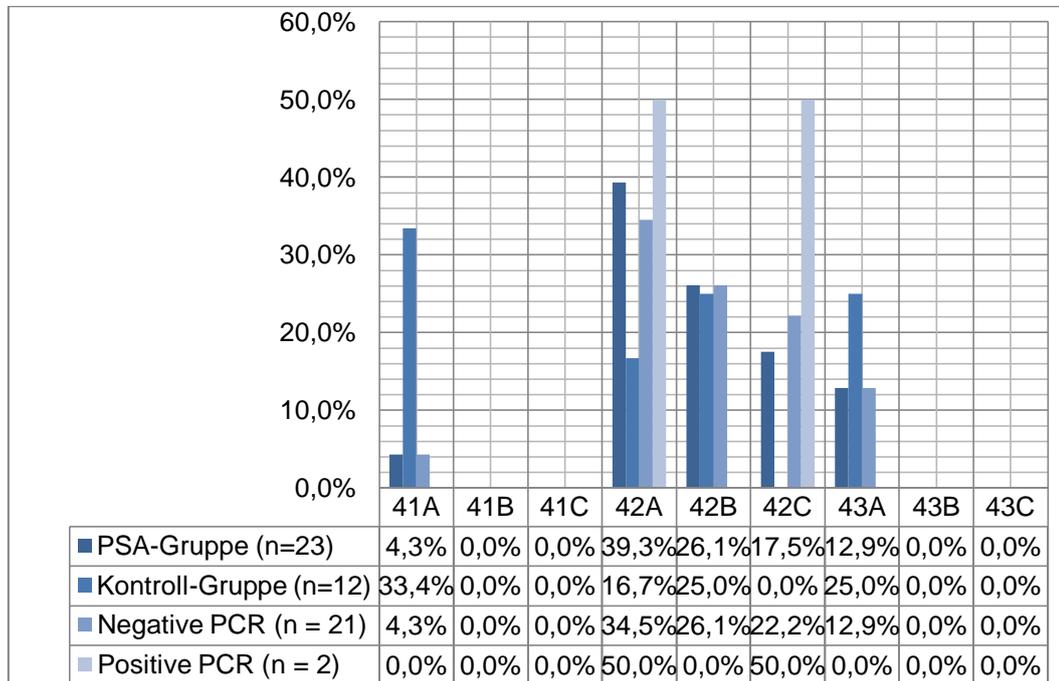


Abb. 8: Klassifikation der Tibia-Frakturen nach AO (in %)

Der überwiegende Anteil der Frakturen in der PSA-Gruppe fand sich mit 82,9 % im diaphysären Bereich (42A – C), während in der Kontroll-Gruppe 41,7 % der Frakturen in dieser Kategorie anzutreffen waren. Die restlichen Frakturen verteilten sich auf den metadiaphysären Bereich. Es lag keine Fraktur mit Gelenkbeteiligung vor.

Die Frakturen der PCR-positiven PSA-Patienten konnten nach der AO als 42A sowie 42C klassifiziert werden, lagen somit im diaphysären Bereich. Der überwiegende Anteil der PCR-negativen Patienten lag mit 82,8 % im diaphysären Bereich.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht ($p \leq 0,05$).

4.2.3.2 Offene und geschlossene Frakturen

Aus Abbildung 9 lässt sich die Verteilung der offenen und geschlossenen Frakturen in den jeweiligen Gruppen ansehen.

In der PSA-Gruppe fanden sich 12 offene (52,2 %) und 11 geschlossene (47,8 %) Frakturen, während die Kontrollgruppe 6 offene (50 %) und 6 geschlossene (50 %) Frakturen zeigte.

In der PCR-positiven Gruppe fanden sich zu gleichen Teilen offene und geschlossene Frakturen. Von den PCR-negativen Patienten waren 11 Frakturen (52,4 %) offen und 10 Frakturen (47,6 %) geschlossen.

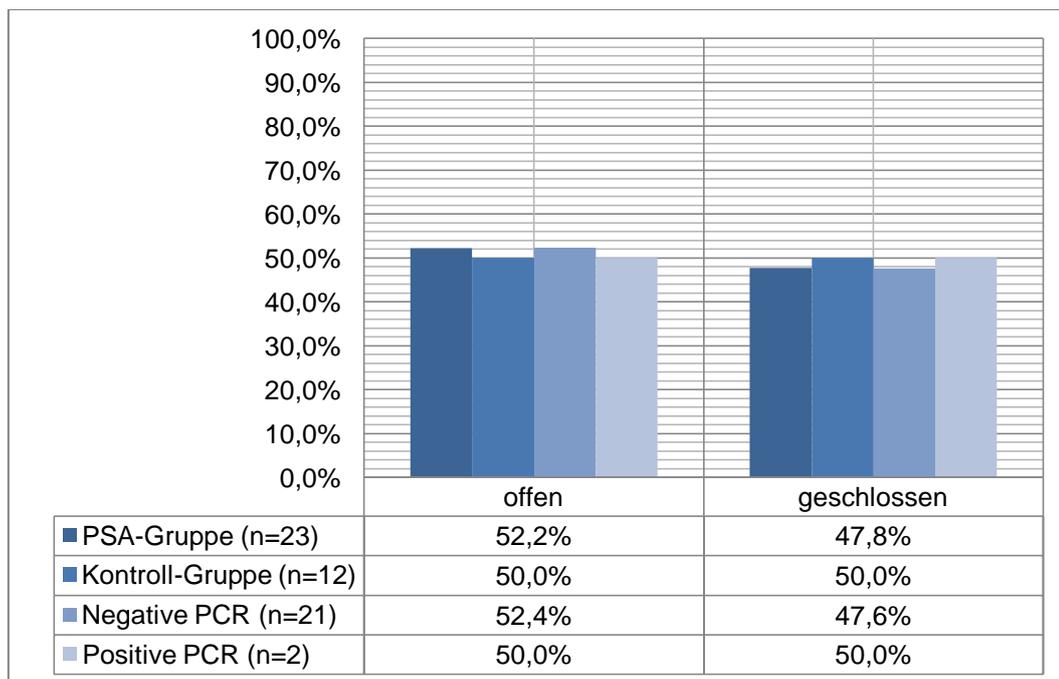


Abb. 9: Offene und geschlossene Frakturen (in %)

Die Einteilung in geschlossene und offene Frakturen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p \leq 0,05$).

4.2.3.3 Klassifikation der offenen Frakturen nach Gustilo

Die PSA-Gruppe war mit 50 % drittgradig offener Frakturen schwerer betroffen als die Kontrollgruppe, in welcher 50 % der offenen Frakturen Grad 1 angehörten (siehe Abb. 10).

Ein PCR-positiver Patient hatte eine drittgradig offene Fraktur, während der Großteil in der PCR-negativen Gruppe mit 45,4 % erstgradig offene Frakturen zeigte.

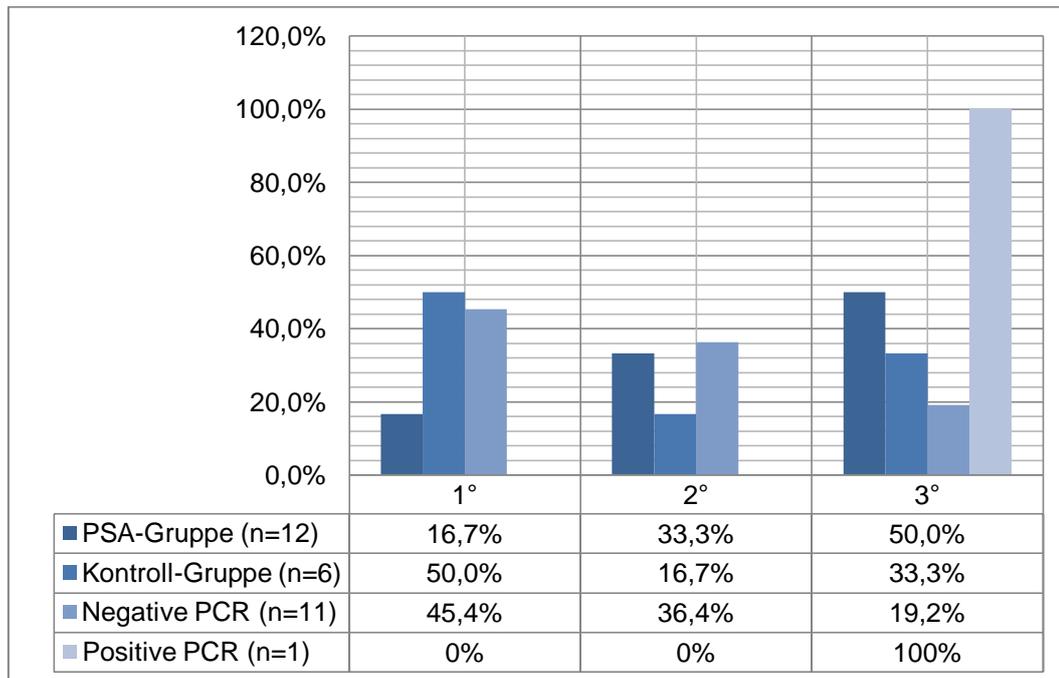


Abb. 10: Offene Frakturen nach der Einteilung von Gustilo et al. [37] (in %)

Die Einteilung nach Gustilo zeigte in der Varianzanalyse keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p \leq 0,05$).

4.2.3.4 Klassifikation der geschlossenen Frakturen nach Tscherne

Nach Tscherne, der die Weichteilschäden bei geschlossenen Frakturen einteilte, zeigte sich das in Abbildung 11 aufgeführte Bild.

Der überwiegende Anteil zeigte in beiden Gruppen mit 45,5 % (PSA-Gruppe) bzw. 66,6 % (Kontroll-Gruppe) erstgradige Weichteilschäden.

Es lässt sich zudem ersehen, dass in der PCR-positiven Gruppe ein erstgradiger Weichteilschaden vorlag. In der PCR-negativen Gruppe war mit 40 % der überwiegende Anteil der geschlossenen Frakturen erstgradig.

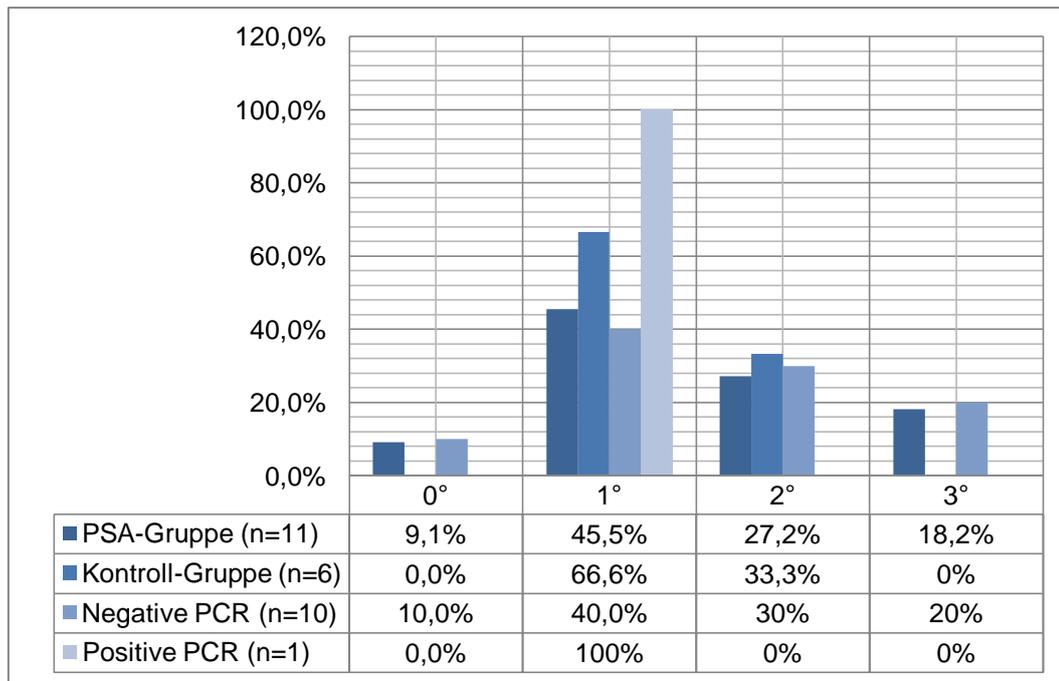


Abb. 11: Weichteilschäden bei geschlossenen Frakturen nach der Einteilung von Tscherne et al. [79] (in %)

Die Einteilung nach Tscherne et al. zeigte in der Varianzanalyse keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p \leq 0,05$).

4.2.4 Initiale osteosynthetische Versorgung der Frakturen

Abbildung 12 zeigt die initiale Versorgung der Fraktur in den untersuchten Gruppen.

Die initiale Versorgung der Fraktur wurde in der PSA-Gruppe bei 9 Patienten (39,1 %) mit einem AO-Fixateur (AO = Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese), bei 5 Patienten (21,8 %) plattenosteosynthetisch und bei 9 Patienten (39,1 %) mittels UTN (unaufgebohrter Tibianagel) vorgenommen. Bei den Kontroll-Patienten wurden 9 Patienten (75 %) mittels AO-Fixateur und 3 Patienten (25 %) mittels Plattenosteosynthese versorgt. Ein UTN wurde bei keinem Patienten als primäres Implantat gewählt.

PSA-Patienten mit positiver PCR wurden zu gleichen Anteilen mittels AO-Fixateur oder Plattenosteosynthese versorgt. Ein UTN wurde bei keinem Patienten als primäres Implantat gewählt. Die initiale Versorgung wurde in der PSA-Gruppe mit negativer PCR bei 8 Patienten (38,1 %) mit einem AO-

Fixateur, bei 4 Patienten (19,0 %) plattenosteosynthetisch und bei 9 Patienten (42,9 %) mittels UTN vorgenommen.

