

Abschlussbericht zum Vorhaben
„FR 0276“

Laufzeit

01.05.2018 – 28.02.2024

Bericht vom 28.02.2024

Autoren

Dr. Simon Hackl

Katharina Trenkwalder

Prof. Dr. Peter Augat

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung – deutsch

Kurzfassung – englisch

1. Problemstellung
2. Forschungszweck/-ziel
3. Methodik
4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens
 - 4.1. Rekrutierung und definitive Diagnose
 - 4.2. Manifeste Infekte vs. Low-Grade-Infekte
 - 4.3. Stellenwert der Sonikation bei der Diagnose von Infektpseudarthrosen
 - 4.4. Stellenwert von Biomarker bei der präoperativen Diagnose von Infektpseudarthrosen
 - 4.5. Kongressbeiträge und Publikationen
5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen
6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen
7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan
8. Literaturverzeichnis
9. Anhang
10. Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Kurzfassung – deutsch

Ziele:

Die Behandlung einer aseptischen Pseudarthrose und einer Infektpseudarthrose erfolgt nach unterschiedlichen Prinzipien. Daher stellt eine frühzeitige, bestenfalls präoperative Bestimmung der Genese einer Pseudarthrose einen wichtigen Schritt zur Therapieoptimierung, auch hinsichtlich ökonomischer Kriterien, dar. Darüber hinaus gelingt – trotz eines infekttypischen klinischen Verlaufs – oftmals kein Keimnachweis im Rahmen der mikrobiologischen Diagnostik, wodurch das therapeutische Vorgehen aufgrund weiterer notwendiger Schritte zur Diagnosesicherung verzögert wird. Ziel dieser Studie war es daher, weitere (prä-)operative Diagnosekriterien zur Differenzierung zwischen aseptischer Pseudarthrose und Infektpseudarthrose anhand von molekularen, mikrobiologischen und histopathologischen Befunden zur verbesserten Abgrenzung einer Infektpseudarthrose von einer aseptischen Pseudarthrose zu erarbeiten.

Aktivitäten/Methoden:

Im Rahmen einer multizentrischen Studie wurden 45 Patient*innen mit Infektpseudarthrosen – davon 23 mit Low-Grade-Infekten – und 62 Patient*innen mit aseptischen Pseudarthrosen des Tibia- bzw. Femurschaftes sowie 34 Patient*innen mit regelrecht verheilten Tibia- bzw. Femurschaftfrakturen als Kontrollgruppe eingeschlossen. Präoperativ wurden neben dem Blutbild laborchemische Entzündungswerte, wie beispielsweise das C-reaktive Protein, bestimmt. Außerdem erfolgte die Gewinnung weiterer präoperativer peripherer Blutproben zur Biomarker-Analyse aus dem Blutplasma. Während der operativen Pseudarthrosenrevision bzw. der Osteosynthesematerialentfernung wurden neben Gewebeproben für die mikrobiologische Langzeitbebrütung und für die Histopathologie, das Osteosynthesematerial zur Sonikation, sowie weitere Gewebeproben für eine molekularbiologische Untersuchungen gewonnen. Der weitere Heilverlauf der Patient*innen mit Pseudarthrosen wurde zwölf Monate nachbeobachtet.

Ergebnisse:

Die bisherige intraoperative „Routine“-Diagnostik zeigte mit einer Sensitivität von 69% und einer Spezifität von 96% für die Langzeitgewebekultur und einer Sensitivität und Spezifität von 14% und 87% für die Histopathologie eine nicht zufriedenstellende Diagnoseleistung. Die in dieser Studie etablierte Methode der Sonikation mit Membranfiltration des Sonikats hatte eine Sensitivität von 52% und eine Spezifität von 93%. In Kombination mit einer Langzeitgewebekultur konnte mithilfe dieser Methode die Sensitivität für die Diagnose „Infektpseudarthrose“ von 55% auf 62% gesteigert und das Potential für die zukünftige klinische Routinediagnostik demonstriert werden. Des Weiteren konnte im Plasma des peripheren Blutes Interleukin-18 (IL-18) als geeigneter präoperativer Biomarker identifiziert werden. Mit einem negativen Vorhersagewert von 90% konnte für Patient*innen des Studienkollektivs mit einem IL-18-Testwert von unter 90,7pg/ml eine der Pseudarthrose zugrundeliegende Infektion präoperativ ausgeschlossen werden. Nach erfolgreicher Validierung von IL-18 in einem weiteren Patient*innen-Kollektiv ist dann eine Anwendung in der klinischen Diagnostik denkbar. Analysen der systemischen miRNA-Exosomenprofile in einer Subgruppe des Studienkollektivs deuten darauf hin, dass es Unterschiede in den Profilen von Patient*innen mit Infektpseudarthrose und aseptischer Pseudarthrosen geben könnte. Die Berücksichtigung von miRNA-Exosomenprofilen für die Infektdiagnostik bei Pseudarthrosen stellt einen innovativen neuen Ansatz dar, welcher aufgrund der vorliegenden Ergebnisse in zukünftigen Studien weiterverfolgt werden sollte. Insgesamt sind die Ergebnisse dieser Studie für die Unfallversicherungsträger von höchster Relevanz, da sie einen ersten Schritt zur weiteren Optimierung der Pseudarthrosen-Diagnostik leisten, was mit einer Reduktion der Anzahl an Revisionsoperationen und Minimierung der Behandlungskosten einhergeht, sowie zur Beschleunigung der Wiedereingliederung der Betroffenen ins Berufsleben beiträgt.

Kurzfassung – englisch

Aims:

The treatment of aseptic and septic nonunion is based on different principles. Early, ideally preoperative determination of the genesis of nonunion is therefore an important step in optimizing treatment, also with regard to economic criteria. In addition, despite a typical clinical course of infection, microbiological diagnostics often fail to detect the presence of microorganisms, which delays the therapeutic procedure due to the need for further steps to confirm the diagnosis. The aim of this study was to develop further (pre-)operative diagnostic criteria to differentiate between aseptic and septic nonunion based on molecular, microbiological and histopathological findings to improve the differentiation of septic from aseptic nonunion.

Activities/Methods:

In a multicenter study, 45 patients with septic nonunion - including 23 patients with low-grade infection - and 62 patients with aseptic nonunion of the tibial or femoral shaft, as well as 34 patients with a regular healed tibial or femoral shaft fracture as a control group, were included. Preoperative blood counts, including routine inflammatory markers such as C-reactive protein, were obtained. Additionally, preoperative peripheral blood samples were collected for plasma biomarker analysis. During nonunion revision and implant removal, tissue samples were collected for long-term culture and histopathology. Osteosynthesis material was obtained for sonication and, additional tissue samples were collected for molecular biological analyses. Patients with nonunion were followed for twelve months.

Results:

Conventional intraoperative diagnostics demonstrated unsatisfactory diagnostic performance with a sensitivity of 69% and a specificity of 96% for long-term tissue culture, and a sensitivity and specificity of 14% and 87% for histopathology. The method of sonication with membrane filtration of the sonication fluid established in this study had a sensitivity of 52% and a specificity of 93%. In combination with long-term tissue culture, this method has the potential to increase the sensitivity of diagnosing septic nonunion from 55% to 62%. This method could become a routine clinical diagnostic tool. Additionally, interleukin-18 (IL-18) was identified as a potentially suitable preoperative biomarker in peripheral blood plasma. Hereby, in patients with an IL-18 level of less than 90.7 pg/ml infection as an underlying cause of nonunion can be excluded with a negative predictive value of 90%. Thus, IL-18 could potentially be used in clinical diagnostics after successful validation in another patient population. Analyses of systemic miRNA exosome profiles in a subset of the study population showed differences in the profiles of patients with septic versus aseptic nonunion. Therefore, the use of miRNA exosome profiles for diagnosing infection in nonunion is an innovative approach that should be explored in future studies based on these results. Overall, the study results are highly relevant for accident insurance institutions as they represent a further step towards optimizing the diagnosis of nonunion, which is associated with a reduction in the number of revision surgeries and minimization of treatment costs. Additionally, the results may contribute to accelerating the reintegration of these patients back to work.

1. Problemstellung

Kommt es im Verlauf der Frakturbehandlung innerhalb eines Zeitraumes von 6 bis 9 Monaten nicht zur knöchernen Konsolidierung der Frakturzone, wird von einer Falschgelenkbildung bzw. Ausbildung einer Pseudarthrose gesprochen [1]. Hierbei handelt es sich im Behandlungsverlauf von Knochenbrüchen um eine, nach operativ oder auch konservativ durchgeführter Frakturstabilisierung, wesentlichen Komplikation, welche beispielsweise nach Frakturen im Bereich der unteren Extremität mit einer Häufigkeit von etwa 5% auftritt [2].

Die Ursachen für eine ausbleibende knöcherne Konsolidierung der Frakturzone sind vielfältig und hängen mit der multifaktoriellen Genese des Frakturheilungsprozesses zusammen [1, 3, 4]. Wesentliches Kriterium für das Behandlungskonzept der Pseudarthrose ist u. a. die Frage nach dem Vorliegen einer etwaigen bakteriellen Infektion, da diese eine der schwerwiegendsten Ursachen für die ausbleibende Knochenbruchheilung darstellt und ein anderes therapeutisches Konzept benötigt als Pseudarthrosen, die auf aseptischen Ursachen beruhen. So ist bei der aseptischen Femur- oder Tibiaschaftpseudarthrose die Markraumüberbohrung und der Marknagelwechsel eines der am häufigsten zur Ausheilung der Pseudarthrose eingesetzte operative Verfahren [5]. Dem gegenüber steht das therapeutische Vorgehen bei einer Pseudarthrose, die durch eine bakterielle Infektion verursacht wurde: Dabei steht der Versuch der Keimeradikation bzw. der Infektberuhigung mit u. a. Débridement einschließlich Implantatentfernung sowie 6-wöchiger test-spezifischer systemischer antibiotischer Therapie – und hieraufhin erneuter Stabilisierung des Knochendefekts – im Vordergrund [6-8].

Eine frühzeitige Bestimmung des einer Pseudarthrose zugrundeliegenden Pathomechanismus – vor allem hinsichtlich der Abgrenzung zu einer Infektpseudarthrose – ist daher von entscheidender Bedeutung, um ohne weitere Zeitverzögerung das adäquate therapeutische Vorgehen einleiten zu können. Derzeit sind der mikrobiologische Nachweis von bakteriellen Erregern in der Pseudarthrosenzone [9] sowie die histopathologische Aufarbeitung von Pseudarthrosengewebe [10, 11] der einzige objektivierbare und anerkannte Beweis für das Vorliegen einer Infektion. Dieser kann jedoch erst nach einer operativen Probengewinnung erfolgen und ist auch hierbei, beispielsweise nach bereits präoperativ initiiertes Antibiotikatherapie, nicht immer zielführend [12].

Eine zusätzliche Schwierigkeit bei der präoperativen Abgrenzung zwischen einer septischen und aseptischen Pseudarthrose sind sogenannte Low-Grade-Infekte in der Genese von Pseudarthrosen: Pseudarthrosen denen ggf. ein „Low-Grade-Infekt“ zugrunde liegt präsentieren sich präoperativ – aufgrund fehlender klinischer Zeichen eines akuten oder chronischen infekttypischen Geschehenes – meist ähnlich, wenn nicht sogar identisch wie aseptische Pseudarthrosen. Der Anteil an ggf. durch Low-Grade-Infektionen verursachte Pseudarthrosen bei präoperativ als aseptisch eingestufte Pseudarthrosen betrug in einer eigenen retrospektiven Arbeit etwa 42% [13]. Dies führte in dieser Gruppe – verglichen zu der Gruppe ohne jeglichen Keimnachweis – auch zu einer erhöhten Anzahl an notwendigen Folgeeingriffen bis zur vollständigen Knochenbruchheilung [13].

Aktuell kann präoperativ somit nicht sicher festgestellt werden, ob einer Pseudarthrose eine Infektion zugrunde liegt oder nicht. Dies kann frühestens postoperativ nach mikrobiologischer Auswertung der intraoperativen Gewebeprobe aus der Pseudarthrosenzone festgestellt werden. Doch auch die mikrobiologische Diagnostik dieser Gewebeprobe führt des Öfteren zu falsch-negativen Ergebnissen. Präoperativ können momentan hauptsächlich Indizien, wie beispielsweise das klinische Erscheinungsbild oder erhöhte laborchemisch Entzündungsparameter, hinweisend auf einen für die Pseudarthrose ggf. ursächlichen Infekt sein.

2. Forschungszweck/-ziel

Die Behandlung einer aseptischen Pseudarthrose und einer Infektpseudarthrose erfolgt nach unterschiedlichen Maßstäben. Daher stellt die frühzeitige, bestenfalls präoperative Bestimmung derer Genese einen wichtigen Schritt zur Therapieoptimierung – auch hinsichtlich ökonomischer Kriterien – dar. Während zur Behandlung aseptischer Pseudarthrosen meist der Verfahrenswechsel auf ein stabileres Implantat mit ggf. zusätzlicher Anlagerung von vitalem Knochen oft zum Erfolg führt, ist bei einer Infektpseudarthrose die konsequente Resektion des betroffenen Knochengewebes im Sine einer Infekteradikation mit anschließender aufwendiger Knochen- und Weichteilrekonstruktion erforderlich. Bis dato sind jedoch keine definitiven und belastbaren Kriterien zur präoperativen Differentialdiagnose zwischen aseptischer Pseudarthrose und Infektpseudarthrose etabliert. Des Weiteren gelingt oft trotz des infektypischen klinischen Verlaufs kein Keimnachweis in der mikrobiologischen Diagnostik, wodurch das therapeutische Vorgehen aufgrund weiterer Versuche zur Diagnosesicherung deutlich verzögert wird. Auch ist die Rolle einer möglichen Implantatunverträglichkeit in der Genese der Pseudarthrose zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

Ziel dieses Forschungsvorhabens war daher die Erarbeitung von (prä-)operativen Diagnosekriterien zur Differenzierung zwischen aseptischer Pseudarthrose und Infektpseudarthrose anhand von molekularen, mikrobiologischen und histopathologischen Befunden zur verbesserten Abgrenzung einer Infektpseudarthrose von einer aseptischen Pseudarthrose, wobei die mikrobiologische Diagnostik als Goldstandard verwendet wurde.

Zusammenfassend wurden hierzu präoperative laborchemische und molekularbiologische Befunde der peripheren Blutproben in Kombination mit den mikrobiologischen und histologischen Befunden sowie der molekularbiologischen Befunde der intraoperativen Gewebeproben zur Detektion der Ursache der Pseudarthrose untersucht.

3. Methodik

Das Forschungsvorhaben FR 0276 war ursprünglich mit einer Laufzeit von 01.05.2018 bis 31.08.2022 geplant. Nach Vorbereitung und Site Initiation sollten über einen Zeitraum von 2,5 Jahren insgesamt 120 Patient*innen (N = 60 mit Verdacht auf aseptische Femur- bzw. Tibiaschaft-Pseudarthrose, N = 30 mit Verdacht auf septische Femur- bzw. Tibiaschaft-Pseudarthrose, N = 30 mit regelrecht verheilte Femur- bzw. Tibiaschaftfraktur) unter Kooperation von neun BG Kliniken eingeschlossen werden.

Präoperativ sollte neben der Datenerhebung die laborchemische Diagnostik sowie eine Blutentnahme erfolgen, intraoperativ die Entnahme von Gewebeproben und des Osteosynthesematerials durchgeführt werden. Per Übernachtversand war eine Überführung der Proben in das Forschungslabor des Instituts für Biomechanik an der BG Unfallklinik Murnau geplant, in dem die Probenaufbereitung und die mikrobiologischen Analysen inkl. der Sonikation durchgeführt werden sollte. Für die Histologie war eine Zusammenarbeit mit dem Medizinischen Versorgungszentrum Trier geplant, für die molekularbiologischen Analysen der Gewebe- und Blutproben mit dem AO Research Institute Davos. Zwölf Monate nach der operativen Pseudarthrosenrevison war ein Follow-up eingeplant, um mögliche Komplikationen im weiteren Behandlungsverlauf und das Auftreten eines möglichen Infekts nach der initialen Studienoperation zu erfassen und hieraufhin die definitive Diagnose „aseptische Pseudarthrose“ oder „Infektpseudarthrose“ zu stellen, wobei die Einteilung entsprechend Abbildung 1 vorgenommen wurde (Abbildung 1).

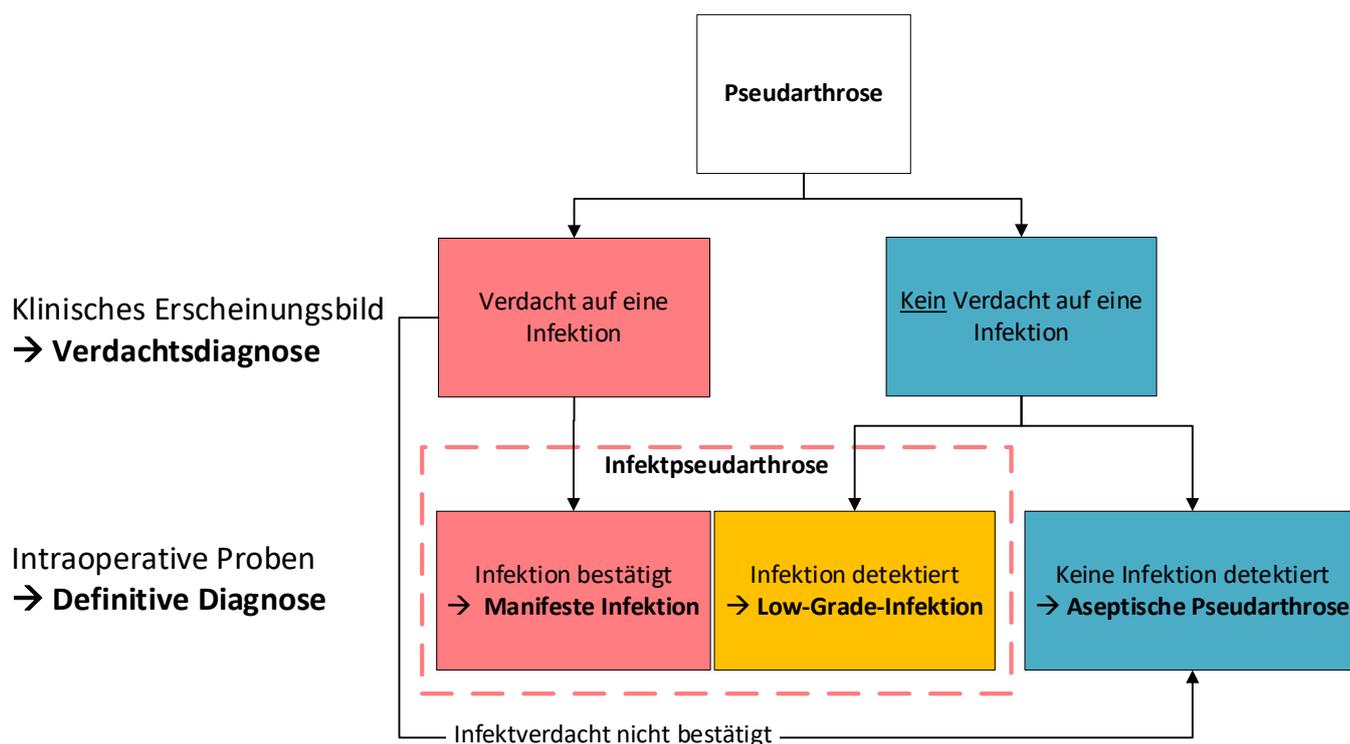


Abbildung 1: Von der Verdachtsdiagnose zur definitiven septischen oder aseptischen Diagnose.

Nach der Rekrutierungsphase und der Analyse der Proben sollte die statistische Auswertung vorgenommen werden, um den diagnostischen Wert der verschiedenen Analysemethoden für die Differentialdiagnose zwischen aseptischer und Infektpseudarthrose zu ermitteln (Abbildung 2).

	1. Wirtschaftsjahr		2. Wirtschaftsjahr		3. Wirtschaftsjahr		4. Wirtschaftsjahr		5. Wirtschaftsjahr		
	1. Halbjahr	2. Halbjahr	1. Halbjahr	2. Halbjahr	1. Halbjahr	2. Halbjahr	1. Halbjahr	2. Halbjahr	1. Halbjahr	2. Halbjahr	
Meilensteine	Site Initiation	Rekrutierung von 40 Patienten		Rekrutierung von 60 Patienten		Rekrutierung von 20 Patienten		Abschlussbericht			
Vorbereitende Organisationsaufgaben mit u.a.: • Kooperationsvereinbarungen • Votum der jeweiligen Ethikkommission (Ärzte)											
Vorbereitung u.a.: • Verbrauchsmaterialien • Schulung • „Info-Hotline“ (Ärzte u. MTA)											
Rekrutierung des Patientenkollektivs und Proben-gewinnung / -aufbereitung (Ärzte u. MTA)											
Probenbearbeitung mit u.a.: • laborchem. Diagnostik • mikrobiolog. Diagnostik • histopatholog. Diagnostik • molekular. Diagnostik (Ärzte u. MTA)											
Datenanalyse u. statistische Auswertung (Ärzte)											
Abschlussbericht (Ärzte)											

Abbildung 2: Geplante Arbeits- und Zeitabläufe.

Letztlich beteiligten sich acht BG Kliniken an der multizentrischen Kooperationsstudie und rekrutierten innerhalb von knapp 3,5 Jahren insgesamt 151 Patient*innen (Tabelle 1).

Prüfstelle	Patient*innen-Anzahl
BG Klinikum Unfallkrankenhaus Berlin	17
Berufsgenossenschaftliches Universitätsklinikum Bergmannsheil Bochum	0
BG Klinikum Duisburg	5
Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Frankfurt am Main	13
BG Klinikum Bergmannstrost Halle	18
BG Klinikum Hamburg	7
Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Ludwigshafen	2
Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Murnau	73
Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Tübingen	16

Tabelle 1: Einschlusszahlen der Prüfstellen.

Nach initialen Verzögerungen bei der Materialbeschaffung und dadurch verspäteter Site Initiation konnten die oben genannten Arbeitsabläufe jedoch wie geplant umgesetzt werden. Allerdings kam es durch die Corona-Pandemie bedingte Verschiebungen elektiver Operationen im Jahr 2020 zu zeitlichen Verzögerungen (Abbildung 3), was vor allem die Rekrutierung der Kontrollgruppe betraf und eine kostenneutrale Verlängerung des Forschungsvorhabens bis Ende Februar 2024 notwendig machte.

	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	
Meilensteine	Site Initiation	Rekrutierung von 50 Patienten			Rekrutierung von 70 Patienten		Abschlussbericht	
Vorbereitende Organisationsaufgaben mit u.a.: • Kooperationsvereinbarungen • Votum der jeweiligen Ethikkommission (Ärzte)								
Vorbereitung u.a.: • Verbrauchsmaterialien • Schulung • „Info-Hotline“ (Ärzte u. wissenschaftl. MA)								
Rekrutierung des Patientenkollektivs und Proben Gewinnung / -aufbereitung (Ärzte u. wissenschaftl. MA)								
Probenbearbeitung mit u.a.: • laborchem. Diagnostik • mikrobiolog. Diagnostik • histopatholog. Diagnostik • molekular. Diagnostik (Ärzte u. wissenschaftl. MA)								
Datenanalyse u. statistische Auswertung (Ärzte u. wissenschaftl. MA)								
Abschlussbericht (Ärzte)								

Abbildung 3: Tatsächliche Arbeits- und Zeitabläufe.

Die statistischen Auswertungen der klinischen Daten sowie die Analysen zum Stellenwert der laborchemischen, der mikrobiologischen – einschließlich der Sonikation – und der histopathologischen Diagnostik sind abgeschlossen. Die molekularbiologischen Biomarker-Analysen aus dem gewonnenen Blutplasma sind ebenfalls erfolgt. In der Auswertungsmethodik gab es keine Abweichungen zum geplanten Vorgehen, wobei die Auswertung unter Verwendung des Programms „SPSS (Vers. 26)“ erfolgte: Neben statistischen Standardmethoden (u. a. Chi-Quadrat-Test und Kruskal-Wallis-Test) wurden die Diagnoseleistungen der verschiedenen diagnostischen Methoden über Kreuztabellen ermittelt. Die Ermittlung optimaler Grenzwerte zur Differentialdiagnose zwischen septischer und aseptischer Pseudarthrosen erfolgte über die Bestimmung des Youden-Index.

Demgegenüber sind die Analysen und die Auswertungen zur Titan-Unverträglichkeit sowie zur Genexpression im Pseudarthrosengewebe zum Zeitpunkt der Erstellung dieses Abschlussberichtes noch nicht vollständig beendet. Auch wurden zusätzlich zur geplanten molekularbiologischen Aufarbeitung der gewonnenen Proben Analysen der Mikro-RNA (miRNA) mit Erstellung von Exosomenprofilen im Blutplasma von Patient*innen mit Tibiaschaft-Pseudarthrose durch die Firma Qiagen, Hilden durchgeführt. Die entsprechenden finanziellen Mittel für diese zusätzlichen Analysen wurden vom AO Research Institute in Davos, Schweiz bereitgestellt.

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

4.1. Rekrutierung und definitive Diagnose

Insgesamt wurden 117 Patient*innen mit Pseudarthrose (Studiengruppe) und 34 Patient*innen mit regelrecht verheilten Knochenbrüchen (Kontrollgruppe) eingeschlossen. Bei sieben der insgesamt 151 eingeschlossenen Patient*innen lagen nach Auswertung aller – auch nachträglich verfügbarer Daten – Abweichungen hinsichtlich der definierten Einschlusskriterien vor, so dass diese für sämtliche Analysen nicht berücksichtigt wurden. Die definitive Diagnose nach Abschluss des Follow-Ups nach zwölf Monaten zeigte, dass bei 45 Patient*innen eine Infekt-pseudarthrose und bei 62 Patient*innen eine aseptische Pseudarthrose vorlag. Drei Patient*innen bei denen die Differenzierung „Infekt-pseudarthrose“ vs. „aseptische Pseudarthrose“ auch nach einem Jahr und der entsprechenden klinischen Standarddiagnostik unklar blieb, wurden für die weiteren Analysen ausgeschlossen.

4.2. Manifeste Infekte vs. Low-Grade-Infekte

Bei drei Patient*innen mit initialem Verdacht auf eine Infekt-pseudarthrose konnte kein Infekt identifiziert werden. Bei 23 der 83 Patient*innen mit durch die jeweiligen behandelnden Ärzte geäußertem initialen Verdacht auf eine aseptische Pseudarthrose konnte ein sogenannter Low-Grade-Infekt nachgewiesen werden (Abbildung 4). Dies entspricht einer Rate an Low-Grade-Infektionen von 28% in unserem Studienkollektiv. Die klinische Verdachtsdiagnose „Infekt-pseudarthrose vs. aseptischer Pseudarthrose“ hatte zusammenfassend eine Sensitivität von 49% und eine Spezifität von 95%.

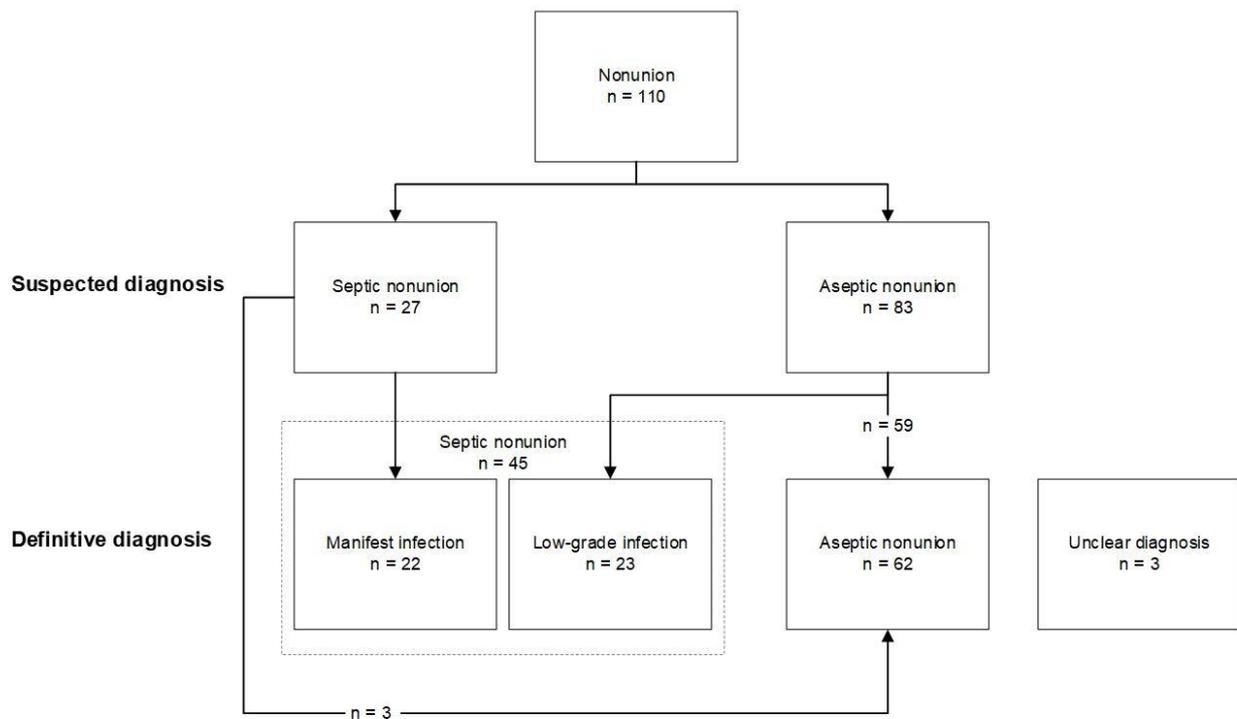


Abbildung 4: Präoperative Verdachtsdiagnose und definitive septische oder aseptische Diagnose nach der Revisionsoperation mit intraoperativer Diagnostik und einer Nachbeobachtungszeit von 12 Monaten.