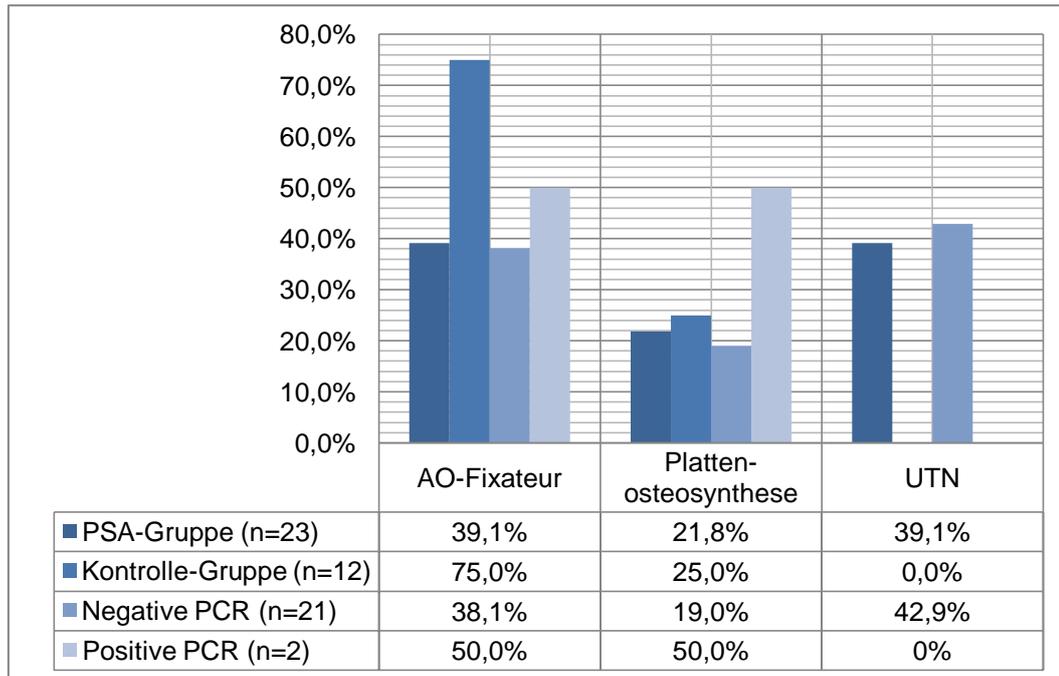


Abb. 12: Initiale Versorgung der Fraktur (in %, UTN = unaufgebohrter Tibia Nagel)

Statistisch bestand zwischen der PSA- und der Kontroll-Gruppe ein signifikanter Unterschied mit $p = 0,01$ in der initialen Frakturversorgung. Hauptgrund hierfür lag in der Versorgung mittels UTN in der PSA-Gruppe mit 39,1 % der Patienten, während in der Kontrollgruppe kein Patient diese Versorgung erfuhr. Zwischen der PCR-negativen und –positiven Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied errechnet werden ($p \leq 0,05$).

4.2.5 Operative Pseudarthrosenrevision

Die Versorgung der Pseudarthrose wurde in der PCR-positiven PSA-Gruppe zu gleichen Anteilen mittels AO-Fixateur und Plattenosteosynthese vorgenommen (siehe Abb. 13).

In der PCR-negativen Gruppe erfolgte die Versorgung der Pseudarthrose bei 10 Patienten (47,6 %) mittels AO-Fixateur, bei 9 Patienten (42,9 %) mittels Plattenosteosynthese und bei 2 Patienten (9,5 %) mittels UTN.

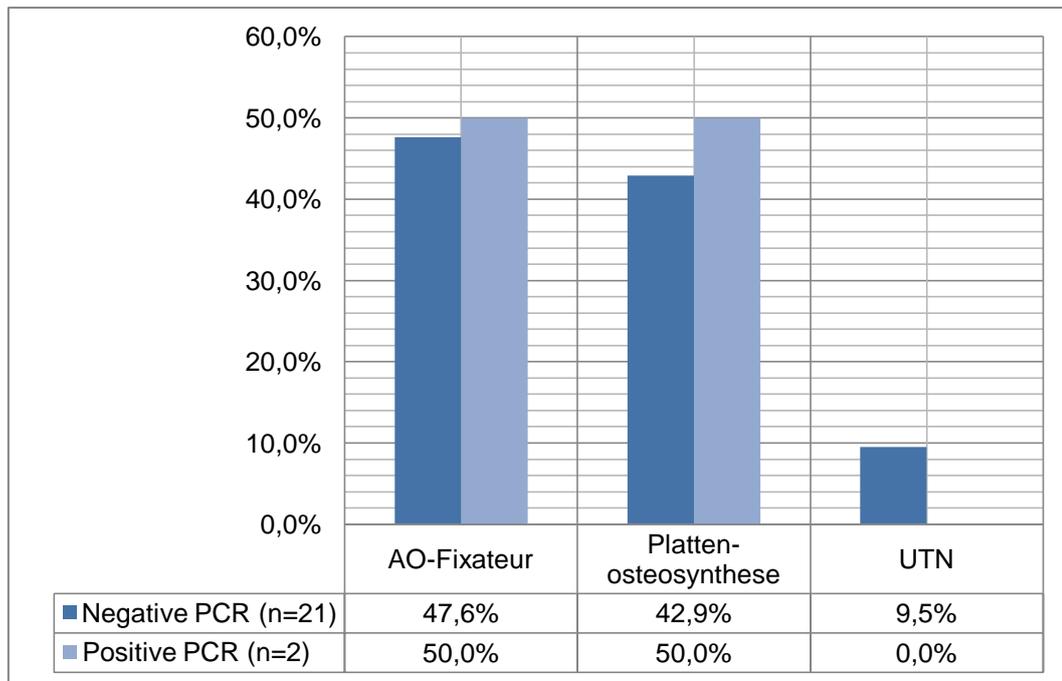


Abb. 13: Versorgung der Pseudarthrose in der PSA-Gruppe mit negativer sowie positiver PCR (in %, UTN = unaufgebohrter Tibia Nagel)

Die Versorgung der Pseudarthrosen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p \leq 0,05$).

4.2.6 Krankheitsverlauf

Im Mittel betrug der Zeitraum von der Fraktur bis zur Revision der Pseudarthrose in der PCR-positiven Gruppe 8,5 Monate, während er in der PCR-negativen PSA-Gruppe bei 8 Monaten lag.

Die Anzahl der Voroperationen betrug in der PCR-positiven PSA-Gruppe im Mittel 3 und in der PCR-negativen Gruppe 2.

Der Krankheitsverlauf zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p \leq 0,05$).

4.3 Nachuntersuchung

Von 23 PSA-Patienten konnten alle nachuntersucht werden. In der Kontroll-Gruppe war ein Patient verstorben, so dass dort 11 Patienten (91,7 %) in die Nachuntersuchung einbezogen werden konnten.

Die Nachuntersuchungen fanden in der PSA-Gruppe im Mittel 15 Monate nach der Pseudarthrosen-Revision statt, wobei die Früheste nach 8 Monaten und die Späteste nach 21 Monaten stattfand.

In der Kontroll-Gruppe betrug der mittlere Zeitraum von der operativen Versorgung der Fraktur bis zur Nachuntersuchung 20 Monate. Der früheste Termin lag 16 Monate und der späteste 22 Monate nach der OP.

Es konnte zwischen den beiden Gruppen bezüglich des Nachuntersuchungszeitraumes kein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) mittels der Varianzanalyse aufgezeigt werden.

In diesem Abschnitt werden die Nachuntersuchungsergebnisse der PSA- und der Kontroll-Patienten sowie der PCR-negativen und -positiven Patienten bezüglich der Scores in Anlehnung an die Einteilung von Folleras & O'Beirne sowie nach Merchant & Dietz dargestellt. Desweiteren werden die Beweglichkeit des Knie- und Sprunggelenkes, die radiologische Durchbauung, die Arbeitsfähigkeit sowie die Beinlängenverkürzung dargestellt.

4.3.1 Gesamtscore in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O'Beirne

In der PSA-Gruppe betrug der Gesamtscore in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O'Beirne im Mittel 22 Punkte und zeigte so ein gutes Outcome. In der Kontrollgruppe betrug der mittlere Score in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O'Beirne 13 Punkte und zeigte so ein sehr gutes Nachuntersuchungsergebnis. Die in Abbildung 14 ersichtlichen Ausreißer *29 und *26 lagen bei 22 bzw. 27 Punkten.

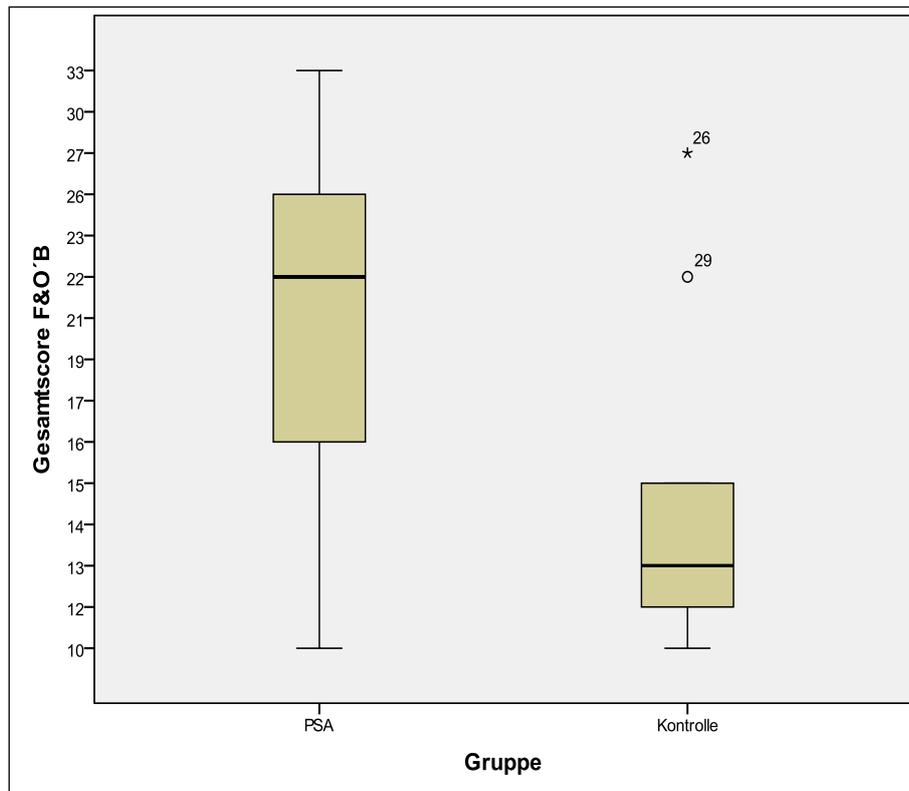


Abb. 14: Boxplots des Gesamtscores in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O´Beirne (F & O´B) [28, 78] in der Pseudarthrosen- (PSA) und der Kontroll-Gruppe (Kontrolle)

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der untersuchten Gruppen genauer aufgeschlüsselt.

Es zeigte sich, dass mit 12 Patienten (52,2 %) der PSA-Gruppe die Mehrzahl einen Score zwischen 26-32 Punkten und somit ein mäßiges Outcome hatten, während in der Kontrollgruppe mit 7 Patienten (63,6 %) die Mehrzahl gute Ergebnisse erzielte.

Desweiteren zeigte sich, dass mit 47,6 % der PCR-negativen Patienten die Mehrzahl einen Score zwischen 26-32 Punkten und somit ein mäßiges Outcome hatten. In der PCR-positiven Gruppe erreichten die Patienten häufig ein gutes bzw. mäßiges Outcome.

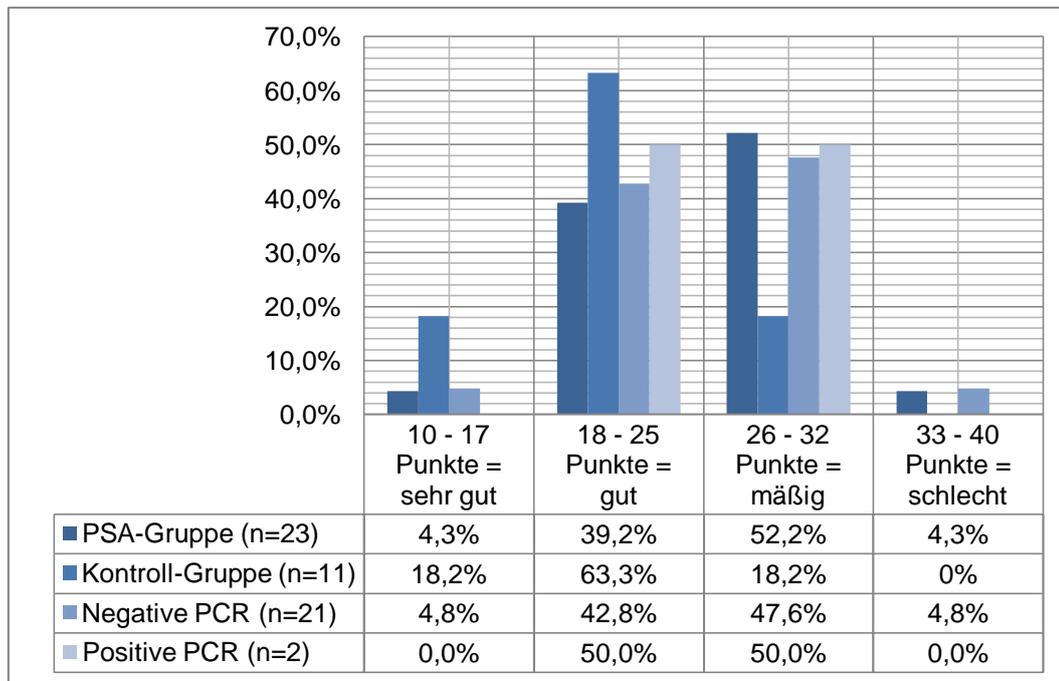


Abb. 15: Score in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O´Beirne (F & O´B) [28, 78]

Bezüglich des Scores in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O´Beirne konnte zwischen der PSA- und der Kontroll-Gruppe ein signifikanter Unterschied ($p = 0,005$) ermittelt werden, wobei das Outcome in der PSA-Gruppe schlechter war. Zwischen den PCR-negativen und –positiven Patienten bestanden keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$).

4.3.2 Gesamtscore Merchant und Dietz

In der PSA-Gruppe betrug der Gesamtscore nach Merchant und Dietz im Mittel 62 Punkte und zeigte somit ein schlechtes Outcome. In der Kontrollgruppe betrug der mittlere Score nach Merchant und Dietz 86 Punkte, was einem guten Outcome entsprach. Die in Abbildung 16 ersichtlichen Ausreißer *29 und *26 lagen bei 64 bzw. 52 Punkten. Analog dazu zeigten die beiden Ausreißer auch ein schlechtes Outcome im Score in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O´Beirne.

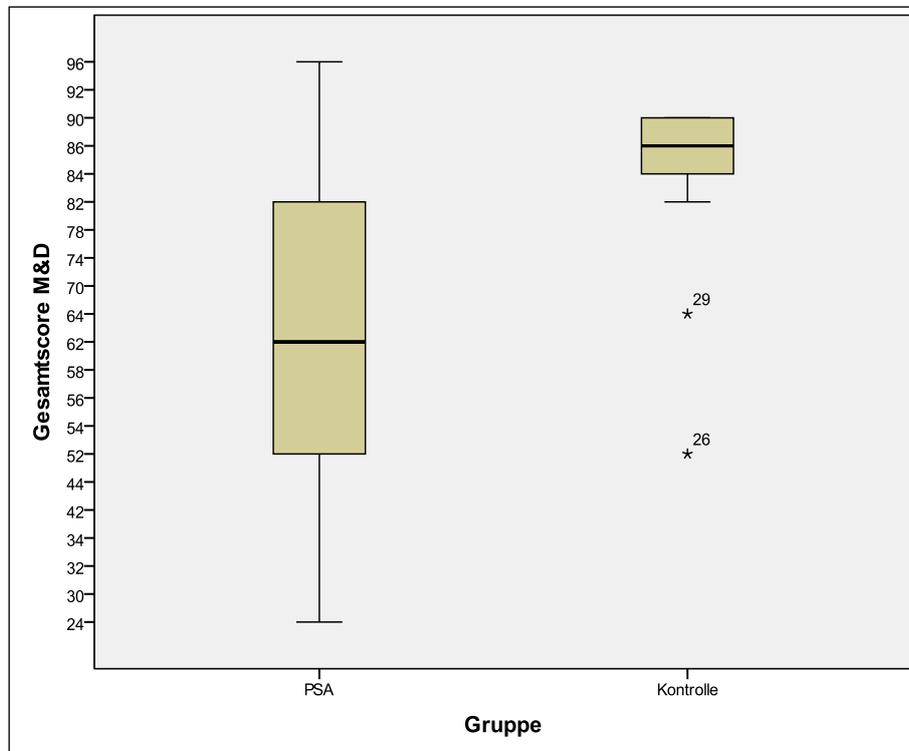


Abb. 16: Boxplots des Gesamtscores nach Merchant und Dietz (M & D) [70] in der Pseudarthrosen- (PSA) und der Kontroll-Gruppe (Kontrolle)

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der untersuchten Gruppen genauer aufgeschlüsselt.

Es zeigte sich, dass 13 Patienten (56,6 %) der PSA-Gruppe einen Score unter 70 Punkten und somit ein schlechtes Outcome hatten, während die Mehrzahl der Patienten in der Kontrollgruppe mit 6 Patienten (54,5 %) gute Ergebnisse erzielten.

Zudem zeigte sich, dass mit 47,6 % der PCR-negativen Patienten die Mehrzahl einen Score zwischen 26-32 Punkten und somit ein mäßiges Outcome hatten. In der PCR-positiven Gruppe erreichten die Patienten häufig ein gutes bzw. mäßiges Outcome.

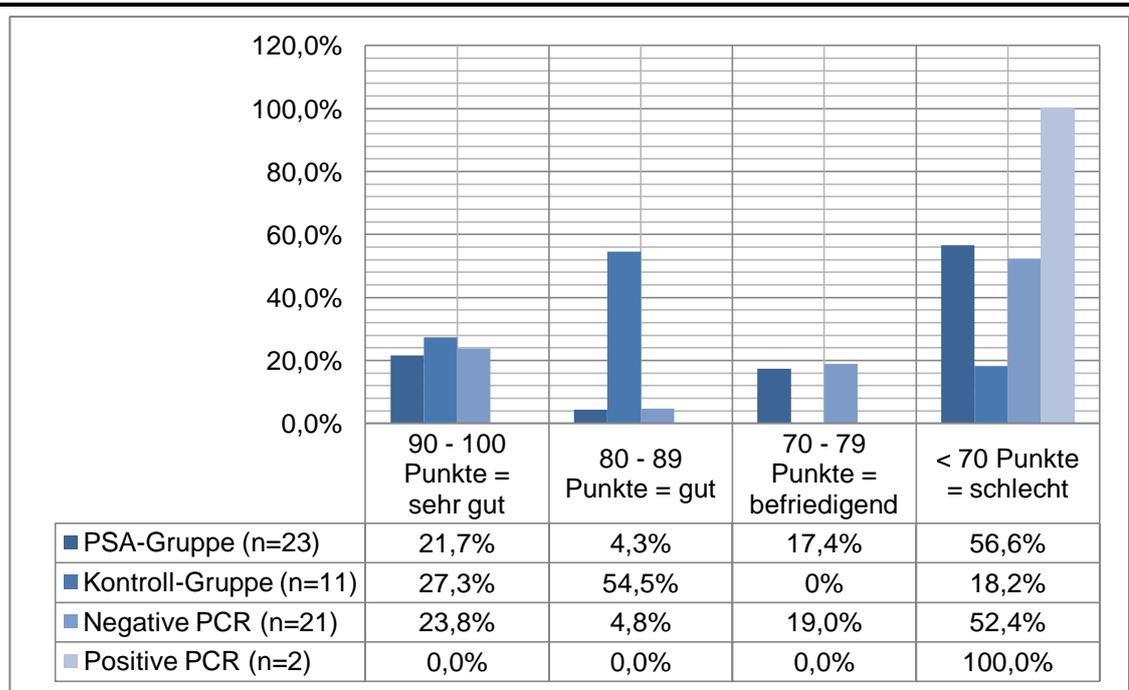


Abb. 17: Score nach Merchant und Dietz [70]

Bezüglich des Scores nach Merchant und Dietz konnte zwischen den beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied ($p = 0,013$) ermittelt werden. Hier zeigten die PSA-Patienten ebenfalls ein schlechteres Ergebnis. Zwischen den PCR-negativen und -positiven Patienten bestanden keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$).

4.3.3 Beweglichkeit des Kniegelenkes sowie Sprunggelenkes

In Tabelle 5 sind die Bewegungsausmaße für Flexion und Extension im Knie sowie im oberen Sprunggelenk (OSG) dargestellt.

Es lässt sich erkennen, dass die mittlere Beweglichkeit in der PSA-Gruppe bezogen auf das OSG schlechter war als in der Kontrollgruppe. Die Kniebeweglichkeit war tendenziell in beiden Gruppen gleich, wobei die Spanne in der PSA-Gruppe größer war.

Zudem lässt sich ersehen, dass die mittlere Beweglichkeit im OSG in der PCR-positiven Gruppe schlechter war als in der PCR-negativen. Die Kniegelenksbeweglichkeit stellte sich in beiden Gruppen gleich dar.

Gelenk / Gruppe	Knie-Flexion	Knie-Extensions-defizit	OSG-Flexion	OSG-Extension
PSA	90 – 140° (Median: 130°)	0 – 10° (Median: 5°)	0 – 50° (Median: 30°)	0 – 30° (Median: 10°)
Kontroll-Gruppe	130 – 140° (Median: 130°)	0°	20 – 50° (Median: 40°)	0 – 30° (Median: 30°)
PCR-negativ	90 – 140° (Median: 130°)	0 – 10° (Median: 5°)	0 – 50° (Median: 30°)	0 – 30° (Median: 10°)
PCR-positiv	120 – 140° (Median: 130°)	0°	5 – 25° (Median: 15°)	5 – 10° (Median: 5°)

Tab. 5: Bewegungsausmaß des Kniegelenkes sowie des oberen Sprunggelenkes (OSG)

Das Bewegungsausmaß im unteren Sprunggelenk (USG) war, wie aus Abbildung 18 ersichtlich, in beiden Gruppen mit 12 Patienten (52,2 %) bzw. 9 Patienten (81,8 %) als voll (3/3) zu werten.

Das Bewegungsausmaß im unteren Sprunggelenk (USG) war in der PCR-negativen Gruppen mit 11 Patienten (52,2 %) mehrheitlich als voll anzusehen. Im PCR-positiven Kollektiv war die Beweglichkeit jeweils hälftig als Mäßig bzw. Voll quantifizierbar.

Bezüglich der Beweglichkeit im Knie und dem oberen bzw. unteren Sprunggelenk konnte zwischen der PSA- und der Kontroll-Gruppe im Punkt Knieflexion ($p = 0,035$) und OSG-Extension ($p = 0,0006$) ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Hier zeigte die PSA-Gruppe erneut schlechtere Ergebnisse. In den restlichen Punkten sowie zwischen der PCR-negativen und -positiven Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied errechnet werden ($p \leq 0,05$).

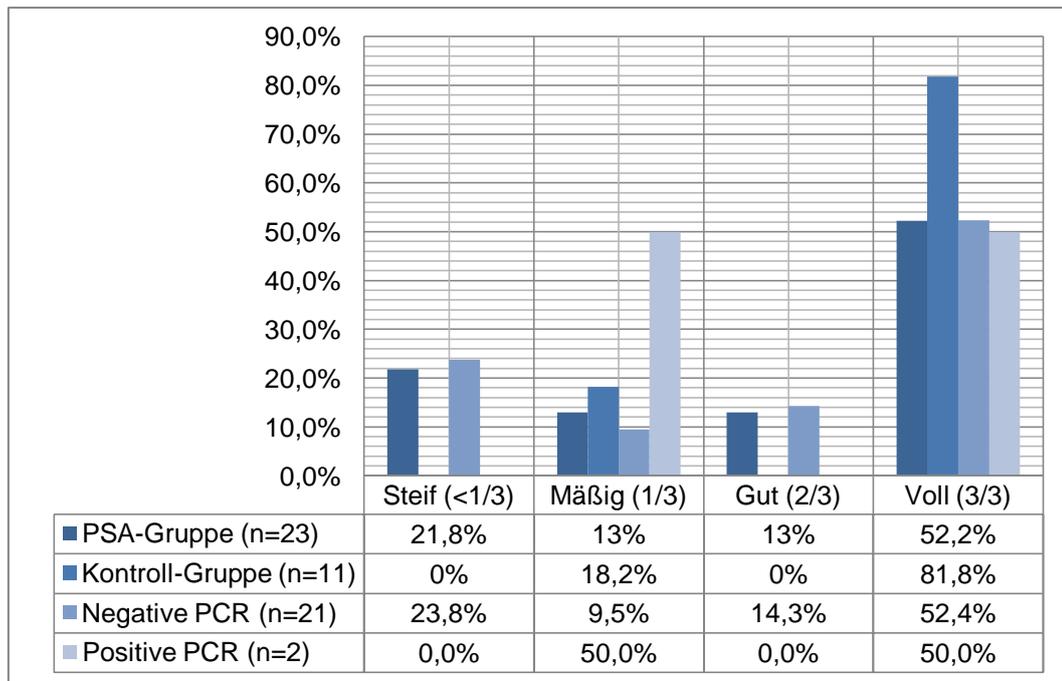


Abb. 18: Bewegungsausmaß des unteren Sprunggelenkes (USG)

4.3.4 Beinlängenverkürzung

In der Kontroll-Gruppe lag bei 81,8 % der Patienten keine Beinlängenverkürzung vor, während in der PSA-Gruppe 9 Patienten (39,2 %) mit einer Verkürzung von 2 cm auftraten.

Die PCR-positiven Patienten hatten alle eine Beinlängenverkürzung von 2 cm, während mit 57,2 % die Mehrheit der PCR-negativen Patienten keine Beinlängenverkürzung aufwiesen (siehe Abb. 19).

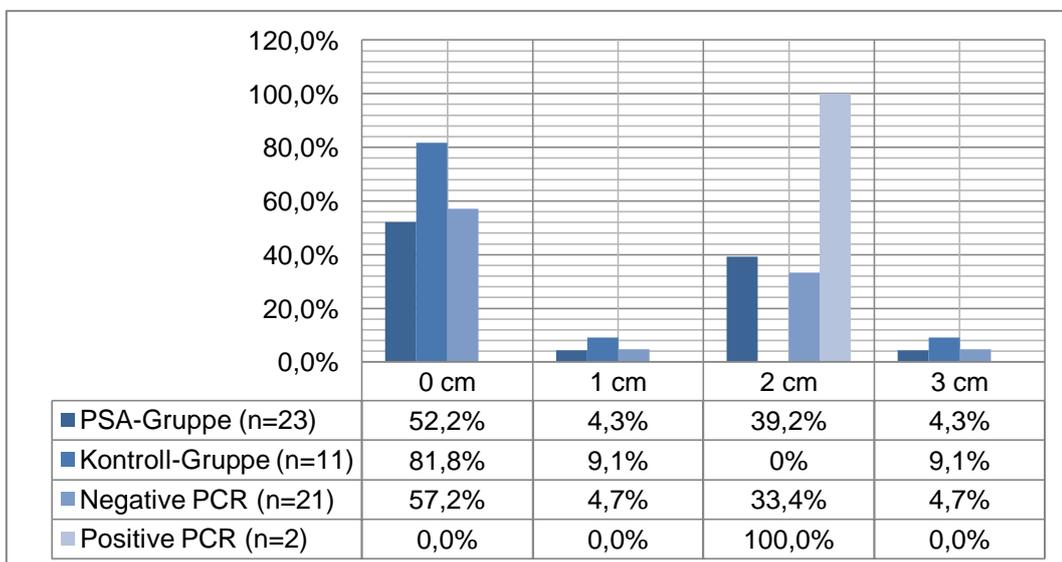


Abb. 19: Beinlängenverkürzung (in cm)

Bezüglich der Beinlängendifferenz konnte zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p \leq 0,05$).

4.3.5 Arbeitsfähigkeit

Aus Abbildung 20 wird ersichtlich, dass die PCR-positiven Patienten nur noch reduziert ihrer vorherigen Arbeit bezüglich der Stundenzahl nachgehen konnten.