Des Weiteren ergab die Auswertung der erfassten klinischen Daten, dass Patient*innen mit Low-Grade-Infektionen signifikant seltener mit einer systemischen antibiotischen Therapie behandelt wurden als Patient*innen mit einer manifesten Infektion ($p=0.002$) und zusätzlich die Dauer dieser systemischen antibiotischen Therapie signifikant kürzer war ($p=0.005$). Unabhängig hiervon konnte nach einem Jahr eine knöchernen Heilung der Pseudarthrosen bei den manifesten Infekten in 64%, bei den Low-Grade Infekten in 83% und bei den aseptischen Pseudarthrosen in 90% beobachtet werden.

Mit Ausnahme von *Cutibacterium acnes* gab es hinsichtlich des Keimspektrums keine signifikanten Unterschiede zwischen manifesten Infektionen und Low-Grade-Infektion (Tabelle 2).

Definitive Diagnose	Manifeste Infektspseudarthrosen (n = 22)					Low-Grade-Infektspseudarthrosen (n = 23)				
	n	%	Mono- mikrobiell [%]	Antibiose [%]	Geheilt [%]	n	%	Mono- mikrobiell [%]	Antibiose [%]	Geheilt [%]
Koagulase-negative Staphylokokken	13	59	31	96	54	17	74	26	56	77
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	9	100	100	100	2	9	0	50	50
<i>Cutibacterium acnes</i>	5	23	0	100	20	12	52	33	50	100
<i>Corynebacterium</i> spp.	2	9	0	100	0	1	4	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	5	0	100	100	1	4	100	100	100
<i>Finnegoldia magna</i>	2	9	50	100	50	0	0	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	2	9	100	100	100	0	0	-	-	-
<i>Bacillus</i> spp.	1	5	0	100	100	1	4	0	100	100
Other species	1	5	0	100	100	1	4	0	100	100

Tabelle 2: Bakterienarten, systemische antibiotische Therapie und Heilungsrate der Pseudarthrosen für manifeste Infektspseudarthrosen und Low-Grade-Infektspseudarthrosen.

Cutibacterium acnes wurde jedoch in der Gruppe der Low-Grade-Infekte signifikant häufiger detektiert. Während bei allen manifesten Infekten mit *Cutibacterium acnes* eine polymikrobielle Infektion vorlag, wurden bei 67% der Low-Grade-Infekte mit *Cutibacterium acnes* gleichzeitig andere Bakterienarten gefunden. Die Heilungsrate von manifesten Infekten – definiert als knöchernen Heilung der ehemaligen Pseudarthrosenzone – mit *Cutibacterium acnes* war signifikant niedriger als die von Low-Grade-Infekten mit *Cutibacterium acnes* ($p=0.002$).

4.3. Stellenwert der Sonikation bei der Diagnose von Infektspseudarthrosen

Die Diagnoseleistung der Methode „Sonikation“ bei der Differenzierung zwischen aseptischer Pseudarthrose und Infektspseudarthrose wurde statistisch ausgewertet und mit der Langzeitbeurteilung und der histopathologischen Aufarbeitung der intraoperativ gewonnenen Gewebeproben verglichen. Hierfür wurden alle Patient*innen, bei denen die Sonikation des vollständig bei der Studien-OP entfernten Implantats erfolgte berücksichtigt und die Auswertungen mit Daten von 42 Patient*innen mit Infektspseudarthrose, 53 Patient*innen mit aseptischer Pseudarthrose und 32 Patient*innen der Kontrollgruppe durchgeführt werden.

Die ROC-Analysen ergaben hierbei einem optimalen Grenzwert von 13,6 koloniebildende Einheiten (KBE) pro 10 ml Sonikat zur belastbaren Differenzierung zwischen aseptischer und septischer Pseudarthrose, so dass anhand des von uns untersuchten Patient*innenkollektivs eine Anzahl von über 13,6 KBE pro 10 ml Sonikat für das Vorliegen einer Infektion als Ursache für die ausbleibende Knochenbruchheilung spricht und zur frühzeitigen Diagnose „Infektpseudarthrose“ mit entsprechend frühzeitiger Therapieeinleitung führen kann.

Mit einer Sensitivität von 52% und einer Spezifität von 93% lag die Diagnoseleistung der Sonikation zwar unter der Diagnoseleistung der Gewebekultur (Sensitivität: 69%; Spezifität: 96%), jedoch über der der Histopathologie (Sensitivität: 14%; Spezifität: 87%). Unter Berücksichtigung des im klinischen Alltag etablierten Vorgehens zur Sicherung des Vorliegens eines Knocheninfektes respektive einer Infektpseudarthrose – entsprechend der frakturassoziierten Knocheninfektionen – anhand mindestens zweier Kriterien, wie beispielsweise der Nachweis von „zwei Gewebekulturen mit dem gleichen Keim“, lag die Sensitivität bei 55%. Die Kombination von Gewebekultur mit der Sonikation zeigte eine Sensitivität von 50%, welche durch Verwendung eines niedrigeren KBE-Grenzwertes von 0,6 KBE pro 10 ml Sonikat – ermittelt über die Kontrollgruppe „regelrecht verheilte Knochenbruch“ – bis auf 62% gesteigert werden konnte (Tabelle 3):

1 positive Gewebekultur +	
Bestätigendes Kriterium	Sensitivität % (95 % KI)
Gewebekultur (gleicher Keim)	55 (39–70)
Histopathologie mit Infektzeichen	24 (13–40)
Bouillonkultur des Sonikats (gleicher Keim)	55 (39–70)
Membranfiltration des Sonikats (gleicher Keim)	
≥ 0,6 KBE/10 ml	62 (46–76)
≥ 13,6 KBE/10 ml	50 (34–66)

Tabelle 3: Detektionsraten von Infektpseudarthrosen bei einer positiven Gewebekultur in Kombination mit einer weiterer Diagnosemethode.

Außerdem konnten durch die Sonikation des intraoperativ entnommenen Osteosynthesematerials und der anschließenden Membranfiltration des hierdurch gewonnenen Sonikats – verglichen mit der Bouillonkultur des Sonikats bzw. der Langzeitgewebekultur – signifikant mehr polymikrobielle Infektionen aufgedeckt werden ($p < 0.001$). Darüber hinaus liegen die mikrobiologischen Ergebnisse bei der Membranfiltrationsmethode für den aeroben Keimnachweis bereits nach zwei und für Anaerobier nach fünf Tagen vor – während die Langzeitbebrütung sowohl des Sonikats als auch der Gewebeproben für ein belastbares Ergebnis 14 Tage in Anspruch nimmt.

Die durch das durchgeführte Forschungsvorhaben erlangten Resultate legen somit nahe, dass die Sonikation mit anschließender Membranfiltration des Sonikats eine nützliche additive Methode zur frühzeitigeren und sichereren Differenzierung zwischen einer aseptischen Pseudarthrose und einer Infektpseudarthrose darstellt, da aufgrund der u. a. kürzeren Bebrütungszeit auch ggf. eine raschere Therapieeinleitung möglich ist.

4.4. Stellenwert von Biomarker bei der präoperativen Diagnose von Infektpseudarthrosen

4.4.1. Laborchemische „Routine“-Biomarker im Blutserum

Vor der Studien-OP wurde den Patient*innen Blut für die laborchemische Diagnostik entnommen und daraufhin folgende „Routine“-Blutparameter analysiert: Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl,

mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), Thrombozytenzahl, C-reaktives Protein (CRP) und Procalcitonin. Die Mittelwerte dieser präoperativen laborchemischen Untersuchungen – welche für alle bis auf neun Patient*innen vorlagen – war für alle Gruppen innerhalb der laborwertspezifischen Referenzstandards. Einzige Ausnahme bildete der CRP-Wert, dessen Mittelwerte für alle drei Pseudarthrosen-Gruppen – manifeste Infektpseudarthrose, Low-grade-Infektpseudarthrose und aseptische Pseudarthrose – über dem Referenzstandard lag. Die statistische Auswertung ergab darüber hinaus signifikante Unterschiede zwischen aseptischen Pseudarthrosen und Infektpseudarthrosen für Hämoglobin- und Hämatokrit-Wert sowie für die Leukozytenzahl, das MCV und dem CRP-Wert (Tabelle 4).

Definitive Diagnose		Manifeste Infektionen (n = 21)	Low-Grade-Infektionen (n = 20)	Aseptische Pseudarthrosen (n = 59)	Regelrecht verheilte Frakturen (n = 32)	
Präoperativer Blutmarker	Referenzbereich	Mittelwert ± Standardabweichung				p-Wert
Hämoglobin [g/dl]	13.5 – 17.5	13.6 ± 1.9	14.4 ± 1.2	14.9 ± 1.1	14.7 ± 1.1	0.026
Hämatokrit [%]	35 – 52	37.3 ± 7.5	41.1 ± 5.1	41.8 ± 4.0	40.5 ± 4.7	0.040
Erythrozyten [/pl]	3.8 – 5.9	4.3 ± 0.9	4.7 ± 0.6	4.6 ± 0.5	4.6 ± 0.6	0.220
Leukozyten [/nl]	4.3 – 10.8	7.5 ± 2.5	7.7 ± 2.1	7.8 ± 2.6	6.3 ± 2.3	0.021
MCV [fl]	80 – 100	87.2 ± 6.8	86.5 ± 7.7	90.4 ± 6.4	87.1 ± 5.2	0.025
Thrombozyten [1000/μl]	140 – 440	274 ± 100	310 ± 140	296 ± 113	237 ± 60	0.090
C-reaktives Protein [mg/dl]	< 0.3	0.88 ± 1.33	0.42 ± 0.55	0.33 ± 0.50	0.10 ± 0.08	0.000
Procalcitonin [ng/ml]	< 0.05	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.132

Tabelle 4: Präoperative laborchemische „Routine“-Parameter bei Patient*innen mit manifester Infektpseudarthrose, Low-Grade-Infekt-Pseudarthrose sowie aseptischer Pseudarthrose und regelrecht verheilte Faktur.

Da sich diese Gruppenunterschiede jedoch nicht zwischen (Low-Grade)-Infektpseudarthrosen und aseptische Pseudarthrosen als statistisch relevant darstellten, kann durch das vorliegende Forschungsvorhaben eine Verwendung der entsprechenden Parameter zur präoperativen Differentialdiagnose zwischen aseptischer und (Low-Grade-)Infektpseudarthrose nicht empfohlen werden.

4.4.2. Proteom-Analyse

Für die Proteom-Analysen konnten 62 Patient*innen mit aseptischer Pseudarthrose, 43 Patient*innen mit Infektpseudarthrose und 33 Patient*innen der Kontrollgruppe berücksichtigt werden, da aufgrund einer nicht auszuschließenden Interaktion mit einer in manchen Fällen patientenspezifischen Dauermedikation – unabhängig der Pseudarthrose – nicht alle Patient*innen für die Biomarker-Analysen im Blutplasma eingeschlossen werden konnten. Das Blutplasma der eingeschlossenen Patient*innen wurde dann mit dem bioanalytischen Verfahren der gezielten Proteom-Analyse – dem sogenannten „Olink Proximity Extension Assay“ – untersucht, wobei aufgrund der reduzierten Gruppengröße nicht zwischen manifester und Low-Grade-Infekt-Pseudarthrosen weiter unterschieden wurde.

Die Proteom-Analyse zeigte, dass beispielsweise der „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF) ($p < 0,0001$) sowie „Interleukin-6“ (IL-6) ($p < 0,0001$) und der „Macrophage colony stimulation factor 1“ (CSF 1) ($p = 0,0179$) bei

Patient*innen mit Infektpseudarthrose im Vergleich zu Patient*innen mit regelrecht verheiltem Knochenbruch signifikant erhöht war. Ebenso konnte bei Patient*innen mit aseptischer Pseudarthrose – im Vergleich zu Infektpseudarthrose – eine signifikant höhere Expression von HGF ($p=0,0099$), IL-6 ($p=0,0201$) und CSF 1 ($p=0,0247$), festgestellt werden (Abbildung 4).

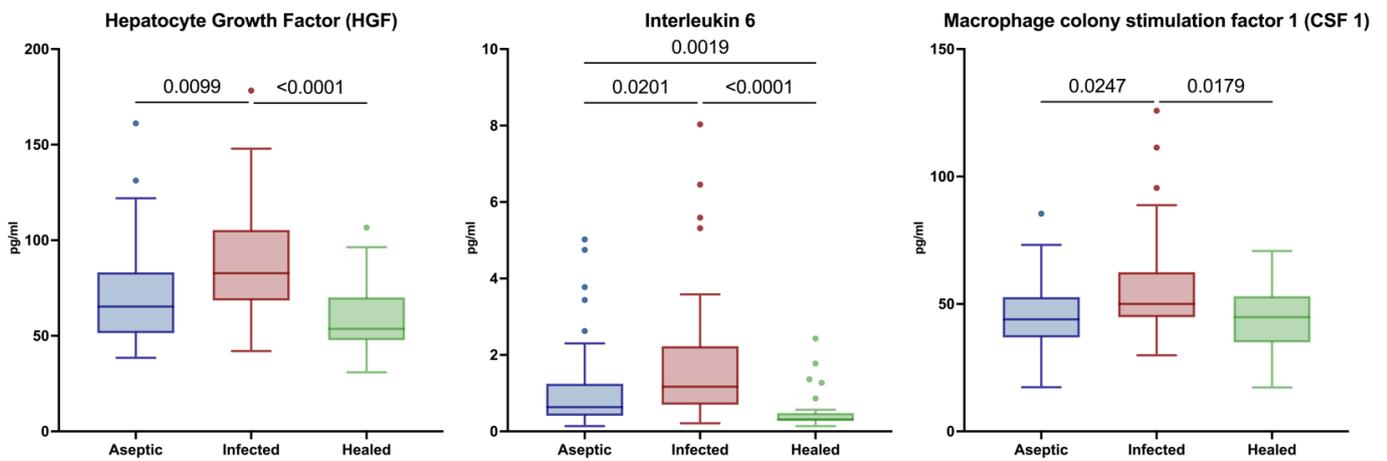


Abbildung 5: Unterschiedliche Expression von HGF, IL-6 und CSF 1 bei Patient*innen mit aseptischer Pseudarthrose, Infektpseudarthrose und regelrecht verheilten Fraktur.