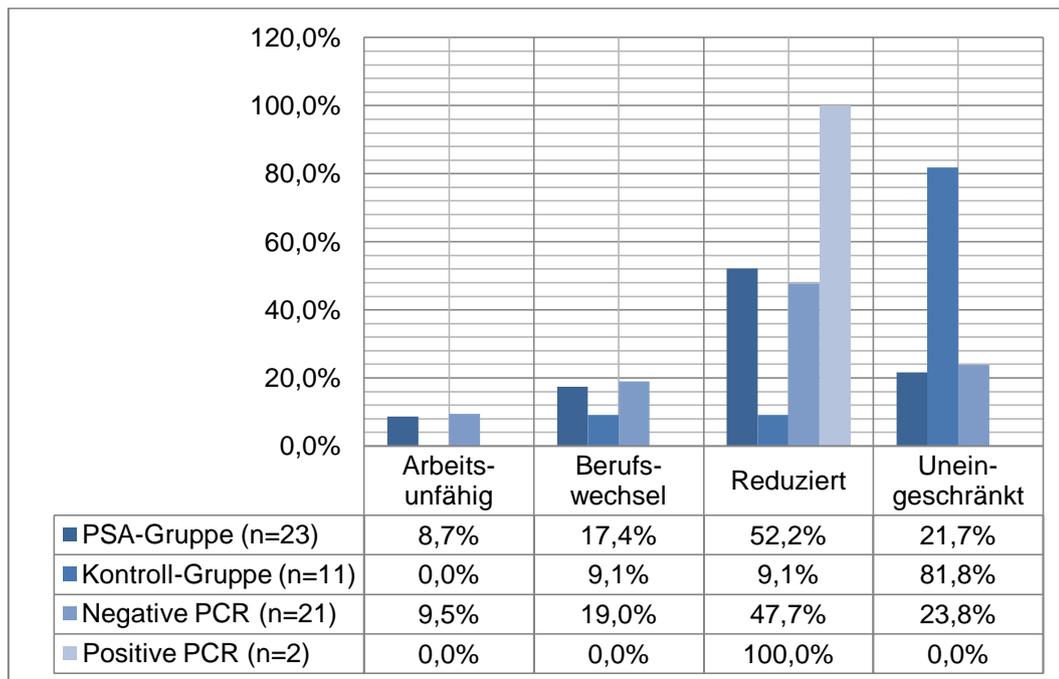


Abb. 20: Arbeitsfähigkeit

Bezüglich der Arbeitsfähigkeit konnte zwischen der PSA- und der Kontroll-Gruppe ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0066$) ermittelt werden. 52,2 % der PSA-Patienten konnten nur noch reduziert ihrer vorherigen Arbeit bezüglich der Stundenzahl nachgehen, während 81,8 % der Kontroll-Gruppe ihren Arbeitsalltag uneingeschränkt meistern konnten. Zwischen den PCR-negativen und -positiven Patienten bestanden keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$).

4.3.6 Radiologische Durchbauung

In Abbildung 21 ist die radiologische Durchbauung zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung dargestellt.

In der PSA-Gruppe waren 47,8 % der Pseudarthrosen konsolidiert, während 52,2 % keine vollständige Durchbauung zeigten. Die Kontrollgruppe wies bei 90,9 % der Frakturen eine Konsolidierung auf. Bei 9,1 % der Patienten war dies nicht der Fall.

In der PCR-positiven-Gruppe war keine der Pseudarthrosen konsolidiert. Die PCR-negative Gruppe wies bei 52,4 % der Pseudarthrosen eine Konsolidierung auf. Bei 47,6 % der Patienten war dies nicht der Fall.

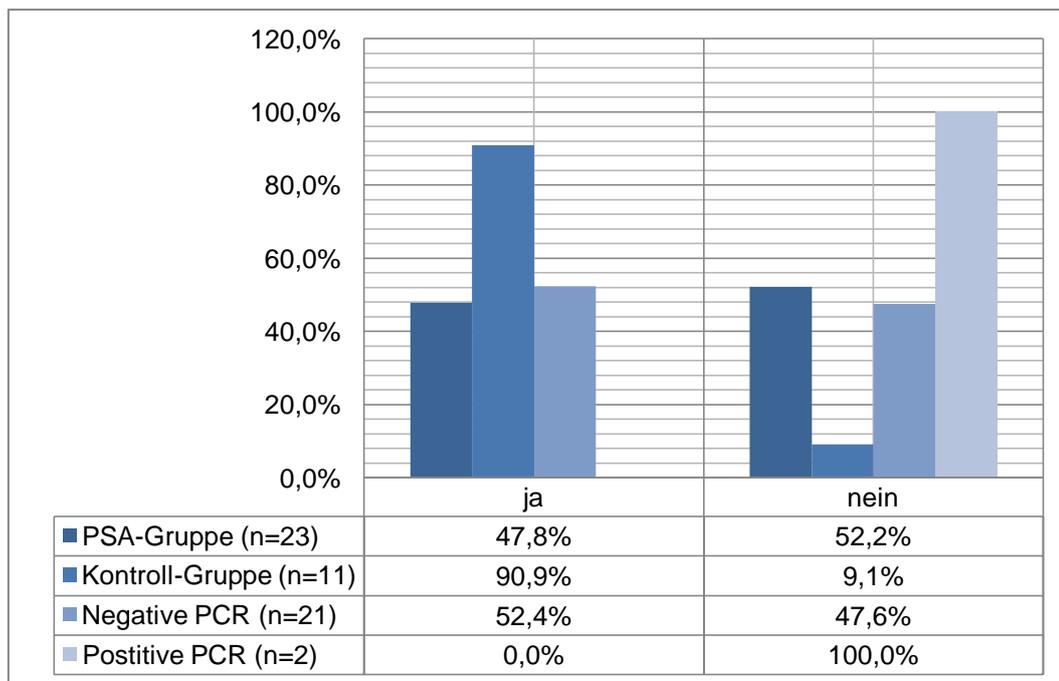


Abb. 21: Radiologische Durchbauung der Fraktur bzw. der Pseudarthrose zum Nachuntersuchungszeitpunkt

Bezüglich der Durchbauung der Fraktur bzw. der Pseudarthrose konnte zwischen der PSA- und der Kontroll-Gruppe ein signifikanter Unterschied ($p = 0,014$) ermittelt werden, wobei die PSA-Gruppe häufiger keine vollständige knöcherne Durchbauung der Pseudarthrose zeigte. Zwischen den PCR-negativen und -positiven Patienten bestanden keine signifikanten Unterschiede.

5. Diskussion

Die Diagnostik von Pseudarthrosen stellt trotz stetig wachsender Kenntnisse der pathophysiologischen Vorgänge bei verzögerten und ausbleibenden Knochenheilungen eine Herausforderung für jeden Unfallchirurgen, operativ tätigen Orthopäden und nicht zuletzt die betroffenen Patienten dar [105]. In der Praxis gestaltet sich die Differentialdiagnose zwischen aseptischen und septischen (infizierten) Pseudarthrosen häufig schwierig, ist aber von entscheidender Bedeutung, da sich die jeweiligen Behandlungskonzepte unterscheiden. Im Falle infizierter Pseudarthrosen können klinische, radiologische, labordiagnostische und intraoperative Befunde eine Verdachtsdiagnose nahelegen, aber einen endgültigen Beweis bieten diese Parameter nicht. Das diagnostische Standardverfahren zur Detektion einer Infektpseudarthrose bzw. septischer Knochenprozesse stellt die mikroskopische Untersuchung des Gewebes sowie das Anfertigen einer Bakterienkultur dar [69]. Diesen Verfahren wird allerdings angelastet, eine niedrige Sensitivität zu besitzen [29]. Gerade im Falle der sogenannten Low-grade-Infekte ist der kulturelle sowie histologische Nachweis der Krankheitserreger bzw. der geweblichen Entzündungsreaktion häufig nicht oder nur sehr schwer möglich [58, 124]. Verfahren wie die 3-Phasen-Skelettszintigraphie, die Gallium-67-Zitrat-Szintigraphie oder die Technetium-99m-Antigranulozytenszintigraphie können im Falle eines Infektes die Infektausdehnung quantifizieren, haben aber aufgrund differierender Studienlage noch keinen Einzug in den klinischen Alltag gefunden [69]. Die Fluor-18-Desoxyglucose-Positionsemissionstomographie zeigt vielversprechende Ergebnisse in Hinblick auf eine Infektabklärung, wobei die Fallzahlen in den bisherigen Studien klein sind und sich auf periprothetische Infektionen bei Kniegelenksendoprothesen beziehen [3, 33]. Insgesamt gilt die Bakterien-Kultur zum direkten Erregernachweis trotz der von diversen Autoren berichteten niedrigen Sensitivität bis heute als „Goldstandard“ in Bezug auf die Diagnostik bei Infektpseudarthrosen [29, 58, 124].

In dieser Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen, ob sich bei kulturell aseptischen Tibiapseudarthrosen mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. PCR) bakterienspezifische 16S rRNA nachweisen und somit der Beweis einer Infektion bzw. eines Low-grade-Infektes erbringen lässt. Die PCR gilt als geeignetes diagnostisches Verfahren, da von einer hohen Sensitivität und Spezifität in Bezug auf die Detektion bakteriellen Genoms berichtet wird [30]. So konnten Szczesny et al. im Rahmen der Primärversorgung von Tibiafrakturen bereits den Nachweis bakterieller DNA in Fällen negativer Kulturen erbringen [107]. Der sichere Nachweis einer Infektion würde eine optimierte operative sowie antibakterielle Therapie erlauben und wäre gerade im Falle einer Low-grade-Infektion ein laut Baumann et al. „unbestreitbarer Erfolg“ [82].

Neben dem DNA-Nachweis wurde im Rahmen einer konsekutiven Nachuntersuchung das klinische Outcome der Patienten mittels zweier Scores erhoben. Da infizierte Pseudarthrosen häufig mit Komplikationen (z.B. Knochennekrosen) und schlechteren Ausheilungsergebnissen assoziiert sind [22, 52, 53], wäre im Falle des Nachweises bakteriellen Genoms ein schlechteres Outcome zu erwarten.

Die Fokussierung auf meta-diaphysäre Tibiapseudarthrosen fiel vor dem Hintergrund, dass die Fraktur des Unterschenkels den häufigsten Knochenbruch der unteren Extremität darstellt und diaphysäre Frakturen in bis zu 20 % der Fälle pseudarthrotisch verheilen [22, 38, 52].

5.1 Patientenkollektiv

Die prospektive Rekrutierung eines geeigneten Patientenkollektivs für die vorliegende Multicenter-Studie war möglich, da das Berufsgenossenschaftliche Unfallkrankenhaus Hamburg – Boberg mit seiner Abteilung für septische Knochen-, Gelenks- und Wiederherstellungschirurgie sowie der angeschlossenen Berufsgenossenschaftlichen Abteilung am UKSH Schleswig-Holstein, Campus Lübeck einen Versorgungs- und Forschungsschwerpunkt in der Diagnostik und Therapie von Pseudarthrosen inne hat [24, 69].

In der aktuellen Literatur finden sich keine Studien zur Anwendung der 16S rRNA-PCR bei kulturell aseptischen Pseudarthrosen mit vergleichbarer Studienpopulation. Kordelle et al. sowie Ince et al. veröffentlichen Studien zur Detektion bakteriellen Genoms bei Knie- und Hüftendoprothesen-Wechseloperationen mittels 16S rRNA-PCR in Fällen negativer Kulturen [45, 55]. Die Größe der Kollektive entsprach mit 22 bzw. 24 Patienten der Gruppenstärke dieser Studie.

Gesamtkollektiv

Kasperczyk et al. analysierten über einen Zeitraum von 13 Jahren diaphysäre Pseudarthrosen unter verschiedenen Gesichtspunkten und waren so in der Lage, Langzeitergebnisse zur Epidemiologie ausbleibender Knochenheilungen im Schaftbereich langer Röhrenknochen zu erarbeiten [52]. Es handelte sich insgesamt um 392 Fälle, wobei 216 (55 %) die Tibia, jeweils 65 (16,6 %) den Oberschenkel und den Unterarm sowie 46 (11,8 %) den Oberarm betrafen. 56 % der untersuchten Tibiapseudarthrosen waren als aseptisch und 44 % als septisch eingestuft worden. Diese Daten zeigen, dass Pseudarthrosen mit Abstand am häufigsten die Tibia betreffen und diese nahezu hälftig infektassoziiert sind. An der oberen Extremität waren im Vergleich dazu der weitaus größte Teil (93 % am Oberarm bzw. 91 % am Unterarm) aseptischer Genese. Die vergleichsweise hohe Inzidenz septischer Pseudarthrosen an der Tibia liegt in der sehr dünnen ventromedialen Weichteildeckung sowie der kritischen Durchblutungssituation begründet [98]. Der spärliche Weichteilmantel prädisponiert zu offenen Frakturen und so kann die Rate an der Tibia bis zu 70 % betragen [52]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen dem Grad des Weichteilschadens und der Infektionsrate besteht. So gehen z.B. offene Frakturen Grad IIIB nach Gustilo mit einem Infektionsrisiko zwischen 25 – 50 % einher [26, 96]. Das vorliegende Kollektiv zeigte mit 52,2 % offener Frakturen in der Pseudarthrosen-Gruppe sowie 50 % in der Kontroll-Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Zudem lag die Rate offener Brüche ca. 20 % unter derer von Kasperczyk et al. publizierten Zahl. Andere Autoren berichten von ca. 25 %

offener Frakturen an der Tibia [26], so dass das Kollektiv dieser Studie mit ca. 50 % offener Frakturen einen Mittelwert abzubilden scheint.

In puncto Alters- und Geschlechterverteilung bei Tibiapseudarthrosen konnten Kasperczyk et al. ein Durchschnittsalter von 33 Jahren und ein Überwiegen des männlichen Geschlechts mit 74 % aufzeigen [52]. Die vorliegenden Daten wiesen im Mittel ein Alter von 42 Jahren in der Pseudarthrosen-Gruppe bzw. 48,5 Jahren in der Kontroll-Gruppe sowie mit 73,9 % (Pseudarthrosen-Gruppe) bzw. 83,3 % (Kontroll-Gruppe) ebenfalls ein Überwiegen des männlichen Geschlechts auf. Den Grund dafür sehen Strecker et al. sowie Muller et al. in einer erhöhten Risikobereitschaft des männlichen Geschlechts mittleren Alters [73, 103]. So sind unter Männern deutlich häufiger Motorrad- und Sportunfälle sowie offene Frakturen zu verzeichnen als beim weiblichen Geschlecht gleichen Alters.

In der Zusammenfassung ist das Patientengut der vorliegenden Studie in Bezug auf die Alters- und Geschlechterverteilung sowie der Rate an offenen und geschlossenen Frakturen mit den Angaben der Literatur vergleichbar [52]. Zudem konnte mittels der univariaten Varianzanalyse gezeigt werden, dass sich die verglichenen Gruppen bezüglich Alter, Geschlechterverteilung, Klassifikation der Frakturen und des Weichteiltraumas, des Unfallmechanismus sowie des Verletzungsmusters nicht signifikant unterschieden und dadurch vergleichbar waren. Interessanterweise fand sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,01$) in der initialen osteosynthetischen Versorgung. Die Pseudarthrosen-Gruppe wies in 39,1 % der Fälle eine Versorgung mittels UTN (unaufgebohrter Tibianagel) auf, während kein Patient der Kontroll-Gruppe diese Art der Marknagelung erfuhr. Kappus et al. berichteten vor diesem Hintergrund auch aufgrund der biomechanisch bedingten geringeren Eigenstabilität des UTNs von höheren Pseudarthrosenraten als bei der aufgebohrten Form des Tibianagels [51]. Desweiteren zeigten die Autoren auf, dass bei Verwendung eines UTN geringere Infektionsraten zu finden sind als bei der aufgebohrten Form. Im vorliegenden Kollektiv zeigten alle mittels UTN versorgten Patienten keine Infektion. Den Grund dafür sehen die Autoren in einer Schonung der endostalen sowie der kortikalen Durchblutung.

PCR-positives Kollektiv

Statistische Signifikanzen bezüglich der epidemiologischen Daten konnten aufgrund des kleinen Patientenkollektivs mit positiver PCR nicht errechnet werden. Auffällig jedoch war, dass alle PCR-positiven Patienten männlichen Geschlechts waren. In der aktuellen Literatur finden sich keine Aussagen über die Geschlechter-assoziierte Inzidenz septischer Tibiapseudarthrosen. Dennoch ist aufgrund der höheren Inzidenz von Tibiafrakturen beim männlichen Geschlecht eine Bevorzugung desselbigen wahrscheinlich. So zeigen aktuelle Studien zu septischen Tibiapseudarthrosen, wie z.B. von Demir et al. mit 87,5 % überwiegend männliche Patienten [20]. Das mittlere Alter der PCR-positiven Patienten war mit 37,5 Jahren in jener Altersgruppe angesiedelt, welche am häufigsten von Tibiapseudarthrosen betroffen ist [52].

5.2 Material und Methoden

Die bis heute gültigen „Goldstandards“ in der Diagnostik septischer Pseudarthrosen sind die mikroskopische Untersuchung des Gewebes sowie die Bakterienkultur mittels intraoperativ oder bioptisch gewonnenen Proben [69]. Diese Methoden sind neben der Tatsache, dass sie eine niedrige Sensitivität besitzen auch störanfällig [45]. So kann eine prä- und / oder perioperative Antibiotikaapplikation, eine lange Transportzeit ins bakteriologische Labor, das Vorhandensein avitaler Bakterien in den entnommenen Proben, die Ausbildung eines Biofilms auf dem Osteosynthesematerial, eine zu geringe Quantität der Erreger in der Probe oder das Vorhandensein sog. „small colony variants“ (SCV) zu negativen Ergebnissen in Kultur und Mikroskopie führen [58, 113]. SCV befinden sich in einem nicht vermehrungsfähigen, intrazellulärem Stadium und siedeln sich im Biofilm an der Grenzschicht zu künstlichen Oberflächen an [82, 92]. Meist handelt es sich um Staphylokokken-Stämme, die mit den klassischen Methoden nicht zuverlässig kultivierbar sind [58, 124]. Zudem wird berichtet, dass nach offenen Frakturen die Kultur in bis zu 83 % der Fälle ein Bakterienwachstum anzeigt, wobei die Unterscheidung zwischen Kontamination und normaler Hautflora häufig schwierig ist [88, 106]. Ein weiteres Problem der herkömmlichen Methoden, insbesondere der Bakterien-

Kultur, ist die Dauer der erforderlichen mehrtägigen Bebrütungszeit. Zudem zeigten Amann et al., dass 99 % aller Mikroorganismen aus verschiedenen Ökosystemen unter Laborbedingungen nicht kultivierbar sind [2]. Auch eine ganze Reihe humanpathogener Keime gehören dazu [86, 87].

Um die Sensitivität und Spezifität der Kulturen zu erhöhen, wurden die Kulturen in der aktuellen Untersuchung für 14 Tage inkubiert. Die gefundenen Bakterien unterliefen einer Empfindlichkeitsprüfung entsprechend dem Deutschen Institut für Normung (DIN 58 940) [21]. Dieses Protokoll wurde speziell zur Detektion von Fremdkörper-assoziierten-Infektionen entwickelt und bereits von Ince et al. in einer Studie zum Nachweis von Low-grade-Infekten bei kulturell aseptischen Hüft-TEP-Lockerungen mittels 16S rRNA-PCR verwendet [45]. Zudem wurde, wie in aktuellen Übersichtsarbeiten gefordert, eine antibiotische Therapie 14 Tage vor Entnahme der Proben beendet, um die Rate an falsch-negativen Ergebnissen zu reduzieren [69].

Viele Autoren fordern aufgrund der oben beschriebenen Problematiken Nachweisverfahren mit höherer Sensitivität. Gerade in Bezug auf Low-grade-Infekte würde ein sicherer Nachweis dieser Infektionsart wesentliche therapeutische Konsequenzen mit sich bringen [76, 102, 115]. Der Nachweis bakterieller 16S rRNA mittels PCR, wie er in dieser Arbeit verfolgt wurde, zeigt einen möglichen Lösungsansatz dieser Problematik auf, da ein negativer Nachweis von Bakterien mittels Kultur oder Histologie kein definitives Ausschlusskriterium einer Infektion darstellt [32, 100]. Es wird postuliert, dass die PCR zur Detektion bakterieller 16S rRNA der konventionellen Kultur überlegen ist, da sie über eine höhere Sensitivität verfügt und eine Antibiotikatherapie ohne Einfluss auf die Genauigkeit der Methode sein soll, weil schon kleinste Mengen an Bakterien-DNA nachgewiesen werden können [30, 117]. Auch die Zeit bis zu einem Ergebnis kann mit dieser Methode deutlich verkürzt werden, da es im Schnitt 5 Stunden dauert bis ein Ergebnis vorliegt und nicht mehrere Tage wie im Rahmen einer kulturellen Anzucht der Erreger [55]. Mittels der 16S rRNA-PCR ist es bereits gelungen nicht-kultivierbare Erreger zu detektieren, die eine Reihe von Infektionen hervorrufen können, wie z.B. Meningitis oder septische Arthritis [46, 77].

Die Polymerase-Ketten-Reaktion weist eine sehr hohe Empfindlichkeit auf, was das Verfahren anfällig für falsch-positive Ergebnisse macht. Theoretisch ist schon eine einzige Kopie des Genmaterials ausreichend. Hierin liegt die Anfälligkeit einer Kontamination begründet [67]. Um diese Gefahr zu minimieren, wurden in der aktuellen Studie alle Untersuchungsschritte mit gewonnener Bakterien-DNA jeweils vor und nach der PCR in separat dafür vorgesehen Räumen und mit separaten Geräten und Pipetten ausgeführt. Zudem wurden die Lösungen, in welchen die Proben aufbewahrt wurden, auf das Vorhandensein bakterieller 16S rRNA untersucht. In allen Fällen zeigten sich negative Ergebnisse, so dass hier eine Kontamination der Proben ausgeschlossen werden konnte. Desweiteren wurden während der Untersuchungsprozesse Positiv- und Negativ-Kontrollen mitgeführt.

Um die erhobenen Nachuntersuchungsergebnisse mit anderen Studien vergleichbar zu machen, wurden standardisierte Scores verwendet.

Der Score nach Merchant und Dietz wurde benutzt, da er als Score im Langzeitverlauf speziell für Tibia- und Fibulaschaftfrakturen entwickelt wurde [70]. Die Entscheidung für den Score in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O'Beirne fiel, da er sich für Nachuntersuchungen von Tibiafrakturen bewährt hat und bereits für Nachuntersuchungen im Rahmen von Tibiapseudarthrosen von Mückley et al. benutzt worden ist [28, 72, 78]. Die am häufigsten für Nachuntersuchungen verwendeten Scores wie z.B. der Tegner Aktivitätsscore war nicht geeignet, da er ein sehr hohes Anforderungsprofil an den Patienten stellt und die Patienten in dieser Studie z.T. multipel voroperiert waren und schwere, teils offene Frakturen aufwiesen [111].

5.3 Ergebnisse

5.3.1 PCR

Der Nachweis bakterieller 16S rRNA mittels PCR als Indikator für das Vorhandensein krankheitserregender Mikroorganismen stellt eine akzeptierte Methode in Wissenschaft und klinischem Alltag dar [35].

Canvin et al. wiesen in kulturell aseptischer Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthritis 16S rRNA der Spezies *Staphylokokkus aureus* nach und erbrachten so mittels PCR den Beweis einer septischen Arthritis [15]. Ni et al. gelang der Nachweis von Meningokokken als ursächliches Agens für Meningitiden mittels 16S rRNA-PCR, während die angelegten Kulturen kein Nachweis erbringen konnten [77]. Studien zum Erregernachweis aus infizierten Herzklappen bei Endokarditispatienten zeigten im Falle der PCR eine Sensitivität von 41 bis 93 % sowie eine Spezifität von 92 bis 100 %, während die Kultur eine niedrigere Sensitivität mit 8 bis 72 % bei gleicher Spezifität von 93,7 bis 100 % zeigte. Noch bemerkenswerter allerdings war, dass in 20 bis 33 % der evaluierten Fälle die PCR zum Erregernachweis führte, während ein kultureller Nachweis misslang [12, 13, 31].

Die Detektion bakterienspezifischer 16S rRNA zum Nachweis bakterieller Erreger bei kulturell aseptischen metadiaphysären Tibiapseudarthrosen wurde erstmals in dieser Studie evaluiert. In der vorliegenden Arbeit konnte in 8,7 % der Fälle mit negativer Kultur bakterielle 16S rRNA mittels PCR nachgewiesen werden, wobei es sich um *Methylobakterien* sowie um *Staphylokokken* handelte. Dass *Staphylokokken* für bis zu 70 % der septischen Pseudarthrosen verantwortlich sind, ist in der Literatur gut belegt [39, 71]. Auch im Rahmen von Low-grade-Infektionen sind *Staphylokokken*-Stämme die am häufigsten nachgewiesenen Bakterien [82].

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit dem Einsatz der 16S rRNA-PCR bei periprothetischen Infektionen. Tunney et al. untersuchten 118 femorale Komponenten nach einem Hüft-TEP-Wechsel und fanden in 72 % der Fälle bakterielles Genom mittels PCR, während nur 4 % der Kulturen bakterielles Wachstum aufzeigten [116]. Durch eine Ultraschallbehandlung, die sog. Sonifikation des Biofilms auf der Oberfläche der Prothesen, gelang zwar in 22 % der Fälle ein Bakteriennachweis per Kultur, lag aber immer noch signifikant unter der Nachweisrate mittels PCR. Tunney folgerte, dass die Inzidenz von Infektionen bei prothetischen Gelenkersätzen deutlich unterschätzt wird. Es fehlten in dieser Studie jedoch klinische Verlaufskontrollen, um eine Aussage zur klinischen Relevanz eines positiven DNA-Nachweises machen zu können.

Mariani et al. gelang es in 32 von 50 Gelenkpunktaten, die präoperativ bei symptomatischen Knie-TEP-Patienten entnommen wurden, über eine PCR den Beweis einer periprothetischen Infektion zu führen [67]. Eine angefertigte Kultur aus denselben Materialien führte nur in 6 Fällen zu einem Keimnachweis.

In einer aktuellen prospektiven Studie zum Vergleich der PCR mit der Kultur bei prothetischen Gelenkersatz-Infektionen, konnten Gallo et al. eine Sensitivität der PCR von 71 % sowie eine Spezifität von 97 % nachweisen [29]. Die Kultur zeigte bei einer Sensitivität von 44 % und einer Spezifität von 94 % signifikant schlechtere Ergebnisse. Dem Vorwurf falsch-positiver Befunde entgegneten Gallo et al. mit dem Argument, dass der positive sowie negative prädiktive Wert den der Kultur ebenfalls übersteigt, wobei auf die Wichtigkeit einer korrekten Ausführung der molekularbiologischen Methoden hingewiesen wird. Hoeffel et al. berichtet in Übereinstimmung mit Gallo von einer Sensitivität der PCR von 71 % sowie einem positiven bzw. negativen prädiktiven Wert von 22 % bzw. 7 % im Vergleich mit der herkömmlichen Kultur [42]. Beide Autoren folgerten, dass die PCR zwar nicht als Screening-Methode für muskuloskelettale Infektionen dienen sollte, aber gerade nach antibiotischer Vorbehandlung zur Bestätigung einer Infektion sinnvoll sein kann.

Neben diesen durchaus vielversprechenden Ergebnissen kamen andere Arbeitsgruppen zu weniger positiven Resultaten. In einer Studie zum Wert der 16S rRNA-PCR zur Infektdetektion bei Endoprothesenrevisionseingriffen zeigten Kordelle et al. auf, dass Kultur und PCR in Korrelation mit dem histologischen Befund eine identische Sensitivität, Spezifität sowie positiven und negativen prädiktiven Wert hätten [55]. Sie folgerten, dass der Einsatz der PCR somit keine rechtfertigende Grundlage besitzt. Panousis et al. untersuchten 92 Patienten mit periprothetischen Infektionen und konnten in knapp 30 % der Fälle einen positiven PCR-Nachweis führen [81]. Im Vergleich dazu konnte klinisch und histologisch in 12 % sowie mikrobiologisch in 23 % eine Infektion aufgezeigt werden. In Korrelation der Ergebnisse interpretierten die Autoren ihre Daten insofern, als dass die PCR aufgrund falsch-positiver Ergebnisse einen schlechten prädiktiven Wert besitzt. Hier ist allerdings kritisch anzumerken, dass in dieser Studie die klinische Infektionsdiagnose als

Goldstandard angesehen wurde, welche in anderen Studien als ungenau und mit einer hohen Interobservervariabilität beschrieben wird [29, 30, 45]. In einer aktuellen Studie untersuchten Kobayashi et al. kulturell aseptische Komponenten von Hüft- und Knieendoprothesen nach einer Wechsellagerung mittels 16S rRNA-PCR [54]. Dabei benutzten sie eine Universal- sowie eine Spezies-spezifische PCR für das Genus *Staphylokokkus*, da diese die häufigsten Erreger Implantat-assoziiertes Infektionen darstellen [69]. Zwar konnte in 12 % der Fälle negativer Kulturen bakterielles Genom nachgewiesen werden, dennoch konnte keine endgültige Aussage zur Wertigkeit dieser Methode abgeleitet werden. Zum einen konnte nicht abschließend bewertet werden, ob es sich bei den nachgewiesenen Bakterien um lebende Organismen handelte und zum anderen wurde angemerkt, dass ein Goldstandard als Referenzmethode für die Infektionsdiagnostik im Falle periprothetischer Infektionen fehlen würde. Auch De Man et al. konnten aufgrund einer Sensitivität der 16S rRNA-PCR von lediglich 50 % bei periprothetischen Infektionen keine generelle Empfehlung zum Gebrauch dieser Methode geben [19]. Sie stellten allerdings fest, dass die Sensitivität in der Diagnostik periprothetischer Infektionen mittels PCR in Verbindung mit der Kultur auf bis zu 67 % steigt. Vandercam et al. zeigten im Falle einer kombinierten Diagnostik beider Methoden, dass die Detektionsrate periprothetischer Infektionen von 73,5 % auf 91,2 % steigt [118]. Ince et al. untersuchten im Rahmen von klinisch und kulturell aseptischen Hüftprothesen-Wechsellagerungen intraoperativ entnommene Gewebeproben mittels PCR, um der Fragestellung nachzugehen, ob Prothesen-Lockerungen auf Low-grade-Infektionen zurückzuführen sind [45]. Es konnte lediglich in einem Fall der molekularbiologische Nachweis von 16S rRNA erbracht werden, während die Kultur kein bakterielles Wachstum zeigte. Ihre Schlussfolgerung war, dass die 16S rRNA-PCR zur Detektion von Low-grade-Infektionen keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn für den Fall birgt, dass die mikrobiologische Diagnostik adäquat ist.