Obwohl statistisch signifikante Unterschiede in den jeweiligen Expressionsprofilen vorlagen waren die absoluten Unterschiede gering, weshalb – unter Berücksichtigung der bisher erfolgten Analysen – aktuell eine präoperative Infektdiagnose anhand dieser einzelnen Biomarker bei Pseudarthrosen nicht belastbar möglich erscheint.

Dem gegenüber erbrachte eine zusätzliche Subgruppenanalyse der Proteom-Analyse – unter Ausschluss von Raucher*innen und Patient*innen mit Diabetes mellitus – für „Interleukin-18“ (IL-18) einen signifikanten Unterschied zwischen Infektpseudarthrosen ($N = 26$) und der Kontrollgruppe ($N = 21$) ($p=0,0019$) sowie zwischen aseptischen Pseudarthrosen ($N = 39$) und Infektpseudarthrosen ($N = 26$) ($p = 0,006$) (Abbildung 6).

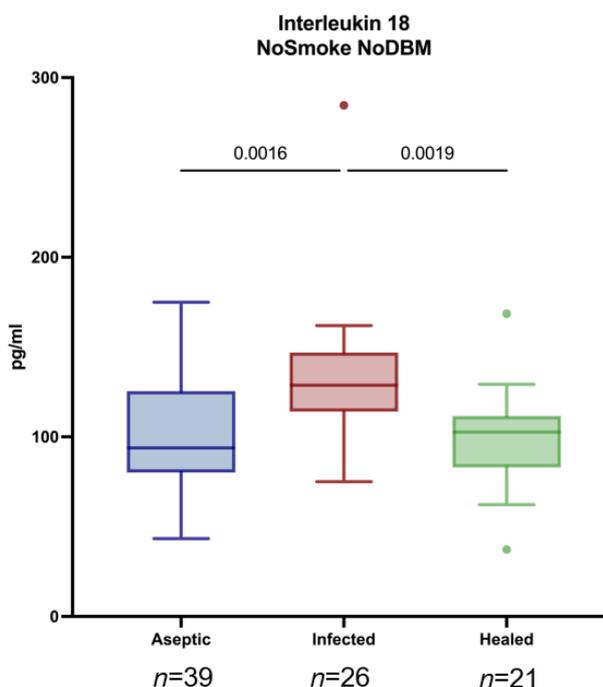


Abbildung 6: Expression von IL-18 unter Ausschluss von Raucher*innen (Smoke) und Diabetiker*innen (DBM).

Eine nachfolgende ROC-Analyse ergab bei einer „Fläche unter der Kurve“ (AUC) von 0,76 für IL-18 einen optimalen Grenzwert von 90,7 pg/ml durch den bei darunterliegenden Werten eine Infekt pseudarthrose mit einem negativen Vorhersagewert von 95% weitgehend ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 7).

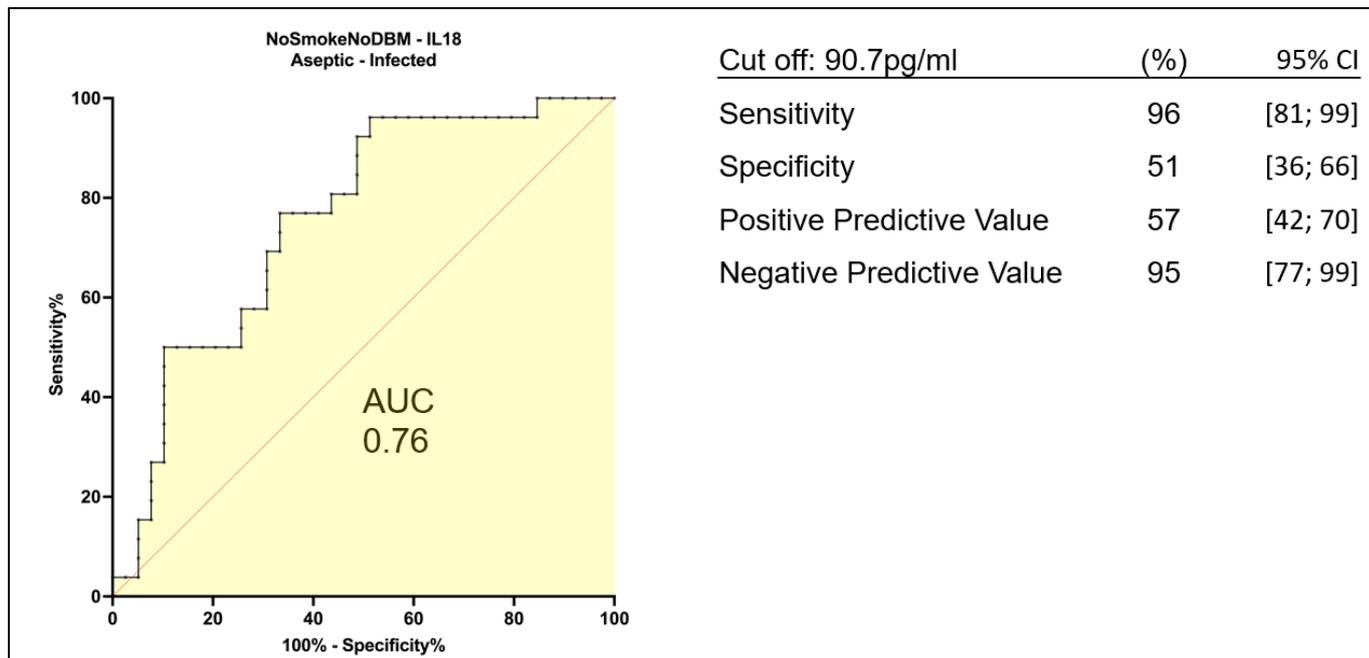


Abbildung 7: ROC-Analyse von IL-18 (*linke Abbildung*) und dessen Diagnoseleistung beim optimalen Grenzwert von 90,7 pg/ml (*rechte Tabelle*) bei Patient*innen unter Ausschluss von Raucher*innen (Smoke) und Diabetiker*innen (DBM).

In einer weiteren Analyse wurde der oben ermittelte Grenzwert für IL-18 von 90,7 pg/ml auf alle Patient*innen angewandt, wobei die Sensitivität von IL-18 dann bei 90%, die Spezifität bei 61% sowie der positive und negative Vorhersagewert bei 62% und 90% lag. Dies deutet darauf hin, dass IL-18 ein möglicher Biomarker sein könnte, um eine Infekt pseudarthrose mit hoher Wahrscheinlichkeit präoperativ ausschließen zu können. Um anhand IL-18 allerdings eine im klinischen Alltag belastbare Aussage treffen zu können ist mindestens eine weitere Studie zur Validierung des Wertes in einem weiteren Patient*innenkollektiv notwendig.

4.4.3. miRNA Exosomenprofile

Mikro-RNAs (miRNA) sind kleine nichtkodierende RNAs, welche in ihrer reifen Form (RNA induced silencing complex; RISC) im Zytosol an mRNA binden und die Genexpression kontrollieren. Das Vorkommen dieser miRNAs ist jedoch nicht auf das Zytosol beschränkt, sondern sie können auch in Bläschen verpackt, den sogenannten Exosomen, in den extrazellulären Raum und den Blutkreislauf freigesetzt werden, wobei die miRNA in den Exosomen sehr haltbar ist und dadurch nachgewiesen bzw. analysiert werden kann. Die Erstellung von miRNA-Profilen in Blutproben wurde beispielsweise daher bereits zur Identifizierung von Krebsstadien, aber auch von Knochenerkrankungen genutzt. Die miRNA-Exosom-Sequenzierung aus dem Blutplasma von Patient*innen mit Pseudarthrose zur Differenzierung zwischen Infekt pseudarthrosen und aseptischen Pseudarthrose wurde bisher jedoch noch nicht betrachtet.

Eine diesbezügliche Analyse bzw. Sequenzierung der im Rahmen des Forschungsvorhabens präoperativ gewonnenen Plasmaproben von 12 Patient*innen mit Infekt pseudarthrosen, 12 Patient*innen mit aseptischen

Pseudarthrosen und 8 Patienten aus der Kontrollgruppe mit regelrecht geheilten Knochenbrüchen ergab einen starken Unterschied in der miRNA-Expression zwischen Patienten mit geheilten Knochenbrüchen und Pseudarthrosen-Patient*innen – jedoch unabhängig einer etwaigen zugrundliegenden Infektgenese (Abbildung 8).

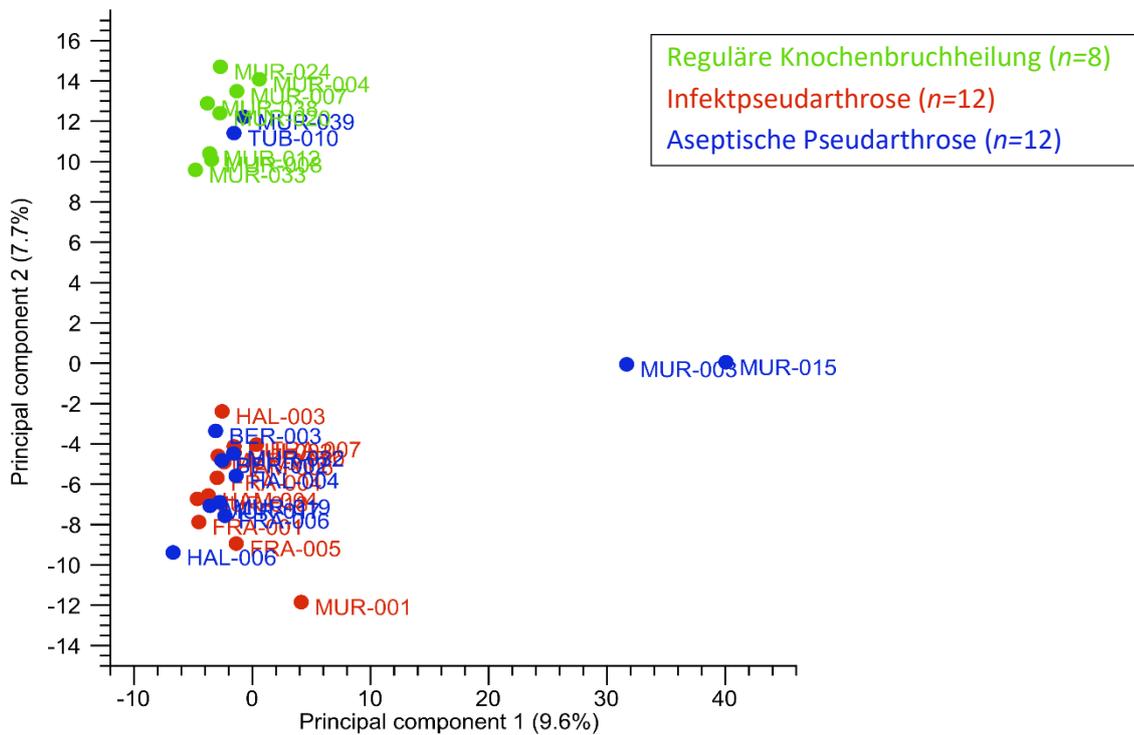


Abbildung 8: Principal component analysis (PCA) der miRNA-Exosomen-Expression von 8 Patient*innen mit regulärer Knochenbruchheilung, 12 mit Infekt pseudarthrose und 12 mit aseptischer Pseudarthrose.

In weiteren Analysen der miRNA-Exosom-Sequenzierung konnten mit miR-16-5p und miR-486-5p zwei zusätzliche miRNAs identifiziert werden, die bei Patient*innen mit einer aseptischen Pseudarthrose und einer Infekt pseudarthrose eine unterschiedlich stark Expression aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass die Analyse von miRNAs möglicherweise zur präoperativen Differenzierung zwischen Infekt pseudarthrosen und aseptischen Pseudarthrosen herangezogen werden könnten, wobei zur weiteren Beurteilung deren Stellwerts zwingend weitere Studien notwendig sind.

4.5. Kongressbeiträge und Publikationen

Während der Durchführung des Forschungsvorhabens konnten Studienkonzept, Zwischenergebnisse sowie teilweise bereits die oben zusammengefassten Ergebnisse in Vorträgen oder Postern auf wissenschaftlichen Kongressen präsentiert bzw. in Fachzeitschriften publiziert werden. Außerdem sind weitere Publikationen entstanden, welche zwar keinen direkten Bezug auf die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts enthalten, jedoch aus der Projektthematik hervorgegangen sind.

4.5.1. Kongressbeiträge

23.10.2018: Dr. med. Simon Hackl:

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2018 (Berlin; Vortrag)

„Neue Helden braucht das Land...: Pseudarthrosen – Infektpseudarthrosen“

07.02.2019: Dr. med. Simon Hackl:

AFOR Expertengremium 2019 (Pontresina, Schweiz; Vortrag)

„Differenzierung zwischen aseptischer Pseudarthrose und Infektpseudarthrose“

14.03.2019: Katharina Trenkwalder:

Hot Topics in Biomechanics (Davos, Schweiz; Vortrag)

„Differentiation between aseptic and infectious femoral / tibial shaft pseudarthrosis“

06.07.2019: Dr. med. Simon Hackl:

17. Unfallmedizinische Tagung des Landesverbandes Nordost (Berlin; Vortrag)

„Infektpseudarthrosen - Diagnostik und Therapie“

28.11.2019: Dr. med. Simon Hackl / Katharina Trenkwalder:

2. Wissenschaftstage der BG Kliniken (Frankfurt am Main; Vortrag)

„Best Practice Szenario: Multizentrische Forschungsvorhaben mit DGUV-Förderung - Aseptische und septische Pseudarthrosen (FR 276)“

01.07.2022: Katharina Trenkwalder:

Paracelsus virtual Science Get Together 2022 (Salzburg, Österreich; Poster)

“Differentiation between septic and aseptic femoral and tibial shaft non-union: a multicenter clinical study“

06.09.2022: Katharina Trenkwalder:

ORS ISFR 17th Biennial International Meeting (Edinburgh, Schottland; Vortrag)

“The value of sonication in the differential diagnosis of septic and aseptic nonunion in comparison to tissue culture and histopathology”

27.10.2022: Katharina Trenkwalder:

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (Berlin; Vortrag)

„Der Stellenwert der Sonikation bei der Differentialdiagnose von aseptischen und Infektpseudarthrosen“

23.11.2022: Katharina Trenkwalder:

Wissenschaftstage der BG Kliniken (Berlin; Vortrag)

„Der Stellenwert der Sonikation bei der Differentialdiagnose von aseptischen und Infektpseudarthrosen“

10.02.2023: Ferdinand Weisemann:

ORS 2023 Annual Meeting (Dallas, Texas, USA; Poster)

“Towards a preoperative diagnosis of infected non-union with targeted proteomics from human blood plasma”

03.03.2023: Dr. med. Simon Hackl:

Unfallmedizinische Tagung 2023 – DGUV Landesverband West (Düsseldorf; Vortrag)

„Pseudarthrosen – Update Diagnostik: Mikrobiologie“

27.04.2023: Dr. med. Simon Hackl:

140. Deutscher Chirurgie Kongress – DCK 2023 (München; Vortrag)

„Infektpseudarthrose – Die Bedeutung der Diagnostik“

03.07.2023: Katharina Trenkwalder:

Paracelsus virtual Science Get Together 2023 (Salzburg, Österreich; Poster)

„The diagnostic performance of sonication in differentiating septic and aseptic femoral and tibial shaft nonunion“

12.10.2023: Katharina Trenkwalder:

41st Annual Meeting of the European Bone and Joint Infection Society (Basel, Schweiz; Vortrag)
„The clinical relevance of low-grade infection in the development and management of fracture related nonunion“

12.10.2023: Ferdinand Weisemann:

41st Annual Meeting of the European Bone and Joint Infection Society (Basel, Schweiz; Vortrag)
„Towards preoperative diagnosis of infected nonunion of femur or tibia with targeted proteomics in blood plasma“

26.10.2023: Ferdinand Weisemann:

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (Berlin; Vortrag)
„Plasma miRNA exosome profiles differ in infected compared to aseptic tibial nonunion“

17.11.2023: Katharina Trenkwalder:

OTC Foundation „Hot Topic“ Workshop on „Fracture-Related Infections“ (Rom, Italien; Vortrag)
„Value of Current Diagnostic Techniques: Serology, Histology and Cultures“

04.02.2024: Claudia Siverino PhD:

ORS 2024 Annual Meeting (California, USA; Vortrag & Poster)
„Diagnosis Of Infected And Aseptic Non-union Correlating Local Gene Expression And Systemic Proteomics, Mirna, And Immune Cells Profiles“

4.5.2. Publikationen in Fachzeitschriften

12.06.2023: Trenkwalder K, Erichsen S, Weisemann F, Augat P, Militz M, von Räden C, Hentschel T, SAND Research Group, Hackl S:

The value of sonication in the differential diagnosis of septic and aseptic femoral and tibial shaft nonunion in comparison to conventional tissue culture and histopathology: a prospective multicenter clinical study.