In Zusammenschau der Ergebnisse sind einige Autoren der Auffassung, dass im Rahmen von Gelenk- und Protheseninfektionen die Sensitivität und Spezifität der 16S rRNA-PCR der Kultur deutlich überlegen sind bzw. dass

mittels PCR deutlich höhere Raten an bakterieller Besiedlung von initial „aseptischen“ Endoprothesenlockerungen nachgewiesen werden konnten [17, 29, 116]. Im Gegensatz hierzu fanden andere Autoren eine vergleichbar niedrige Sensitivität und Spezifität von PCR und Kultur [45, 55]. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung legen nahe, dass die Kombination einer Bakterien-Kultur mit einer 16S rRNA-PCR die Detektionsrate von infizierten Pseudarthrosen erhöhen kann.

Möglicherweise kann die Sonifikation von Biofilmen auf Implantatoberflächen zukünftig den Nachweis von Erregern verbessern. So konnten Trampuz et al. in einer Arbeit zur Anwendung der Sonifikation an entfernten Knie- und Hüftendoprothesen zeigen, dass 10.000-mal mehr Bakterien als mit Gewebeproben nachgewiesen werden können [114]. Achermann et al. zeigten in einer kürzlich durchgeführten Studie, dass eine 16S rRNA-PCR mit Sonifikationsflüssigkeit eine signifikant bessere Sensitivität im Vergleich zur Sonifikationskultur besitzt [1].

5.3.2 Nachuntersuchungsergebnisse

Die Größe des Kollektivs dieser Studie entsprach mit 23 Pseudarthrose-Patienten den meisten vergleichbaren Studien in der aktuellen Literatur [30, 55]. Es muss festgehalten werden, dass ca. 50 % aller Pseudarthrosen initial als sicher septisch diagnostiziert werden können, was das Patientengut für Studien dieser Art noch weiter einschränkt und in der vorliegenden Studie als Ausschlusskriterium definiert war [52]. In den bis dato publizierten Studien zum Einsatz der 16S rRNA-PCR fehlen klinische Follow-up-Untersuchungen, was kritisch zu bewerten ist [54, 118]. In dieser Studie wurden alle Patienten mittels zweier standardisierter Scores nachuntersucht, um das klinische Outcome evaluieren zu können. Pseudarthrosen, insbesondere infizierte, gehen häufig mit Komplikationen und schlechteren Ausheilungsergebnissen einher [22, 53]. Der Vergleich zwischen der Pseudarthrose- und der Kontroll-Gruppe bestätigt diese Annahme insofern, als dass die Pseudarthrose-Gruppe in beiden Scores signifikant schlechtere Ausheilungsergebnisse zeigte. Zwischen der PCR-positiven und –negativen Gruppe konnten, aufgrund der zu geringen Quantität der PCR-positiven Patienten, keine signifikanten Unterschiede errechnet

werden. Es ergaben sich jedoch einige Tendenzen. Die PCR-positiven Patienten hatten eine Beinlängenverkürzung von 2 cm zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung. In der PCR-negativen Gruppe dagegen wies der Großteil der Patienten (57,2 %) keine Beinlängenverkürzung auf. Infizierte Pseudarthrosen an der wenig weichteilgedeckten Tibia sind laut Fleischmann et al. häufig durch ausgedehnte knöcherne Defekte charakterisiert [27]. Gründe hierfür sind zum einen die Bakterien selbst, welche durch Exo- sowie Endotoxine den Prozess der Weichteil- und Knochennekrotisierung bedingen und zum anderen das von vielen Autoren geforderte radikale Debridement des infizierten Knochenareals [53, 69]. Dass die Infektionsrate mit dem Weichteiltrauma bzw. dem Grad der offenen Fraktur direkt korreliert, konnten Schwabe et al. in einer Übersichtsarbeit zu Extremitätenfrakturen mit schwerem offenen Weichteiltrauma zeigen [96]. Aber auch geschlossene Tibia-Frakturen gehen in bis zu 28 % der Fälle mit einer Infektion nach operativer Versorgung einher [22, 96]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie, als dass ein positiver PCR-Nachweis sowohl bei geschlossenen als auch bei offenen Frakturen gelang.

Die Zeit bis zur Ausheilung wird bei septischen Pseudarthrosen wesentlich länger als bei aseptischen Verläufen angegeben [22, 53, 95, 120]. Grund hierfür ist, dass eine Infektion für den Fall einer nicht adäquaten Behandlung oder einer nicht bzw. zu spät gestellten Diagnose einen Gewebeuntergang nach sich zieht, die Defektstrecke vergrößert, die Instabilität erhöht und in letzter Konsequenz zu einer Lockerung oder gar einem Bruch des Implantates führen kann [120]. So wiesen die PCR-positiven Patienten keine vollständige radiologisch knöcherne Durchbauung zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung auf, während mit 52,4 % über die Hälfte der PCR-negativen Patienten eine komplette radiologische Konsolidierung zeigten. Die Kontroll-Gruppe dagegen zeigte mit 90,9 % eine knöcherne Durchbauung.

Insgesamt war das Outcome der Pseudarthrose-Gruppe im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikant schlechter. Ein Unterschied zwischen der PCR-positiven und -negativen Gruppe konnte statistisch nicht ermittelt werden, jedoch war ein positiver PCR-Nachweis mit schlechten Ausheilungsergebnissen verbunden. Hier werden längere

Beobachtungszeiträume sowie ein größeres Patientenkollektiv zukünftig mehr Klarheit bringen.

Diese Studie widmet sich erstmalig dem Nachweis bakterieller 16S rRNA mittels PCR zur Infekt-Detektion im Fall kulturell aseptischer metadiaphysärer Tibiapseudarthrosen. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass sich über eine 16S rRNA-PCR bakterielles Genom bei aseptischen Prothesenlockerungen und Low-grade-Infektionen von Hüft- und Knieendoprothesen nachweisen lässt. Diese Studie konnte den Beweis erbringen, dass sich bakterielles Genom in kulturell aseptischen Tibiapseudarthrosen finden lässt. Die mittels PCR detektierten Erreger waren Staphylokokken sowie Methylobakterien. In diesen Fällen konnte kein Bakterienwachstum in Form der herkömmlichen Bakterienkultur aufgezeigt werden. Demnach ist es möglich die Detektionsrate von septischen Pseudarthrosen mittels der in dieser Studie angewandten 16S rRNA-PCR zu erhöhen. Eine routinemäßige klinische Anwendung der 16S rRNA-PCR zur Detektion bakterieller Erreger bei Pseudarthrosen scheint verfrüht, dennoch liegt nahe, dass gerade im Rahmen einer antibiotischen Vorbehandlung die Polymerase-Ketten-Reaktion zu höheren Detektionsraten entzündlicher Prozesse führt als ein kultureller Nachweis. Rampini et al. verglichen in einer kürzlich publizierten prospektiven Studie die 16S rRNA-PCR mit der Bakterienkultur bei einem nicht-selektierten Krankengut. Sie untersuchten 394 Patienten-Proben, welche unterschiedliche Entzündungsherde, wie z.B. Psoasabszesse, Hirnabszesse, Herzklappenentzündungen u.a., aufwiesen. Gallo et al. evaluierten die 16S rRNA-PCR in der Diagnostik infizierter Endoprothesen. Beide Autoren empfehlen übereinstimmend die Anwendung der 16S rRNA-PCR für den Fall einer antibiotischen Vorbehandlung [29, 84].

In Anbetracht der Ergebnisse dieser Studie sind weitergehende Forschungen mit einem größeren Patientenkollektiv und einem längeren Beobachtungszeitraum erforderlich, um so die Diagnostik und damit verbunden die Therapie metadiaphysärer Pseudarthrosen weiter optimieren zu können.

6. Zusammenfassung

In der Diagnostik septischer Pseudarthrosen stellen die Anfertigung einer Bakterienkultur sowie die histologische Untersuchung des Gewebes den aktuell gültigen „Goldstandard“ dar. Diesen Verfahren werden allerdings, gerade im Fall von Low-grade-Infektionen, eine niedrige Sensitivität angelastet. In dieser prospektiven Multicenter-Studie wurden kulturell aseptische metadiaphysäre Tibiapseudarthrosen mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) auf das Vorhandensein bakterienspezifischer 16S rRNA untersucht. Es sollte aufgezeigt werden, dass sich trotz negativer Bakterienkultur und klinisch unauffälligen Befunden, bakterielles Genom in Tibiapseudarthrosen nachweisen lässt und somit der Beweis einer Infektion erbracht werden kann. Die PCR gilt als geeignetes sowie etabliertes diagnostisches Verfahren, da von einer hohen Sensitivität in Bezug auf die Detektion bakteriellen Genoms berichtet wird. Desweiteren wurde anhand einer Nachuntersuchung das klinische Outcome der Patienten mittels zweier Scores evaluiert.

In diese Studie einbezogen waren 35 Patienten, von denen sich 23 einer Pseudarthrosenrevision nach stattgehabter metadiaphysärer Tibiafraktur unterzogen. Als Kontroll-Gruppe dienten 12 Patienten mit Tibiaschaftfraktur, die im gleichen Zeitraum mittels offener Reposition und interner Fixation operiert wurden. Die Studie wurde nach positivem Votum der Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck begonnen.

In beiden Kollektiven wurde während der Pseudarthrosen-Revision bzw. der Frakturversorgung intraoperatives Material aus dem OP-Gebiet gewonnen und einer 16S rRNA-PCR sowie einer Bakterienkultur zugeführt. Alle Patienten zeigten präoperativ keine klinischen Infektzeichen. In allen Fällen der Pseudarthrosen ergaben die Kulturen kein Bakterienwachstum, während mittels PCR bei 8,7 % der Patienten ein Erregernachweis gelang.

Die Nachuntersuchungsergebnisse zeigten im Vergleich der Kontroll- mit der Pseudarthrose-Gruppe signifikant schlechtere Ausheilungsergebnisse in der Pseudarthrose-Gruppe. Der Nachweis bakteriellen Genoms mittels 16S rRNA-PCR war ebenfalls mit schlechteren Ausheilungsergebnissen korreliert.

Die vorliegende Studie konnte erstmals den Beweis erbringen, dass es möglich ist, mittels einer 16S rRNA-PCR bakterielles Genom in kulturell aseptischen Tibiapseudarthrosen nachzuweisen und so das Vorliegen einer Infektion aufzuzeigen. Es bedarf weiterer Studien mit größeren Patientenkollektiven vor einer routinemäßigen klinischen Anwendung der 16S rRNA-PCR in der Diagnostik septischer Tibiapseudarthrosen.

7. Literaturverzeichnis

1. Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wust J, Trampuz A (2010) Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol* 48:1208-1214
2. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169
3. Arens R (2003) Unterschenkel ; 5 Tabellen, in: Tscherne Unfallchirurgie, Unterschenkel. Springer-Verlag Kapitel 7:197 - 230
4. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DW, Simpson H, Peto TE, McLardy-Smith P, Berendt AR (1998) Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol* 36:2932-2939
5. Barrack RL, Jennings RW, Wolfe MW, Bertot AJ (1997) The Coventry Award. The value of preoperative aspiration before total knee revision. *Clin Orthop Relat Res*:8-16
6. Bauer GC, Edwards P, Widmark PH (1962) Shaft fractures of the tibia. Etiology of poor results in a consecutive series of 173 fractures. *Acta Chir Scand* 124:386-395
7. Baumann M (2010) Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4). *Nephrologe*, Vol. 5, Nr. 5, 324-325
8. Bednarski AE, Elgin SC, Pakrasi HB (2005) An inquiry into protein structure and genetic disease: introducing undergraduates to bioinformatics in a large introductory course. *Cell Biol Educ* 4:207-220
9. Bengtson S (1993) Prosthetic osteomyelitis with special reference to the knee: risks, treatment and costs. *Ann Med* 25:523-529
10. Berchtold (2006) *Chirurgie*. Springer-Verlag 5. Auflage
11. Blick SS, Brumback RJ, Poka A, Burgess AR, Ebraheim NA (1986) Compartment syndrome in open tibial fractures. *J Bone Joint Surg Am* 68:1348-1353
12. Bosshard PP, Kronenberg A, Zbinden R, Rued C, Bottger EC, Altwegg M (2003) Etiologic diagnosis of infective endocarditis by broad-range polymerase chain reaction: a 3-year experience. *Clin Infect Dis* 37:167-172
13. Breikopf C, Hammel D, Scheld HH, Peters G, Becker K (2005) Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis. *Circulation* 111:1415-1421
14. Buhren V (2000) Intramedullary compression nailing of long tubular bones. *Unfallchirurg* 103:708-720
15. Canvin JM, Goutcher SC, Hagig M, Gemmell CG, Sturrock RD (1997) Persistence of *Staphylococcus aureus* as detected by polymerase chain