J Orthop Traumatol. 2023, 24(1):25 (doi: 10.1186/s10195-023-00708-4)

under review: Trenkwalder K, Erichsen S, Weisemann F, Militz M, Augat P, von Räden C, Hackl S:

The clinical relevance of low-grade infection in the development and management of fracture-related nonunion.

4.5.3. An das Forschungsvorhaben angrenzende Publikationen in Fachzeitschriften

14.08.2021: Hackl S, Keppler L, von Rüden C, Friederichs J, Perl M, Hierholzer C:

The role of low-grade infection in the pathogenesis of apparently aseptic tibial shaft nonunion.

Injury. 2021, 52(11):3498-3504 (doi: 10.1016/j.injury.2021.08.014)

24.06.2022: Hackl S, Trenkwalder K, Militz M, Augat P, Stuby FM, von Rüden C:

Infizierte Pseudarthrose: diagnostischer und therapeutischer Ablauf.

Unfallchirurgie 2022, 125(8):602-610 (doi: 10.1007/s00113-022-01204-w)

09.10.2023: Hackl S, Eijkenboom A, Militz M, von Rüden C:

Diagnostik und Therapie der infizierten Tibia-Pseudarthrose.

Unfallchirurgie 2024, 127(2):96-102 (doi: 10.1007/s00113-023-01371-4)

under review: Trenkwalder K, Hackl S, Weisemann F, Augat P:

The Value of Current Diagnostic Techniques in the Diagnosis of Fracture-related infections: Serology, Histology, and Cultures.

under review: Hackl S, von Rüden C, Trenkwalder K, Keppler L, Hierholzer C, Perl M:

Long-term Outcomes Following Single-Stage Reamed Intramedullary Exchange Nailing in Apparently Aseptic Femoral Shaft Nonunion with Unsuspected Proof of Bacteria.

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

In den letzten Jahren haben sich auch andere Forschergruppen mit der Thematik der präoperativen Differenzierung zwischen Infektpseudarthrosen und aseptischen Pseudarthrosen durch Marker in Blutproben der betroffenen Patient*innen beschäftigt. Insgesamt sind seit Start der DGUV-Studie FR0276 hierzu sechs Publikationen veröffentlicht worden [14-19]. In keiner dieser Studien konnten dabei präoperative Marker zur zuverlässigen Diagnose von Infektpseudarthrosen identifiziert werden.

Unter Berücksichtigung der uns öffentlich zugänglichen Publikationen auf dem Gebiet der Differenzierung zwischen Infektpseudarthrosen und aseptischer Pseudarthrosen kam es somit seit Beginn des Forschungsvorhabens zu keiner wesentlichen neueren Entwicklung, welche Konsequenzen für die erfolgte Durchführung dieses Forschungsvorhabens gehabt hätte.

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

Ziel des Forschungsvorhabens war es (prä-)operative Diagnosekriterien für die Differenzierung zwischen aseptischer Pseudarthrose und Infektpseudarthrose anhand von molekularen, mikrobiologischen und histopathologischen Befunden zur verbesserten Abgrenzung einer Infektpseudarthrose von einer aseptischen Pseudarthrose zu erarbeiten.

Das Forschungsvorhaben konnte zum einen zeigen, dass Low-Grade-Infekte in der Entstehung von Pseudarthrosen einen wesentlichen Stellenwert einnehmen, wobei diese in der täglichen klinischen Praxis nicht immer als solche erkannt werden. Dies liegt nicht nur an den eingangs erwähnten und in der Definition der Low-Grade-Infektion begründeten fehlenden klinischen Infektzeichen, sondern auch daran, dass die bisherigen intraoperativen Diagnosemethoden – sowohl Gewebekultur als auch Histopathologie – keine zufriedenstellenden Diagnoseergebnisse liefern und eine sichere Diagnose nur durch die Anwendung verschiedener Methoden und zusätzliche Nachbeobachtung des Heilverlaufs erreicht werden kann. Daher ist eine Verbesserung der intraoperativen Diagnostik für die klinische Praxis von höchster Relevanz – insbesondere zur frühzeitigen und gezielten Einleitung des adäquaten therapeutischen Vorgehens.

Die intraoperative Diagnosemethode der Sonikation mit anschließender Membranfiltration des Sonikats wurde im Rahmen dieses Forschungsprojekts als neue Methode etabliert. Diese bietet als Ergänzung zur herkömmlichen intraoperativen Diagnostik einen greifbaren Mehrwert. Zum einen erhöht sie die Sensitivität für die Diagnose eines Infekts und ermöglicht es zum anderen, polymikrobielle Infekte häufiger nachzuweisen. Darüber hinaus können durch diese Methode mikrobiologische Ergebnisse bedeutend früher als durch die Langzeitgewebekultur gewonnen werden. Diese Aspekte sind in der klinischen Praxis entscheidend, um u. a. frühzeitig eine bakterienspezifische zielgerichtete antibiotische Therapie zu beginnen. Das im Rahmen dieses Forschungsvorhabens entwickelte Protokoll zur Methode der Sonikation mit anschließender Membranfiltration ist mittlerweile soweit etabliert, dass es – abhängig von der Verfügbarkeit von Geräten und Materialien sowie entsprechender Schulung des Personals – in die klinische „Routine“-Diagnostik integriert werden kann. So wird beispielsweise in der BG Unfallklinik Murnau das Verfahren mittlerweile durch das biologische Forschungslabor des Instituts für Biomechanik hausintern als Dienstleistung im klinischen Alltag bei der Diagnostik von Pseudarthrosen angeboten und regelhaft in Anspruch genommen. Auch besteht von Kliniken außerhalb des Kooperationsprojekts, wie beispielsweise dem Universitätsklinikum Köln, das Bestreben die Methode im klinischen Alltag zu integrieren.

Des Weiteren bestätigen die Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens, dass die derzeitigen laborchemischen Routineuntersuchungen von peripheren Blutproben, wie beispielsweise der CRP-Wert, keine zuverlässige Unterscheidung zwischen Infektpseudarthrosen und aseptischen Pseudarthrosen möglich ist und nur als präoperative Anhaltspunkte betrachtet werden sollten. Demgegenüber zeigten die Ergebnisse unseres Forschungsvorhabens, dass zusätzliche Biomarker im Plasma peripherer Blutproben, wie beispielsweise IL-18, möglicherweise eine genauere präoperative Differenzierung zwischen Infektpseudarthrosen und aseptischen Pseudarthrosen ermöglichen könnten. Bevor der Biomarker IL-18 jedoch Einzug in die klinische Pseudarthrosen-Diagnostik finden kann sind weitere Validierungsstudien mit mindestens einem weiteren Patientenkollektiv notwendig. Auch deutet die Analyse der miRNA-Exosome auf einen vielversprechenden Ansatz zur präoperativen Differenzierung von Pseudarthrosen hin. Allerdings sind auch hier weitere Forschungsanstrengungen, einschließlich Grundlagenforschung, erforderlich, bevor eine mögliche Anwendung in klinischen Studien und im klinischen Alltag erfolgen kann.

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Die Ergebnisse hinsichtlich der intraoperativen Diagnostik durch Sonikation, Gewebekultur und Histopathologie sind bereits vergangenes Jahr in der Fachzeitschrift „Journal of Orthopaedics and Traumatology“ veröffentlicht worden (siehe Anhang). Eine Publikation zur klinischen Relevanz von Low-Grade-Infektpseudarthrosen ist aktuell in Vorbereitung zur Publikation in einer weiteren internationalen Fachzeitschrift. Eine weitere Publikation, welche die Ergebnisse der Proteomics-Analyse enthält, ist derzeit in Arbeit. Die Fertigstellung und Einreichung bei einer passenden Fachzeitschrift sind für Mitte 2024 geplant.

Die Analysen und Auswertungen zur Titan-Unverträglichkeit und zur Genexpression im Pseudarthrosengewebe sind noch nicht vollständig abgeschlossen und sollen im ersten Halbjahr 2024 beendet werden. Auch ist eine weitere Validierung der miRNA-Exosomenprofil-Analyse mittels RT-qPCR für das erste Quartal in 2024 angedacht sowie eine Verknüpfung der Ergebnisse der systemischen miRNA-Analyse mit denen der Genexpression im Pseudarthrosengewebe vorgesehen. Die Ergebnisse über die Rolle einer potentiellen Titan-Unverträglichkeit bei der Entstehung von Pseudarthrosen sollen auf mindestens einem internationalen Kongress präsentiert sowie in einer Fachzeitschrift publiziert werden. Realistisch wird dies Ende 2024 bzw. Anfang 2025 realisiert werden können.

Auch ist geplant, die histologischen Gewebeproben weiter aufzuarbeiten und unter immunhistochemischen Gesichtspunkten sowie der Struktur der Kollagenfibrillen weiter zu analysieren, um ggf. Unterschiede zwischen Infektpseudarthrosen und aseptischen Pseudarthrosen auszumachen. Hierfür ist gerade eine Postdoc-Mitarbeiterin des AO Research Instituts Davos an der University of Adelaide in Australien, um entsprechende Analysetechniken zu erlernen.

Eine Quantifizierung der bakteriellen DNA im Pseudarthrosengewebe mittels „Droplet Digital PCR“ ist ebenfalls vorgesehen, um zu untersuchen, ob ein messbarer Unterschied in der Bakterienlast zwischen manifesten Infektpseudarthrosen und Low-Grade-Infektpseudarthrosen vorliegt. Außerdem soll eine mögliche Korrelation zwischen der bereits ermittelten Bakterienlast im Sonikat und der im Pseudarthrosengewebe untersucht werden.

Neben den ursprünglich geplanten Analysen sollen die gewonnenen Blut- und Gewebeproben dieses Forschungsvorhabens konserviert und bei Detektion etwaiger vielversprechender Biomarker hinsichtlich ihrer Relevanz – der Zustimmung der jeweiligen Ethikkommission vorausgesetzt – weiter analysiert werden um ein Maximum an Erkenntnis und Nutzen der durch Unterstützung der DGUV und von jedem einzelnen Patient*in zur Verfügung gestellten Proben zu erlangen.

Zu guter Letzt sollen das erfolgreiche Studiendesign und die etablierten Arbeitsabläufe im Rahmen dieser multizentrischen Pseudarthrosen-Studie unter Beteiligung der BG Kliniken als Grundlage für ein weiteres Forschungsvorhaben dienen. Dieses Vorhaben zielt darauf ab, die Diagnostik von (Low-Grade-)Infektpseudarthrosen durch die (prä/intra-)operative Bestimmung der Vaskularisation der Pseudarthrosenzone zu verbessern. Der Kooperationsforschungsförderungsantrag mit dem Titel „MaNGA – Mit allen geeigneten Mitteln gegen Non-Union: von Grundlagen- bis Anwendungsforschung [Methods against Non-Union: from Grassroots to clinical Application]“, der neben dem Teilprojekt „Vaskularisation“ noch drei weitere Teilprojekte zum Thema Pseudarthrose (Non-Union) umfasst, wurde bereits bei der DGUV zur Begutachtung eingereicht.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Marti R, Kloen P. Concepts and Cases in Nonunion Treatment. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2011.
- [2] Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, et al. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*. 2014;45 Suppl 2:S3-7.
- [3] Fong K, Truong V, Foote CJ, Petrisor B, Williams D, Ristevski B, et al. Predictors of nonunion and reoperation in patients with fractures of the tibia: an observational study. *BMC musculoskeletal disorders*. 2013;14:103.
- [4] von Rüden C, Morgenstern M, Hierholzer C, Hackl S, Gradinger FL, Woltmann A, et al. The missing effect of human recombinant Bone Morphogenetic Proteins BMP-2 and BMP-7 in surgical treatment of aseptic forearm nonunion. *Injury*. 2016;47:919-24.
- [5] Hierholzer C, Glowalla C, Herrler M, von Rüden C, Hungerer S, Bühren V, et al. Reamed intramedullary exchange nailing: treatment of choice of aseptic femoral shaft nonunion. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2014;9:88.
- [6] Militz M, Hackl S, Hungerer S, Öhlbauer M, Bühren V. Infektseptidarthrosen. *Trauma und Berufskrankheit*. 2014;16:444-51.
- [7] Stengel D, Bauwens K, Sehoulis J, Ekkernkamp A, Porzsolt F. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. *The Lancet Infectious diseases*. 2001;1:175-88.
- [8] Struijs PA, Poolman RW, Bhandari M. Infected nonunion of the long bones. *Journal of orthopaedic trauma*. 2007;21:507-11.
- [9] Perry CR, Pearson RL, Miller GA. Accuracy of cultures of material from swabbing of the superficial aspect of the wound and needle biopsy in the preoperative assessment of osteomyelitis. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1991;73:745-9.
- [10] Simpson AH, Wood MK, Athanasou NA. Histological assessment of the presence or absence of infection in fracture non-union. *Injury*. 2002;33:151-5.
- [11] Morgenstern M, Athanasou NA, Ferguson JY, Metsemakers WJ, Atkins BL, McNally MA. The value of quantitative histology in the diagnosis of fracture-related infection. *The bone & joint journal*. 2018;100-b:966-72.
- [12] Barrack RL, Jennings RW, Wolfe MW, Bertot AJ. The Coventry Award. The value of preoperative aspiration before total knee revision. *Clinical orthopaedics and related research*. 1997:8-16.
- [13] Hackl S, Keppler L, von Rüden C, Friederichs J, Perl M, Hierholzer C. The role of low-grade infection in the pathogenesis of apparently aseptic tibial shaft nonunion. *Injury*. 2021;52:3498-504.
- [14] Wang Z, Zheng C, Wen S, Wang J, Zhang Z, Qiu X, et al. Usefulness of serum D-dimer for preoperative diagnosis of infected nonunion after open reduction and internal fixation. *Infection and drug resistance*. 2019;12:1827-31.
- [15] Wang XJ, Wang Z, Zhang ZT, Qiu XS, Chen M, Chen YX. Plasma Fibrinogen as a Diagnostic Marker of Infection in Patients with Nonunions. *Infection and drug resistance*. 2020;13:4003-8.
- [16] Wang Z, Mao HJ, Qiu XS, Chen YX, Xu GY. Diagnostic value of platelet indices in infected nonunion: a retrospective study. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2022;17:200.
- [17] Brinker MR, Macek J, Laughlin M, Dunn WR. Utility of Common Biomarkers for Diagnosing Infection in Nonunion. *Journal of orthopaedic trauma*. 2021;35:121-7.

[18] Tosounidis TH, Holton C, Giannoudis VP, Kanakaris NK, West RM, Giannoudis PV. Can CRP Levels Predict Infection in Presumptive Aseptic Long Bone Non-Unions? A Prospective Cohort Study. *Journal of clinical medicine*. 2021;10.

[19] Shapiro JA, Stillwagon MR, Tornetta P, 3rd, Seaver TM, Gage M, O'Donnell J, et al. Serology and Comorbidities in Patients With Fracture Nonunion: A Multicenter Evaluation of 640 Patients. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2022;30:e1179-e87.

ORIGINAL ARTICLE

Open Access



The value of sonication in the differential diagnosis of septic and aseptic femoral and tibial shaft nonunion in comparison to conventional tissue culture and histopathology: a prospective multicenter clinical study

Katharina Trenkwalder^{1,2}, Sandra Erichsen^{1,2}, Ferdinand Weisemann³, Peter Augat^{1,2}, Matthias Militz³, Christian von Rueden^{2,3}, Tobias Hentschel³, SAND Research Group and Simon Hackl^{2,3*}

Abstract

Background Septic and aseptic nonunion require different therapeutic strategies. However, differential diagnosis is challenging, as low-grade infections and biofilm-bound bacteria often remain undetected. Therefore, the examination of biofilm on implants by sonication and the evaluation of its value for differentiating between femoral or tibial shaft septic and aseptic nonunion in comparison to tissue culture and histopathology was the focus of this study.

Materials and methods Osteosynthesis material for sonication and tissue samples for long-term culture and histopathologic examination from 53 patients with aseptic nonunion, 42 with septic nonunion and 32 with regular healed fractures were obtained during surgery. Sonication fluid was concentrated by membrane filtration and colony-forming units (CFU) were quantified after aerobic and anaerobic incubation. CFU cut-off values for differentiating between septic and aseptic nonunion or regular healers were determined by receiver operating characteristic analysis. The performances of the different diagnostic methods were calculated using cross-tabulation.

Results The cut-off value for differentiating between septic and aseptic nonunion was ≥ 13.6 CFU/10 ml sonication fluid. With a sensitivity of 52% and a specificity of 93%, the diagnostic performance of membrane filtration was lower than that of tissue culture (69%, 96%) but higher than that of histopathology (14%, 87%). Considering two criteria for infection diagnosis, the sensitivity was similar for one tissue culture with the same pathogen in broth-cultured sonication fluid and two positive tissue cultures (55%). The combination of tissue culture and membrane-filtrated sonication fluid had a sensitivity of 50%, which increased up to 62% when using a lower CFU cut-off determined from regular healers. Furthermore, membrane filtration demonstrated a significantly higher polymicrobial detection rate compared to tissue culture and sonication fluid broth culture.

Conclusions Our findings support a multimodal approach for the differential diagnosis of nonunion, with sonication demonstrating substantial usefulness.

*Correspondence:

Simon Hackl
simon.hackl@bgu-murau.de

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Level of Evidence: Level 2

Trial registration DRKS00014657 (date of registration: 2018/04/26)

Keywords Septic nonunion, Aseptic nonunion, Fracture-related Infection, Low-grade Infection, Sonication, Membrane filtration, Tissue culture, Histopathology

Introduction

One essential criterion for the treatment of fracture nonunion is the presence or absence of bacterial infection. However, differentiating between septic and aseptic nonunion is challenging, especially when dealing with low-grade infections which are difficult to distinguish from aseptic nonunion [1, 2]. Low-grade infections are often caused by biofilm-forming bacteria, which may remain undetected in tissue cultures (TCs) and erroneously lead to aseptic diagnoses [2–4].

Biofilm-embedded bacteria on implants can be dislodged by sonication and detected by sonication fluid (SF) culture. This method has become an important element in the diagnosis of prosthetic joint infection (PJI) due to its supposed higher sensitivity compared to TC [5], despite some recent contradictory findings [6–8]. There are few studies focusing on sonication for the diagnosis of fracture-related infection [9–13], with most of the studies including both fracture-related and prosthetic joint infections [9, 11–13]. Thus, the role of sonication in the diagnosis of fracture-related infection (FRI) remains tentative [14]. Based on the lack of scientific evidence for the role of sonication in FRI diagnostics [14], the FRI Consensus Group demanded further studies to establish the role of sonication in FRI [15].

The aim of this study was to evaluate the diagnostic performance of sonication in differentiating between diaphyseal femoral or tibial aseptic and septic nonunion. We hypothesized that differentiation would be possible by the quantification of colony forming units (CFU) in sonication fluid. Furthermore, we hypothesized that sonication would detect a more diverse spectrum of microorganisms compared with tissue culture.

Patients and methods

This prospective multicenter study investigated the microbiological colonization of femoral and tibial fixation material in nonunion and regular healed fractures. One hundred thirty patients were recruited at eight level I trauma centers in Germany between January 2019 and April 2022. Each study center received an ethics vote from its local responsible ethics committee. Patients with aseptic or septic femoral or tibial shaft nonunion admitted to the hospitals for a revision surgery and patients with femoral or tibial regular healed fractures undergoing

implant removal were included in this study. In the latter, the implant was routinely removed after complication-free fracture consolidation, with no clinical or laboratory signs of infection or delayed healing during the fracture healing process. All patients gave their written consent before study inclusion.

Study population

Ninety-eight patients with nonunion and 32 patients with regular healed fractures aged ≥ 18 years were prospectively identified at the participating study centers and included in the study. The diagnosis of nonunion was based on the patient's complaints, clinical examination, and mandatory conventional radiographs. Hereby, radiologic signs of nonunion were defined as a lack of osseous bridging in at least three out of four cortices assessed on antero-posterior and lateral views of conventional radiographs [16]. Nonunion was defined as a fracture that does not heal without further surgical intervention [17]. The median time between definitive fracture stabilization and revision surgery was 10.9 months (range: 2.4–48.9). Exclusion criteria were administration of preoperative long-term antibiotics or current antimicrobial therapy and pregnancy. Only patients with complete implant removal or replacement were involved in this investigation.

Septic nonunion was defined according to Metsemakers et al. [18] by confirmatory criteria: presence of a fistula, two of the same pathogens identified in separate TCs, two of the same pathogens in TC and SF broth culture, or the detection of microorganisms in one TC confirmed by histopathological examination. For all patients, microbiological (long-term culture of tissue in broth and direct culture) and histopathological findings from index surgery or any follow-up surgeries within 12 months of study inclusion were considered for diagnosis. Especially in the case of a single culture-positive specimen or histopathology with infection signs only, suggestive criteria (redness, swelling, increased local temperature, increased preoperative CRP, clinical suspicion) were taken into account for the definitive diagnosis. Additionally, the administration of nonunion-related antibiotic therapy as well as the consolidation status of the nonunion 1 year after revision surgery were recorded. Results of the study-related sonication fluid membrane filtration (MF)

were not considered as a diagnostic criterion, as the evaluation of this method was subject of the present study.

Sample collection and analysis

The purpose of this study was to evaluate the diagnostic performance of sonication in differentiating between septic and aseptic nonunion in order to improve and expedite the diagnostic process for early initiation of appropriate treatment. Therefore, we assessed sonication as a diagnostic method in comparison to current conventional diagnostics.

Nonunion revisions and metal removals were performed according to clinical standards. Besides the clinical sampling for microbiology and histopathology (study-center-dependent sampling and analysis with local variations), two additional tissue samples were obtained from the transition zone between healthy bone and nonunion in nonunion patients and from the peri-implant site in regular healers. These samples were directly transferred into prepared vials, one in 9 ml sterile thioglycolate broth with resazurin (bioMérieux) for conventional microbiological examination and the other in 4%-phosphate-buffered formaldehyde solution (AppliChem) for histopathological examination. Osteosynthesis material was removed under sterile conditions according to clinical standards and transferred dry into sterile stand-up bags (Whirl-Pak, Nasco Sampling). All study samples collected in the study surgeries were transported overnight to the Institute for Biomechanics at the BG Unfallklinik Murnau, and were processed on the subsequent day.

Sonication was performed with the entire intramedullary nail or locking plate; screws were included if provided. The removed osteosynthesis material was transferred into a steam-sterilized (121 °C, 20 min) custom-made screw-capped glass tube with space for a complete intramedullary nail. Implants that did not fit into the glass tubes were instead processed in hydrogen-peroxide-sterilized lock'n'lock containers recommended by the ultrasonic bath manufacturer for sonication. The osteosynthesis material was covered with 150 ml sterile Ringer's solution (Ringer Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH) and shaken by hand for 30 s. Sonication was performed with a frequency of 40 kHz at 100% power setting (corresponds to 200 W_{eff} ultrasonic nominal output; BactoSonic ultrasonic bath, Bandelin electronic GmbH & Co. KG) for 1 min. For long implants that protruded out of the ultrasonic bath, the glass tubes were inverted and sonicated for an additional minute to include the whole implant surface. Sonication was followed by further shaking for 30 s. Five ml of the SF was inoculated into 9 ml thioglycolate broth with resazurin (bioMérieux) and incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 10 days.

Membrane filtration (MF) was conducted with 80 ml SF in total. For this purpose, SF was pre-filtered through a 70 µm sterile cell strainer (Falcon, Corning, NY, USA) to remove larger particles and to avoid blocking the 0.45-µm-pore-size sterile membrane filters (EZ-Fit, Millipore, Merck KGaA). Four filtrations with 20 ml each were performed. Filter membranes were directly placed onto Columbia agar plates with 5% sheep blood (Oxoid Germany GmbH, Thermo Fisher Scientific). Two agar plates were incubated under aerobic conditions for at least 2 days [median (range): 3 (2–7)], and two under anaerobic conditions for at least 5 days [median (range): 5 (5–7)], with variations due to weekends and holidays. An Anoxomat system (Advanced Instruments, Norwood, USA) was used to generate an anaerobic atmosphere. After incubation, the CFU were quantified on either aerobically or anaerobically incubated filter membranes (whichever yielded higher counts according to Trampuz et al. [19]). For this purpose, photos of the filter membranes were taken (Fig. 1) and the CFU were visually enumerated using the multi-point tool of the ImageJ software (version 1.52f). Only colonies from which at least one other colony of the same pathogen had grown on the selected membrane filters were counted. Individual colonies were considered contaminants and were not assessed. Eight sterile intramedullary nails and plates were transferred into sterile stand-up bags (Whirl-Pak, Nasco Sampling) and tested as negative controls in the same manner.

The study TC samples were incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 14 days and then streaked out on Columbia agar with 5% sheep blood (Oxoid Germany GmbH, Thermo Fisher Scientific). Morphologically distinct colony types were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry to species level (Vitek MS, bioMérieux Vitek Inc.) and tested for antibiotic susceptibility (Vitek 2, bioMérieux Vitek Inc.). The 10-day culture of SF in thioglycolate broth was performed in the same manner. Morphologically distinct colony types grown on membrane filters of MF were isolated on Columbia agar with 5% sheep blood (Oxoid Germany GmbH, Thermo Fisher Scientific) and identified and tested for antibiotic susceptibility analogously to TC and SF broth culture samples.

For histopathology, tissue samples were fixated in formaldehyde and were examined for signs of osteomyelitis after decalcification. Histopathological assessment and classification was performed via H&E staining, Berlin blue and the PAS reaction and with polarization-optical analysis and a semi-quantitative evaluation of osteomyelitis according to the Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score (HOES [20]). In brief, patterns of acute and chronic osteomyelitis, which

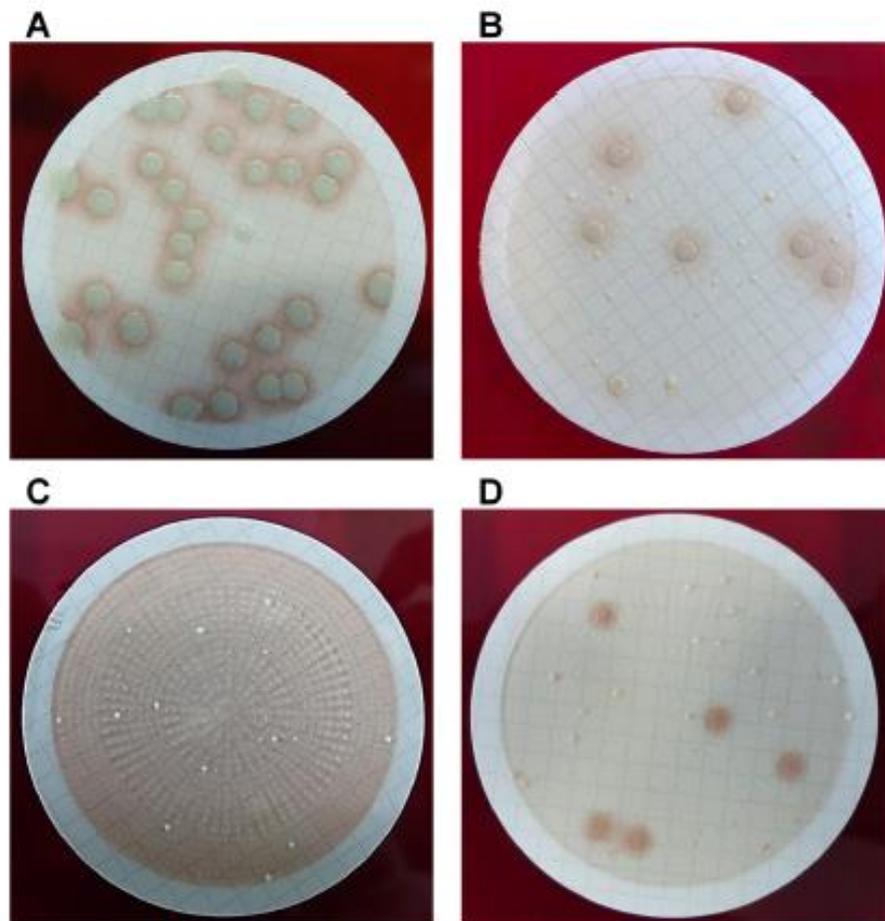


Fig. 1 Examples of aerobically (A, B) and anaerobically (C, D) incubated filter membranes with bacteria growth. **A** *Staphylococcus capitis*. **B** *Corynebacterium* spp. and *Staphylococcus epidermidis*. **C** *Cutibacterium acnes*. **D** *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*

include osseous changes, soft-tissue changes and an inflammatory infiltrate pattern (microabscesses: ≥ 5 neutrophilic granulocytes; lymphocyte/macrophage/plasma cell infiltrate), were assessed and semi-quantitatively graded depending on the size of the section area (non-existent = 0, one-third = 1, two-thirds = 2, entire section area = 3). Numerical evaluations of osteomyelitis criteria were summed and resulted in the written HOES, whereby scores of I to IV indicate the presence of osteomyelitis at different stages (acute, chronically florid, chronic, calmed osteomyelitis) and a score of V implies that there is no indication of osteomyelitis. For our analyses, we only used the HOES to differentiate whether signs of osteomyelitis were present or not.