-
- reaction in the synovial fluid of a patient with septic arthritis. *Br J Rheumatol* 36:203-206
16. Caselitz FH (1969) Halbflüssiges Kombinationsmedium zur Züchtung anaerober Bakterien. *Aerztl Lab* 15:426-430
 17. Clarke MT, Roberts CP, Lee PT, Gray J, Keene GS, Rushton N (2004) Polymerase chain reaction can detect bacterial DNA in aseptically loose total hip arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res*:132-137
 18. Conterno LO, da Silva Filho CR (2009) Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev*:CD004439
 19. De Man FH, Graber P, Luem M, Zimmerli W, Ochsner PE, Sendi P (2009) Broad-range PCR in selected episodes of prosthetic joint infection. *Infection* 37:292-294
 20. Demir B, Gursu S, Oke R, Konya NM, Ozturk K, Sahin V (2009) Shortening and secondary relengthening for chronically infected tibial pseudarthroses with poor soft tissues. *J Orthop Sci* 14:525-534
 21. Edelmann A, Pietzcker T, Wellinghausen N (2007) Comparison of direct disk diffusion and standard microtitre broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates. *J Med Microbiol* 56:202-207
 22. Ekkernkamp A, Muhr G (1996) Infected pseudarthrosis. *Unfallchirurg* 99:913
 23. Ekkernkamp A, Muhr G, Josten C (1996) Infected pseudarthrosis. *Unfallchirurg* 99:914-924
 24. Faschingbauer M (2010) You never stop learning! Nor does the implantat. *Trauma Berufskrankh: 1 - 5 Springer-Verlag*
 25. Fehring TK, McAlister JA, Jr. (1994) Frozen histologic section as a guide to sepsis in revision joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*:229-237
 26. Fellingner M SR (2003) Geschlossene Schien- und Wadenbeinbrüche. In: *Tscherne Unfallchirurgie: Unterschenkel, Band 9, Springer Verlag.*
 27. Fleischmann W, Suger G, Kinzl L (1992) Treatment of bone and soft tissue defects in infected nonunion. *Acta Orthop Belg* 58 Suppl 1:227-235
 28. Folleras G, Ahlo A, Stromsoe K, Ekeland E, Thoresen BO (1990) Locked intramedullary nailing of fractures of femur and tibia. *Injury* 21:385-388
 29. Gallo J, Kolar M, Dendis M, Loveckova Y, Sauer P, Zapletalova J, Koukalova D (2008) Culture and PCR analysis of joint fluid in the diagnosis of prosthetic joint infection. *New Microbiol* 31:97-104
 30. Gallo J, Raska M, Dendis M, Florschütz AV, Kolar M (2004) Molecular diagnosis of prosthetic joint infection. A review of evidence. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 148:123-129
 31. Gauduchon V, Chalabreysse L, Etienne J, Celard M, Benito Y, Lepidi H, Thivolet-Bejui F, Vandenesch F (2003) Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *J Clin Microbiol* 41:763-766

32. Gerlach et al. (2002) Pseudarthrosen und Infektionen proximaler Oberschenkel. *Trauma Berufskrankh* 4: 482 - 486
33. Gollwitzer H, Diehl P, Gerdesmeyer L, Mittelmeier W (2006) [Diagnostic strategies in cases of suspected periprosthetic infection of the knee. A review of the literature and current recommendations]. *Orthopade* 35:904, 906-908, 910-906
34. Gonschorek et al. (2005) Pseudarthrosen an Femur und Tibia. Behandlung mit Kompressionsmarknageltechnik. *Trauma Berufskrankh* 2005 7: 258 - 265
35. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D (1994) PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 32:335-351
36. Grosser V WM, Bohn B et al. (2003) Ökonomische Auswirkungen einer erfolgreichen sekundären Rekonstruktion im Bereich der unteren Extremität. *Trauma Berufskrankh [Suppl 1]* 3: 138-142
37. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN (1984) Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma* 24:742-746
38. Harris I, Lyons M (2005) Reoperation rate in diaphyseal tibia fractures. *ANZ J Surg* 75:1041-1044
39. Harwood PJ, Talbot C, Dimoutsos M, Sunderland G, Shaw D, Wilcox MH, Giannoudis PV (2006) Early experience with linezolid for infections in orthopaedics. *Injury* 37:818-826
40. Hayda RA, Brighton CT, Esterhai JL, Jr. (1998) Pathophysiology of delayed healing. *Clin Orthop Relat Res*:S31-40
41. Heppert et al. (2005) Infekt- / Defektpseudarthrosen. *Trauma Berufskrankh* 2005 [Suppl 1] 7: 110 - 119
42. Hoeffel DP, Hinrichs SH, Garvin KL (1999) Molecular diagnostics for the detection of musculoskeletal infection. *Clin Orthop Relat Res*:37-46
43. Hof H (2005) *Duale Reihe: Medizinische Mikrobiologie*, 3. Aufl., Georg Thieme Verlag.
44. Hofmann A, Mattyasovszky SG, Bruning C, Ritz U, Mehling I, Meurer A, Rommens PM (2009) [Osteoblasts : cellular and molecular regulatory mechanisms in fracture healing]. *Orthopade* 38:1009-1019
45. Ince A, Rupp J, Frommelt L, Katzer A, Gille J, Lohr JF (2004) Is "aseptic" loosening of the prosthetic cup after total hip replacement due to nonculturable bacterial pathogens in patients with low-grade infection? *Clin Infect Dis* 39:1599-1603
46. Ince A, Tiemer B, Gille J, Boos C, Russlies M (2002) Total knee arthroplasty infection due to *Abiotrophia defectiva*. *J Med Microbiol* 51:899-902
47. Jacobs et al. (2008) Growth hormones and BMP *Trauma Berufskrankh [Suppl 2]* 10: 226 - 229

-
48. James J, Steijn-Myagkaya GL (1986) Death of osteocytes. Electron microscopy after in vitro ischaemia. *J Bone Joint Surg Br* 68:620-624
 49. Johner R, Wruhs O (1983) Classification of tibial shaft fractures and correlation with results after rigid internal fixation. *Clin Orthop Relat Res*:7-25
 50. Kaminski et al. (2002) Pseudarthrosis, malunions and changing procedures in the lower leg region. *trauma Berufskrankh* 2002 4: 107 - 113
 51. Kappus et al. (2001) Marknagelung gebohrt versus unaufgebohrt. *Trauma Berufskh*, 3(2), 125-129
 52. Kasperczyk WJ, Mahlke L, Tscherne H (1996) Diaphyseal pseudarthroses. Epidemiology and outcome. *Orthopade* 25:416-428
 53. Kinzl L, Suger G (1996) Infected pseudarthrosis. *Orthopade* 25:478-483
 54. Kobayashi N, Procop GW, Krebs V, Kobayashi H, Bauer TW (2008) Molecular identification of bacteria from aseptically loose implants. *Clin Orthop Relat Res* 466:1716-1725
 55. Kordelle J, Hossain H, Stahl U, Schleicher I, Haas H (2004) Usefulness of 16S rDNA polymerase-chain-reaction (PCR) in the intraoperative detection of infection in revision of failed arthroplasties. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 142:571-576
 56. Kordelle J, Klett R, Stahl U, Hossain H, Schleicher I, Haas H (2004) Infection diagnosis after knee-TEP-implantation. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 142:337-343
 57. Kortmann H.-R. BG (2004) Pseudarthrosen an oberer und unterer Extremität. Springer-Verlag, Berlin
 58. Krimmer V, Merkert H, von Eiff C, Frosch M, Eulert J, Lohr JF, Hacker J, Ziebuhr W (1999) Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 37:2667-2673
 59. Kuner EH, Berwarth H, Lucke SV (1996) Treatment principles in aseptic pseudarthrosis. *Orthopade* 25:394-404
 60. Kwiatkowski TC, Hanley EN, Jr., Ramp WK (1996) Cigarette smoking and its orthopedic consequences. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 25:590-597
 61. Lawton DM, Andrew JG, Marsh DR, Hoyland JA, Freemont AJ (1999) Expression of the gene encoding the matrix gla protein by mature osteoblasts in human fracture non-unions. *Mol Pathol* 52:92-96
 62. Lawton DM, Andrew JG, Marsh DR, Hoyland JA, Freemont AJ (1997) Mature osteoblasts in human non-union fractures express collagen type III. *Mol Pathol* 50:194-197
 63. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, Bail HJ, Schutze N, Jakob F, Schell H (2009) Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J Orthop Res* 27:1133-1140

-
64. Lodenkamper H, Stienen G (1956) Therapy of anaerobic infections. *Dtsch Med Wochenschr* 81:1226
 65. Lonner JH, Desai P, Dicesare PE, Steiner G, Zuckerman JD (1996) The reliability of analysis of intraoperative frozen sections for identifying active infection during revision hip or knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 78:1553-1558
 66. Macey LR, Kana SM, Jingushi S, Terek RM, Borretos J, Bolander ME (1989) Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. *J Bone Joint Surg Am* 71:722-733
 67. Mariani BD, Martin DS, Levine MJ, Booth RE, Jr., Tuan RS (1996) The Coventry Award. Polymerase chain reaction detection of bacterial infection in total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*:11-22
 68. Martin (1920) Über experimentelle Pseudarthrosenbildung und die Bedeutung von Periost und Mark. *Arch Klein Chir* 114:664
 69. Meiners J, Gerlach U, Magerlein S, Jurgens C, Faschingbauer M (2009) Pseudo-arthroses. *Chirurg* 80:979-986
 70. Merchant TC, Dietz FR (1989) Long-term follow-up after fractures of the tibial and fibular shafts. *J Bone Joint Surg Am* 71:599-606
 71. Motsitsi SN (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infected pseudo-arthrosis of the distal tibia treated with debridement, mesh cage, autologous grafting and locking plate fixation. *Strategies Trauma Limb Reconstr* 3:97-99
 72. Mückley et al. (2006) Use of an intramedullary compression nail for the management of tibial nonunion. *Phys Med Rehab Kuror*; 16: 24-30
 73. Muller CA, Dietrich M, Morakis P, Pfister U (1998) Clinical results of primary intramedullary osteosynthesis with the unreamed AO/ASIF tibial intramedullary nail of open tibial shaft fractures. *Unfallchirurg* 101:830-837
 74. Müller ME AM, Schneider R, Willenegger H (1990) *Manual der Osteosynthese*, 3. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
 75. Mullis K, Faloon F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273
 76. Neut D, van Horn JR, van Kooten TG, van der Mei HC, Busscher HJ (2003) Detection of biomaterial-associated infections in orthopaedic joint implants. *Clin Orthop Relat Res*:261-268
 77. Ni H, Knight AI, Cartwright K, Palmer WH, McFadden J (1992) Polymerase chain reaction for diagnosis of meningococcal meningitis. *Lancet* 340:1432-1434
 78. O'Beirne J, Seigne P, McElwain JP (1992) Interlocking intramedullary nailing for the treatment of tibial fractures. *Ir J Med Sci* 161:5-8
 79. Oestern HJ, Tscherne H (1983) Physiopathology and classification of soft tissue lesion. *Hefte Unfallheilkd* 162:1-10

-
80. Oheim R, Gille J, Schoop R, Magerlein S, Grimme CH, Jurgens C, Gerlach UJ (2011) Surgical therapy of hip-joint empyema. Is the Girdlestone arthroplasty still up to date? *Int Orthop*
 81. Panousis K, Grigoris P, Butcher I, Rana B, Reilly JH, Hamblen DL (2005) Poor predictive value of broad-range PCR for the detection of arthroplasty infection in 92 cases. *Acta Orthop* 76:341-346
 82. Peters KM, König DP, Baumann B, Rader CP (2008) Ätiologie und Pathogenese der periprothetischen Osteolyse. In: Peters KM, König DP (eds) *Fortbildung Osteologie 2*. Steinkopff, pp 57-69
 83. Praemer et al. (1992) *Muskuloskeletal conditions in the United States*. American Academy of Orthopaedic-Surgeons, Park Ridge, Illinois 192:pp85-124
 84. Rampini SK, Bloemberg GV, Keller PM, Buchler AC, Dollenmaier G, Speck RF, Bottger EC (2011) Broad-range 16S rRNA gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 53:1245-1251
 85. Rehn J, Lies A (1981) Pathogenesis of the pseudarthroses: diagnosis and therapy (author's transl). *Unfallheilkunde* 84:1-13
 86. Relman DA (1993) The identification of uncultured microbial pathogens. *J Infect Dis* 168:1-8
 87. Relman DA (1999) The search for unrecognized pathogens. *Science* 284:1308-1310
 88. Robinson D, On E, Hadas N, Halperin N, Hofman S, Boldur I (1989) Microbiologic flora contaminating open fractures: its significance in the choice of primary antibiotic agents and the likelihood of deep wound infection. *J Orthop Trauma* 3:283-286
 89. Rommens PM, Claes P, De Boodt P, Stappaerts KH, Broos PL (1994) Therapeutic procedure and long-term results in tibial pilon fracture in relation to primary soft tissue damage. *Unfallchirurg* 97:39-46
 90. Rothman RH, Klemek JS, Toton JJ (1971) The effect of iron deficiency anemia on fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 77:276-283
 91. Runkel M, Rommens PM (2000) Pseudoarthrosis. *Unfallchirurg* 103:51-63; quiz 63
 92. Schierholz JM, Morsczeck C, Brenner N, König DP, Yucel N, Korenkov M, Neugebauer E, Rump AF, Waalenkamp G, Beuth J, Pulverer G, Arens S (2004) Special aspects of implant-associated infection in orthopedic surgery. From the pathophysiology to custom-tailored prevention strategies. *Orthopade* 33:397-404
 93. Schmidt-Bleek K, Schell H, Kolar P, Pfaff M, Perka C, Buttgerit F, Duda G, Lienau J (2009) Cellular composition of the initial fracture hematoma compared to a muscle hematoma: a study in sheep. *J Orthop Res* 27:1147-1151

-
94. Schmidt-Rohlfing B, Tzioupis C, Menzel CL, Pape HC (2009) Tissue engineering of bone tissue. Principles and clinical applications. *Unfallchirurg* 112:785-794; quiz 795
 95. Schmidt (2003) Treatment of infected gap nonunions of the lower extremities. *Trauma Berufskrankh* 2003 [Suppl 2] 5: 318 - 327
 96. Schwabe P, Haas NP, Schaser KD (2010) Fractures of the extremities with severe open soft tissue damage. Initial management and reconstructive treatment strategies. *Unfallchirurg* 113:647-670; quiz 671-642
 97. Schweiberer L, Baumgart R, Deiler S (1999) The biological reaction in atrophic and hypertrophic pseudarthrosis of diaphysis of long bone. Causes and forms of appearance. *Chirurg* 70:1193-1201
 98. Schweiberer L, Schenk R (1977) [istomorphology and vascularization of secondary healing of bone fractures with emphasis on tibial shaft fractures (author's transl). *Unfallheilkunde* 80:275-286
 99. Seebach C, Henrich D, Tewksbury R, Wilhelm K, Marzi I (2007) Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcif Tissue Int* 80:294-300
 100. Simank HG, Wadi B, Bernd L (2004) Joint empyema. *Orthopade* 33:327-331
 101. Spangehl MJ, Masri BA, O'Connell JX, Duncan CP (1999) Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am* 81:672-683
 102. Stoodley P, Kathju S, Hu FZ, Erdos G, Levenson JE, Mehta N, Dice B, Johnson S, Hall-Stoodley L, Nistico L, Sotereanos N, Sewecke J, Post JC, Ehrlich GD (2005) Molecular and imaging techniques for bacterial biofilms in joint arthroplasty infections. *Clin Orthop Relat Res*:31-40
 103. Strecker W, Suger G, Kinzl L (1996) Local complications of intramedullary nailing. *Orthopade* 25:274-291
 104. Streicher G, Reilmann H (2008) Distal tibial fractures. *Unfallchirurg* 111:905-918
 105. Sturmer KM (1996) Pathophysiology of disrupted bone healing. *Orthopade* 25:386-393
 106. Swinson BD, Morrison CM, Sinclair JS (2002) Pyoderma gangrenosum--a complication of breast biopsy. *Ulster Med J* 71:66-67
 107. Szczesny G, Interewicz B, Swoboda-Kopec E, Olszewski WL, Gorecki A, Wasilewski P (2008) Bacteriology of callus of closed fractures of tibia and femur. *J Trauma* 65:837-842
 108. Szczesny G, Olszewski WL, Swoboda-Kopec E, Zagozda M, Czapnik Z, Interewicz B, Stachyra E, Maziarz M, Gorecki A (2010) Genetic factors predisposing to bone fracture non-union. A role of single point mutation

-
- Asp299Gly TLR4 on pathogen-evoked healing. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol* 75:57-63
109. Szczesny G, Olszewski WL, Zagozda M, Rutkowska J, Czapnik Z, Swoboda-Kopec E, Gorecki A (2010) Genetic factors responsible for long bone fractures non-union. *Arch Orthop Trauma Surg*
 110. Tang YW, Ellis NM, Hopkins MK, Smith DH, Dodge DE, Persing DH (1998) Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 36:3674-3679
 111. Tegner Y, Lysholm J (1985) Rating systems in the evaluation of knee ligament injuries. *Clin Orthop Relat Res*:43-49
 112. Thompson SM (2003) Constructing and refining multiple sequence alignments with PileUp, SeqLab, and the GCG suite. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 3:Unit 3 6
 113. Trampuz A, Osmon DR, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R (2003) Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clin Orthop Relat Res*:69-88
 114. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greenleaf JF, Patel R (2007) Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 357:654-663
 115. Trampuz A, Widmer AF (2006) Infections associated with orthopedic implants. *Curr Opin Infect Dis* 19:349-356
 116. Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR, Anderson N, Davis RI, Hanna D, Ramage G (1998) Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg Br* 80:568-572
 117. van der Heijden IM, Wilbrink B, Vije AE, Schouls LM, Breedveld FC, Tak PP (1999) Detection of bacterial DNA in serial synovial samples obtained during antibiotic treatment from patients with septic arthritis. *Arthritis Rheum* 42:2198-2203
 118. Vandercam B, Jeumont S, Cornu O, Yombi JC, Lecouvet F, Lefevre P, Irenge LM, Gala JL (2008) Amplification-based DNA analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection. *J Mol Diagn* 10:537-543
 119. Weber BG (1973) *Pseudarthrosen*. Huber, Bern Stuttgart Wien
 120. Weise K (2001) Management of infected non-unions of long bones with defects. *Trauma Berufskrankh [Suppl 4]* 3: 491 - 497
 121. Wilbrink B, van der Heijden IM, Schouls LM, van Embden JD, Hazes JM, Breedveld FC, Tak PP (1998) Detection of bacterial DNA in joint samples from patients with undifferentiated arthritis and reactive arthritis, using polymerase chain reaction with universal 16S ribosomal RNA primers. *Arthritis Rheum* 41:535-543
 122. Wirth C (1992) *Pseudarthrosen*. In: Jäger M, Wirth CJ (Hrsg.) *Praxis der Orthopädie*. 2. Aufl., Thieme, Stuttgart New York. 284 - 291

-
123. Wirtz DC, Rader C, Reichel H, Baumann B, Fuerst M, Kirschner S, Lohmann C, Nuechtern JV, Ruether W, Seifert JD, Zustin J (2008) Versagensursachen primärer Implantationen. In: Revisionsendoprothetik der Hüftpfanne. Springer Berlin Heidelberg, pp 11-53
 124. Ziebuhr W, Loessner I, Krimmer V, Hacker J (2001) Methods to detect and analyze phenotypic variation in biofilm-forming Staphylococci. *Methods Enzymol* 336:195-205
 125. Zilkens KW (1983) Incidence of pseudarthrosis and localization over a 35-year period. *Unfallheilkunde* 86:392-399

8.2 Score in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O´Beirne [28, 72, 78]

	Sehr gut	Gut	Mäßig	Schlecht
Knieflexion	> 120°	120°	90°	< 90°
Extensions- defizit	5°	10°	15°	> 15°
OSG- Extension	> 20°	20°	10°	< 10°
OSG-Flexion	> 30°	30°	20 – 29°	< 20°
Pronation / Supination	3 / 3	2 / 3	1 / 3	< 1 / 3
Beinlängen- verkürzung	1 cm	2 cm	3 cm	> 3 cm
Schwell- neigung	Keine	Gering	Mäßig	Stark
Schmerz- zustand	Keine	Selten	Signifikant	Häufig
Arbeits- fähigkeit	Unein- geschränkt	reduziert	Berufs- wechsel	Arbeits- unfähig
Zufriedenheit	Sehr zufrieden	zufrieden	Mäßig	Enttäuscht

<u>Einzelpunkte</u>		<u>Gesamtpunktzahl</u>
Sehr gut	= 1 Punkt	10 - 17 Punkte = Sehr gut
Gut	= 2 Punkte	18 - 25 Punkte = Gut
Mäßig	= 3 Punkte	26 - 32 Punkte = Mäßig
Schlecht	= 4 Punkte	ab 33 Punkten = Schlecht

8.3 Verwendete Materialien

NucleoSpin Extract II Kit (Fa. Macherey / Nagel, Artikel-Nr.: 740 609)

Precellys-System (Fa. Peqlab, Artikel-Nr.: 91-PCS-CKM)

QiaAmp DNA Minikit (Fa. Qiagen, Artikel-Nr.: 51306)

Moltag-Kit 16S DNA free 100 U (Fa. Molzym, Artikel-Nr.: P-019-0200)

PCR-Kombi-Kit (Fa. Seqlab, Artikel-Nr.: 85050)

Elektrophorese-Gel (Fa. Invitrogen, Artikel-Nr.: G-6018-02)

LC-Fast Start DNA Master SYBR Green (Fa. Roche, Artikel-Nr.: 12 239 264)

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1, S. 12: Klassifikation der Pseudarthrosen nach Weber und Czech [119]
- Abb. 2, S. 15: Häufigkeit von Keimen bei Infektpseudarthrosen (in %, modifiziert nach [39, 41, 71])
- Abb. 3, S. 19: Hypertrophe („Elefantenfuß“) Tibiapseudarthrose bei einem 35jährigen Patienten 8 Monate nach operativer Versorgung mittels Marknagel
- Abb. 4, S. 24 : Schematischer Aufbau des bakteriellen 70S-Ribosoms (modifiziert nach: [43])
- Abb. 5, S. 38: Boxplots zur Altersverteilung (in Jahren) in der Pseudarthrosen- (PSA) und der Kontroll-Gruppe (Kontrolle)
- Abb. 6, S. 39: Boxplots der CRP-Werte (in mg / l) in der Pseudarthrosen- (PSA) und der Kontroll-Gruppe (Kontrolle), [Norm CRP: ≤ 5 mg /l]
- Abb. 7, S. 40: Boxplots der Leukozyten-Werte (in μ l) in der Pseudarthrosen- (PSA) und der Kontroll-Gruppe (Kontrolle), [Norm Leukozyten: 1200 – 8000 / μ l]
- Abb. 8, S. 41: Klassifikation der Tibia-Frakturen nach AO (in %)
- Abb. 9, S. 42: Offene und geschlossene Frakturen (in %)
- Abb. 10, S. 43: Offene Frakturen nach der Einteilung von Gustilo et al. [37]
- Abb. 11, S. 44: Weichteilschäden bei geschlossenen Frakturen nach der Einteilung von Tscherne et al. [79] (in %)
- Abb. 12, S. 45: Initiale Versorgung der Fraktur (in %, UTN = unaufgebohrter Tibia Nagel)
- Abb. 13, S. 46: Versorgung der Pseudarthrose in der PSA-Gruppe mit negativer sowie positiver PCR (in %, UTN = unaufgebohrter Tibia Nagel)

-
- Abb. 14, S. 48: Boxplots des Gesamtscores in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O´Beirne (F & O´B) [28, 78] in der Pseudarthrosen- (PSA) und der Kontroll-Gruppe (Kontrolle)
- Abb. 15, S. 49: Score in Anlehnung an die Einteilung von Folleras und O´Beirne [28, 78] (F & O´B)
- Abb. 16, S. 50: Boxplots des Gesamtscores nach Merchant und Dietz (M & D) [70] in der Pseudarthrosen- (PSA) und der Kontroll-Gruppe (Kontrolle)
- Abb. 17, S. 51: Score nach Merchant und Dietz (M & D) [70]
- Abb. 18, S. 53: Bewegungsausmaß des unteren Sprunggelenkes (USG)
- Abb. 19, S. 53: Beinlängenverkürzung (in cm)
- Abb. 20, S. 54: Arbeitsfähigkeit
- Abb. 21, S. 55: Radiologische Durchbauung der Fraktur bzw. der Pseudarthrose zum Nachuntersuchungszeitpunkt

9.2 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1, S. 29: Sequenzen der Universal-Primer der 16S rRNA-PCR
- Tab. 2, S. 31: Primer-Sequenzen der PDH-PCR
- Tab. 3, S. 33: Klassifikation der offenen Frakturen nach Gustilo et al. [37]
- Tab. 4, S. 34: Einteilung der Weichteilschäden bei geschlossenen Frakturen nach Tscherne et al. [79]
- Tab. 5, S. 52: Bewegungsausmaß des Kniegelenkes sowie des oberen Sprunggelenkes (OSG)

10. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Christian Jürgens und Herrn Professor Dr. med. Andreas Paech danke ich dafür, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, meine Untersuchungen in der von ihnen geleiteten Klinik durchzuführen.

Herrn PD Dr. med. Justus Gille danke ich für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und seine fortwährende Unterstützung.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Dr. Steffen Wallstabe für die Bereitstellung der Patientenproben aus dem Berufsgenossenschaftlichen Unfallkrankenhaus, Hamburg.

Herrn PD Dr. Arndt-Peter Schulz danke ich für ein allzeit offenes Ohr.

Frau Angela Gravenhorst danke ich für die gewissenhafte Umsetzung der mikro- und molekularbiologischen Versuche.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung danke ich Dr. Friedrich Pahlke.

Meiner Frau Sandra danke ich für die die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit. Und zu guter Letzt meinen Eltern, die mir alles ermöglicht haben.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefan Bark
Geburtsdatum: 18.08.1980
Geburtsort: Lübeck
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: verheiratet

Akademische und schulische Ausbildung

10/2006 – 11/12 **Studium der Humanmedizin**
Medizinische Universität zu Lübeck,
1. Ärztl. Prüfung (Physikum) im Herbst 2008,
2. Ärztl. Prüfung im Oktober und November 2012

10/2002 bis 09/2005 **Ausbildung zum staatl. anerkannten
Physiotherapeuten**
Grone Schule Lübeck

06/2001 **Abitur**
Thomas-Mann-Schule zu Lübeck

Praktisches Jahr

Innere Medizin: Universitätsklinikum S-H, Campus Lübeck, Medizinische
Kliniken I - III

Chirurgie: Universitätsklinikum S-H, Campus Lübeck, Klinik für
Chirurgie sowie Klinik für Chirurgie des Stütz- und
Bewegungsapparates (Sektion für Unfallchirurgie)

Wahlfach: Universitätsklinikum S-H, Campus Lübeck, Klinik für
Chirurgie des Stütz- und Bewegungsapparates (Sektion
für Orthopädie)

Dissertation und Publikation

06/2010 – 12/2012 Dissertation an der Medizinischen Universität zu Lübeck,
Titel: Die 16S rRNA-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)
zum Erregernachweis bei kulturell aseptischen
Tibiapseudarthrosen (Doktorvater: PD Dr. Justus Gille)

AMIC cartilage repair in a professional soccer player.

Bark S, Riepenhof H, Gille J

Case Rep Orthop. 2012: 364342. doi:
10.1155/2012/364342. Epub 2012 Sep 17

Infiltrationsbehandlung bei Muskelläsionen

Gille J, Bark S, Herzog J, Heinrichs G, Jürgens C

Trauma Berufskrankh. 2012 doi 10.1007/s10039-012-
1875-8. Epub ahead of print

**Infiltrationsbehandlung bei akuten
Muskelverletzungen: Sinn oder Unsinn?**

Gille J, Bark S, Riepenhof H, Partenheimer A

Dtsch Z Sportmed 64 (2013) 98 – 102

Novel cartilage repair strategies – The AMIC technique

Gille J, Moeckel G, Bark S, Behrens P

Journal of Orthopedics Vol. 4, no. 3, 99-104 (2012)

**Autologous matrix induced chondrogenesis (AMIC)
for treating articular cartilage defects of the lower limb:
A clinical overview.**

Bark S, Piontek T, Moeckel G, Paech A, Gille J

OA Sports Medicine 2013 May 01;1(1):7