Statistics

Intraoperative tissue specimens and explanted osteosynthesis material of 130 patients that met the defined inclusion criteria were sampled and analyzed in this study. Three initially aseptic nonunion patients were excluded from the statistical analyses as their signs of infection first appeared in follow-up surgeries, resulting in an unclear differential diagnosis. Thus, 127 patients were included in further analyses.

Statistical analyses were conducted in SPSS (ver. 26; IBM). Comparisons of mean values between study groups were performed using the Kruskal–Wallis or Mann–Whitney *U* test. To compare qualitative variables, Pearson's chi-squared test or Fisher's exact test was applied. A *p* value < 0.05 (two-sided) was considered statistically significant, and Bonferroni correction

was performed for multiple testing. CFU cut-off values and sensitivity and specificity for infection diagnosis based on the MF method were calculated with receiver operating characteristic (ROC) curves. Two by two tables were used for to test the performances of the different test methods. Analyses for the single-test methods were performed with the study-related microbiological and histopathological samples only, which were processed in a standardized manner. 95% confidence intervals (CIs) for sensitivity, specificity, positive and negative predictive values (PPV and NPV) were generated via Clinical Calculator 1 (<http://vassarstats.net/>).

Results

The study groups—42 patients with septic nonunion, 53 with aseptic nonunion and 32 with regularly healed fractures—significantly differed in age (Table 1). In particular, the regular healer group was significantly younger than the aseptic nonunion group ($p=0.006$), whereas there was no difference in age between septic and aseptic nonunion ($p=1.000$) or septic nonunion and regular healers ($p=0.072$). The distribution of open and closed fractures differed significantly between the groups, as open fractures occurred more frequently in nonunion compared to regular healers ($p=0.005$). The number of tissue cultures for

Table 1 Comparison of patient characteristics between the study groups

Characteristics of the patients	Septic nonunion		Aseptic nonunion		Regular healers		p value
	N	%	N	%	N	%	
Sex							0.092 ^a
Male	34	81	32	60	21	66	
Female	8	19	21	40	11	34	
Age							0.007 ^b
Mean ± SD [years]	45 ± 15		48 ± 15		38 ± 16		
Fracture							0.003 ^a
Closed	20	48	28	53	27	84	
Open	22	52	25	47	5	16	
Bone							0.358 ^a
Femur	13	31	24	45	12	38	
Tibia	29	69	29	55	20	63	
Fracture localization							0.155 ^c
Proximal shaft third	4	10	4	8	6	19	
Medial shaft third	14	33	29	55	12	38	
Distal shaft third	22	52	17	32	14	44	
Two different shaft thirds	2	5	3	6			

^a Pearson's chi-square test

^b Kruskal–Wallis test

^c Fisher's exact test

Table 2 Comparison of sample characteristics between the study groups

Sample characteristics	Septic nonunion		Aseptic nonunion		Regular healers		p value
	N	%	N	%	N	%	
Sonicated osteosynthesis material							0.086 ^a
Intramedullary nail (+ screws)	28	67	37	70	29	91	
Plate (+ screws)	12	29	15	28	3	9	
Intramedullary nail + plate (+ screws)	2	5	1	2			
Sonication container							0.128 ^a
Glass tube	38	91	47	89	32	100	
Lock'n'lock box	4	10	6	11			

^a Fisher's exact test

the clinical diagnosis of infection was larger for septic nonunion (4 ± 2) compared to aseptic nonunion (3 ± 2 ; $p = 0.006$). There were no significant between-group differences regarding type of osteosynthesis or sonication conditions (Table 2). Revision surgery with implant removal occurred at a median of 11.7 months (range: 2.4–48.9) after definitive stabilization in the septic nonunion group and at a median of 10.1 months (range: 4.1–41.2) in the aseptic nonunion group. In the regular healer group, routine metal removal was performed at a median of 15.1 months (range: 9.5–28.9) after internal fracture fixation.

Detection of septic nonunion by CFU quantification

ROC analyses for the MF method were performed for separation between septic and aseptic nonunion and between septic nonunion and regular healers, respectively. Both ROC curves had an area under the curve of 0.8. The ROC curve analysis for the best cut-off value revealed ≥ 13.6 CFU/10 ml SF for differentiation between aseptic and septic nonunion (high cut-off; Fig. 2A) and ≥ 0.6 CFU/10 ml SF for differentiation between regular healers and septic nonunion (low cut-off; Fig. 2B).

A large spectrum of different bacterial species were detected in all three study groups (Table 3). In septic nonunion, coagulase-negative staphylococci (CoNS) and *Cutibacterium acnes* were the most commonly detected pathogens. In aseptic nonunion and regular healers, the majority of samples were culture negative. Positive SF cultures in aseptic nonunion or regular healers were mainly due to CoNS and *C. acnes*. MF demonstrated a higher

detection rate of polymicrobial infections compared to TC and broth-cultured SF ($p < 0.001$). All negative controls for sonication had no bacterial contamination.

The diagnostic value of sonication was assessed by comparing the diagnostic performances for the different methods to conventional diagnostics (Table 4). Fourteen-day TC demonstrated high performance. The sensitivity of histopathology was extremely low. SF broth culture had a higher sensitivity than the MF high cut-off, whereas its specificity was lower. In comparison to broth-cultured SF, PPV was higher for the MF high cut-off. Upon using the lower cut-off, the PPV decreased but the NPV was highest of all the SF analysis methods. Regular healers with positive test results were represented across all methods. The MF low cut-off criterion demonstrated the highest positive-test rate in regular healers and the SF broth culture presented the second highest, followed by histopathology. TC and the MF high cut-off had the lowest positive-test rates in regular healers compared to the other methods.

Sonication as a confirmatory diagnostic criterion increases sensitivity

To avoid a false-positive infection diagnosis, a confirmatory second criterion should be present. Thus, we analyzed the detection rate of septic nonunion by one positive TC in combination with another positive test method (Table 5). For these analyses, clinical findings were also considered. The same number of patients with septic nonunion could be detected by two TCs with the same pathogen and the combination of TC with SF broth

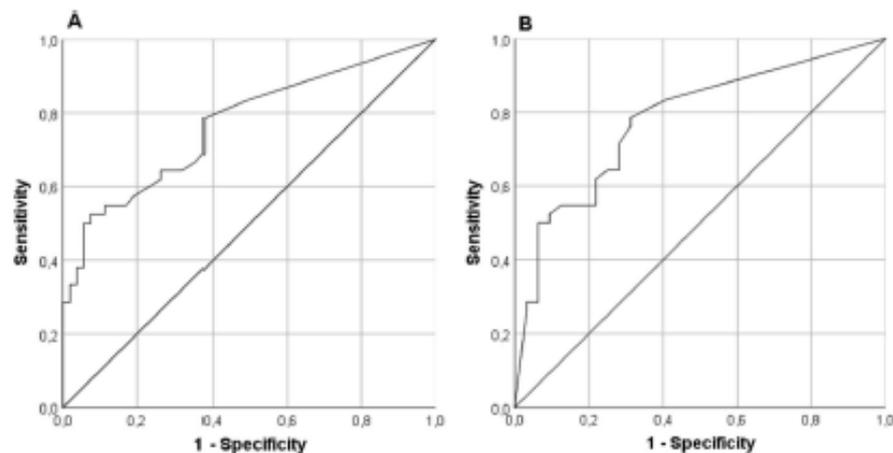


Fig. 2 ROC curves for group discrimination based on CFU per ml sonication fluid (SF) determined by the membrane filtration method. **A** Discrimination of aseptic and septic nonunion; AUC = 0.77 (95% CI 0.67–0.87); optimal cut-off value that maximizes the Youden Index (0.45) is ≥ 13.6 CFU/10 ml SF. **B** Discrimination of regular healed fractures and septic nonunion; AUC = 0.78 (95% CI 0.67–0.89); optimal cut-off value that maximizes the Youden Index (0.47) is ≥ 0.6 CFU/10 ml SF

Table 3 Overview of detected microorganisms in the three study groups

Study group	Culture results	TC		SF broth culture		MF	
		N	%	N	%	N	%
Septic nonunion (N= 42)	Negative	13	31	13	31	20	48
	1 species/sample	26	90	26	90	11	50
	2 species/sample	3	10	3	10	7	32
	3 species/sample	–	–	–	–	4	18
	<i>Cutibacterium acnes</i>	10	31	3	9	6	16
	CoNS	16	50	24	75	25	68
	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	13	1	3	1	3
	<i>Ringoldia magna</i>	1	3	2	6	1	3
	<i>Serratia marcescens</i>	1	3	1	3	1	3
	<i>Enterococcus faecalis</i>	–	–	1	3	1	3
	<i>Corynebacterium</i> spp.	–	–	–	–	2	5
	Aseptic nonunion (N= 53)	Negative	51	96	43	81	49
1 species/sample		2	100	10	100	–	–
2 species/sample		–	–	–	–	3	75
3 species/sample		–	–	–	–	1	25
<i>Cutibacterium acnes</i>		–	–	4	40	3	33
CoNS		1	50	5	50	5	56
<i>Kocuria varians</i>		1	50	–	–	–	–
<i>Brevibacillus choshinensis</i>		–	–	1	10	–	–
<i>Corynebacterium</i> spp.		–	–	–	–	1	11
Regular healers (N= 32)		Negative	29	91	23	72	29
	1 species/sample	2	67	8	89	2	67
	2 species/sample	1	33	1	11	1	33
	<i>Cutibacterium acnes</i>	2	50	1	10	2	50
	CoNS	1	25	5	50	1	25
	<i>Corynebacterium</i> spp.	1	25	1	10	–	–
	<i>Bacillus</i> spp.	–	–	3	30	1	25

TC tissue culture (14-day culture of study tissue sample), SF sonication fluid (10-day culture of sonication fluid in broth), MF membrane-filtrated sonication fluid (cut-off value: ≥ 13.6 CFU/10 ml), CoNS coagulase-negative staphylococci, spp. species

Table 4 Performances of different test methods when discriminating between aseptic and septic nonunion

Test method	Septic nonunion	Aseptic nonunion	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Regular healers
	No. of patients who tested positive	No. of patients who tested positive	% (95% CI)				No. of patients who tested positive
Long-term TC (study sample)	29/42	2/53	69 (53–82)	96 (86–99)	94 (77–99)	80 (67–88)	3/32
Histopathology (study sample)	6/42	7/53	14 (6–29)	87 (74–94)	46 (20–74)	56 (45–67)	5/32
SF broth culture	29/42	10/53	69 (53–82)	81 (68–90)	74 (58–86)	77 (63–87)	9/32
MF (≥ 0.6 CFU/10 ml)	33/42	20/53	79 (63–89)	62 (48–75)	62 (48–75)	79 (63–89)	10/32
MF (≥ 13.6 CFU/10 ml)	22/42	4/53	52 (37–68)	93 (81–98)	85 (64–95)	71 (59–81)	3/32

PPV positive predictive value, NPV negative predictive value, CI confidence interval, TC tissue culture, SF sonication fluid, MF membrane-filtrated sonication fluid

culture. The MF low cut-off as a secondary diagnostic criterion identified the largest number of septic nonunions compared with any other combination.

Discussion

Treatment decisions in disturbed fracture healing situations rely on a reliable diagnosis of presence or absence

Table 5 Septic nonunion detection rates when using one positive TC in combination with another confirmatory diagnostic criterion

Confirmatory criteria for the diagnosis of septic nonunion	No. of detected septic nonunions	Sensitivity % (95% CI)
≥ 2 Positive TCs with the same pathogen	23/42	55 (39–70)
≥ 1 Positive TC + histopathology with infection signs	10/42	24 (13–40)
≥ 1 Positive TC + same pathogen in SF broth culture	23/42	55 (39–70)
≥ 1 Positive TC + same pathogen in MF (≥ 0.6 CFU/10 ml)	26/42	62 (46–76)
≥ 1 Positive TC + same pathogen in MF (≥ 13.6 CFU/10 ml)	21/42	50 (34–66)

TC tissue culture, CI confidence interval, SF sonication fluid, MF membrane-filtrated sonication fluid, CFU colony-forming units

of infection. Established diagnostic criteria for FRI that have been adapted from PJI have so far failed to consider the unique circumstances of fracture healing complications [15, 21]. The central issue in our investigation was to evaluate the diagnostic value of sonication in nonunion differentiation. Our findings suggest that aseptic and septic nonunion can be differentiated by sonication, with sonication being superior to histopathology but inferior to tissue culture. Membrane filtration of sonication fluid in combination with tissue culture increases sensitivity compared to conventional diagnostics and also improves the capacity for detecting polymicrobial infections.

Our study evaluated quantitative CFU thresholds for the diagnosis of FRI, enabling existent infection to be distinguished from contaminated implants [19]. To define the contamination threshold of bacteria usually present on removed implants, we included the group of regular healers. Furthermore, the comparison between septic and aseptic nonunion enabled us to identify a cut-off value for the detection of infection in disturbed fracture healing situations. Both cut-off values demonstrated acceptable discriminatory power [22]. Detection of bacteria in regular healers was most likely due to contamination during surgery or the sampling procedure with skin or airborne microorganisms. Contamination during the laboratory process can be excluded, as negative controls presented no colony growth. Bacterial colonization was higher in aseptic nonunion compared to regular healers. This might be due to bacterial accumulation in nonvital scar tissue in the nonunion zone and colonization of the implant surface. However, this small amount of bacteria did not appear to have any clinical relevance in terms of invading surrounding tissue, as aseptic nonunion with small-scale biofilms on implants did not show further infection signs within 1 year. Bacterial colonization without any clinical relevance was described in patients with aseptic total joint replacement, where 16% demonstrated a positive sonication [23]. Also, bacterial colonization on 40% of routinely removed osteosynthesis material has been reported [2], as it has on 27% of hip implants in patients without infection signs [24]. Such high bacterial colonization rates underline the importance of a CFU

cut-off value. Our calculated higher threshold resulted in higher specificity and PPV in comparison to SF broth culture and the lower cut-off. Low microbial loads with no clinical relevance are thus filtered out by the higher cut-off. In contrast, SF in broth leads to bacterial enrichment. 28% of the healers had a positive SF broth culture; using membrane filtration (high cut-off), this number was reduced to 9%.

For sonication, there is no consensus on a uniform sonication protocol or uniform CFU thresholds for infection diagnosis—not even for PJI. Trampuz et al. calculated a CFU cut-off and defined 5 CFU/plate (corresponds to 10 CFU/ml) as the ideal threshold to discriminate between PJI and aseptic failure [19]. However, the CFU cut-offs used in studies range between 1 and 50 CFU/plate [8, 10, 21, 25–30]. Different sonication protocols with variations in the initial fluid volume affect the CFU/ml concentration and prevent the definition of a universal cut-off value. The ROC curves in our study show a relationship between the extent of bacterial implant colonization and the clinical relevance. Thus, we successfully identified SF membrane filtration with CFU quantification as a helpful method to distinguish infected femoral or tibial nonunion from aseptic nonunion or contaminated implants.

However, the value of sonication has to be seen in the context of conventional diagnostics. Therefore, we considered the performances of the diagnostic methods in isolation from each other. With reference to our results, TC shows the highest PPV and NPV. Depending on the SF analysis method or CFU cut-off, sonication can partially match or even exceed TC's sensitivity, but the specificity of sonication is lower. Onsea et al. reviewed five studies that investigated the accuracy of TC in comparison to sonication. In three studies, sonication demonstrated significantly higher accuracy. However, none of these studies were sufficiently powered, and only one study assessed the diagnostic tests separately for fracture-related infections. Thus, the authors could not conclude that sonication is superior to TC [14]. Our results cannot confirm this either, but they support the value of TC in FRI diagnosis. However, the disadvantages of

long-term TC have to be considered. Depending on the clinical standard, long-term culture taking 10–14 days is necessary [1, 31]. In contrast, results from the membrane filtration of SF are available within a few days with relatively high predictive values. This may be beneficial, especially in low-grade infections. These presumably aseptic patients have usually been discharged from the hospital by the time the long-term culture results are available, so antibiotic therapy may not be administered even when clinically indicated. Patients with septic nonunion may also benefit from rapid microbial findings, as their antibiotic therapy can be tailored to the actual bacteria present.

According to our analyses, the method with the poorest sensitivity in the diagnosis of septic nonunion was histopathology, which is in contrast to two previous studies [32, 33]. This may be due to the fact that our study included low-grade infections with osteomyelitis signs that are too weak to be identified with HOES. Egol et al., however, also reported poor sensitivity of frozen (0%) and permanent section histopathology (33%) to infected nonunion [34]. Furthermore, a low sensitivity has been reported in several investigations of the value of histology for differentiating septic and aseptic prosthesis loosening [35–39]. Recently, an international group of experts declared histopathology alone to be a confirmatory criterion for the diagnosis of FRI [15]. With reference to our data, this cannot be confirmed for femur and tibia shaft nonunion. Eight patients with histopathological infection signs as a single criterion were diagnosed as “aseptic,” taking into account the healing course of 1 year. Seven of these patients healed without further infection-specific treatment, while one had not consolidated after 12 months but an underlying infection was excluded. In this context, the positive histopathology test rate of 16% in regular healers should also be mentioned. The value of histopathology in the differential diagnosis of femoral and tibial shaft nonunion should therefore be reconsidered. In view of the good diagnostic performance of the TC shown in our study, more attention should be paid to a single positive long-term TC; for example, if only a few samples were taken in revision surgery because an aseptic nonunion was assumed.

In order to avoid a false-positive FRI diagnosis, the clinical diagnostic standard is based on two criteria, one suggestive and one confirmatory [18]. According to our data for the combination of a TC with the same pathogen in SF, the sensitivity varies depending on the culture method or CFU cut-off. Disagreements about the value of sonication for FRI diagnosis also exist in the current literature. Dudareva et al. investigated the performance of paired TCs and sonication in the diagnosis of PJI and other orthopedic-device-related infections and found that TC was superior [8]. Ueda et al. demonstrated that

a more accurate diagnosis of FRI was achieved using a combination of TC or joint aspirate culture with a positive SF culture rather than two positive TCs [21]. Onsea et al. concluded that there is limited evidence of SF being a useful adjunct to TC [14]. With the findings of our study, we have now provided evidence that sonication is a valuable addition to TC: We found that the highest sensitivity for a septic nonunion diagnosis was achieved with a combination of one positive TC and the same pathogen in membrane filtration of SF (low cut-off). Including sonication increases the sensitivity to 62%. The low cut-off is superior to the higher one because five septic nonunions exceed the low cut-off but do not reach the higher threshold. Therefore, we suggest that the lower cut-off should be taken into account to confirm a positive TC.

Nevertheless, based on our results, none of the combined methods demonstrated a sufficient sensitivity. Thus, the diagnosis of septic nonunion should consider different methods to maximize the infection detection rate. For this purpose, sonication seems to be a good additive diagnostic tool that increases sensitivity in combination with TC.

For treatment, it is also important to identify the infection-causing pathogens in order to initiate an appropriate antibiotic therapy. Therefore, we focused on the detected microorganisms. Although culture-negative rates were high in aseptic nonunion and regular healers, the same species present in septic nonunion were still detected in these groups. Common microorganisms in septic nonunion were coagulase-negative staphylococci and *Cutibacterium acnes*. These microorganisms were detected across all methods, which is consistent with other studies [33, 40]. However, the number of species detected in one specimen differed among the different methods. This may be due to the fact that it is more difficult to isolate bacterial strains from culture broth than from a solid culture medium [41]. Additionally, potential competition for nutrients and limited space must be considered in broth cultures [42]. The identification of polymicrobial infections is of clinical relevance due to antibiotic resistances requiring bacteria-specific antibiotics. However, in this context, it should be mentioned that five microorganisms in the SF broth culture could not be detected by membrane filtration of SF. This can be explained not only by different culture media and incubation times but also by the coarse filtration step before membrane filtration which removes small tissue particles, whereas unfiltered SF was inoculated in broth. In two of these cases the same microorganism was identified by TC. Apart from additionally detected species and culture-negative results for individual methods, seven septic nonunions demonstrated discrepant positive culture results between

the methods. However, these discrepancies were partly relativized by matching clinical results. Inconsistencies like that and the similar bacteria spectrum across all groups underline that an approach which combines diagnostic methods can be used to avoid false-positive diagnosis.

The study had some limitations. First, SF concentration was achieved by membrane filtration instead of centrifugation. Because membrane filtration has previously shown disadvantages compared to centrifugation [26], we decided to use membrane filtration in a modified form due to the possibility of a higher SF concentration, as we suspected small-scale biofilms of being clinically relevant and negatively affecting fracture healing. Compared to centrifugation, a larger amount of SF could be examined by membrane filtration, corresponding to a microbial examination of 53% of the total implant surface. Regardless, this present study is the first to examine CFU thresholds in FRI, and it was demonstrated that membrane filtration is of value for infection diagnosis.

Second, the incubation period for anaerobic-membrane-filtrated SF cultures was 5 days to obtain countable, distinct colonies, which is short, especially for the detection of *C. acnes*. However, in our study, the anaerobic atmosphere was generated using an Anoxomat system, and evaluation studies of such systems demonstrated that many anaerobic bacteria grow faster under anaerobic conditions created by an Anoxomat than by the conventional gas-pak method [43, 44]. Another study investigated the detection of *C. acnes* growth from orthopedic-implant-associated infections using different culture methods, and detected a growth rate of 99% on sheep blood agar under anaerobic conditions created by an Anoxomat, with a mean and standard deviation of time to detection of 54 ± 10 h [45]. While we cannot rule out the possibility that the short incubation period may have led to an underestimated sensitivity of membrane filtration of sonication fluid with respect to the detection of *C. acnes* in our study, we still assume a high detection rate.

Third, the groups differed in age and fracture type. The regular healer group were younger than the aseptic nonunion group, as fewer healing complications occur in younger patients due to physiological processes and they have fewer open fractures. These differences should not affect the findings from our study, which was on nonunion differential diagnosis.

Furthermore, due to the study design, the number of TC samples differed between septic and aseptic nonunion. Apparently, when the patient demonstrated clinical infection signs, surgeons collected more samples to identify the infection-causing bacteria. Despite this, we

are confident that all septic and aseptic nonunions were accurately identified, as we were able to follow up the healing course for 1 year to get the definitive diagnosis.

Finally, it should be noted that TC is the gold standard in FRI diagnostics and was also decisive for septic nonunion identification in the present study. Therefore, evaluating the diagnostic performance of TC is difficult. Nevertheless, in order to compare TC with other methods, we only considered the additional study TC that was processed in a standardized manner for performance analyses.

These limitations are countered by significant strengths of the study. In contrast to other studies that processed samples from multiple sites [2, 8–13, 21, 25–27, 29] or included prosthetic infections [8, 9, 11–13, 21, 26], the present study included only osteosynthesis implants of femur and tibia shafts. Furthermore, in contrast to other studies [2, 8–10, 23, 25–29, 46], the entire implants were sonicated, which makes sonication results more comparable between patients and improves the reliability of CFU thresholds. Finally, a great strength is the inclusion of a group of regular healers. Thus, it was possible to take bacterial contamination of removed implants into account.

In conclusion, the results of this present study support a multimodal approach for the differential diagnosis of infection in fracture nonunion, including clinical, microbiological and histopathological findings. Among these different methods, sonication was demonstrated to have substantial usefulness. Membrane filtration of sonication fluid improves the differential diagnosis in nonunion, reduces the time to culture positivity, and detects polymicrobial infections more frequently. These are important clinical aspects for an early initiation of bacteria-specific antibiotics.

Abbreviations

AUC	Area under the curve
CFU	Colony-forming units
CI	Confidence interval
CoNS	Coagulase-negative staphylococci
FRI	Fracture-related infection
HOES	Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score
MF	Membrane filtration
NPV	Negative predictive value
PJI	Prosthetic joint infection
PPV	Positive predictive value
ROC	Receiver operating characteristic
SF	Sonication fluid
TC	Tissue culture

Acknowledgements

Septic/Aseptic Nonunion Differentiation (SAND) Research Group; Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Murnau: Matthias Miltz, Simon Hackl, Ferdinand Weisemann, Katharina Trenkwalder, Sandra Erichsen, Christian von Räden, Tobias Hentschel, Peter Augat; Berufsgenossenschaftliche Klinik Tübingen: Heiko Baumgartner, Marie Reumann; Berufsgenossenschaftliche Klinik Ludwigshafen: Georg Reiter, Holger Freischmidt; Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik

Frankfurt: Matthias Kemmerer; *Berufsgenossenschaftliches Klinikum Bergmannstrasse* Halle: Steffen Langwald, John Hanke; *Berufsgenossenschaftliches Klinikum Duisburg*: Martin Glombitza, Eva Steinhausen; *Berufsgenossenschaftliches Klinikum Hamburg*: Ulf-Joachim Gerlach; *Berufsgenossenschaftliches Klinikum Unfallkrankenhaus Berlin*: Nikolai Spranger; *Berufsgenossenschaftliche Kliniken—Klinikverbund*: Dirk Stengel.

Author contributions

KT contributed to the conceptualization and implementation of the multicenter study, the laboratory methodology, laboratory analyses, statistical analyses, and drafted the article. SE contributed to the implementation of the multicenter study and laboratory analyses. FW, TH, SH and members of the SAND Research Group contributed to patient recruitment and the sample and data collection. SH, MM and PA contributed to the study design, funding acquisition, implementation, and supervised the study. SH, PA and CwR reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by the German Social Accident Insurance, DGUV grant number FF-FR 0276. The findings and conclusions in this paper are those of the authors and do not necessarily represent the views of the German Social Accident Insurance.

Availability of data and materials

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study adhered to the tenets of the Helsinki Declaration and according to the guidelines and the approval of the Ethics Committee of the Institutional and National Medical Board (Bavarian State Chamber of Physicians, ID 2016-16041). In addition, the other seven study centers received further approval from their local ethics committees. All patients gave their written consent before study inclusion.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

All authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Institute for Biomechanics, BG Unfallklinik Murnau, Professor-Küntschner-Str. 8, 82418 Murnau am Staffelsee, Germany. ²Institute for Biomechanics, Paracelsus Medical University, Stubergasse 21, 5020 Salzburg, Austria. ³Department of Trauma Surgery, BG Unfallklinik Murnau, Professor-Küntschner-Str. 8, 82418 Murnau am Staffelsee, Germany.

Received: 24 January 2023 Accepted: 7 May 2023

Published online: 12 June 2023

References

- Hackl S, Keppler L, von Rüden C, Friederichs J, Perl M, Hierholzer C (2021) The role of low-grade infection in the pathogenesis of apparently aseptic tibial shaft nonunion. *Injury* 52:3498–3504. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2021.08.014>
- Dapunt U, Spranger O, Ganitz S, Burckhardt I, Zimmermann S, Schmidmaier G et al (2015) Are atrophic long-bone nonunions associated with low-grade infections? *Ther Clin Risk Manag* 11:1843–1852. <https://doi.org/10.2147/tcrm.S91532>
- Nelson CL, McLaren AC, McLaren SG, Johnson JW, Smeltzer MS (2005) Is aseptic loosening truly aseptic? *Clin Orthop Relat Res* 437:25–30. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000175715.68624.3d>
- 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*. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000073345.50837.84>
- Oliva A, Miele MC, Al Ismail D, Di Timoteo F, De Angelis M, Rosa L et al (2021) Challenges in the microbiological diagnosis of implant-associated infections: a summary of the current knowledge. *Front Microbiol*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750460>
- Van Diek FM, Albers CGM, Van Hooff ML, Meis JF, Goosen JHM (2017) Low sensitivity of implant sonication when screening for infection in revision surgery. *Acta Orthop* 88:294–299. <https://doi.org/10.1080/17453674.2017.1300021>
- Grosso MJ, Frangiamore SJ, Yakubek G, Bauer TW, Iannotti JP, Ricchetti ET (2018) Performance of implant sonication culture for the diagnosis of periprosthetic shoulder infection. *J Shoulder Elbow Surg* 27:211–216. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2017.08.008>
- Dudareva M, Barrett L, Figtree M, Scarborough M, Watanabe M, Newnham R et al (2018) Sonication versus tissue sampling for diagnosis of prosthetic joint and other orthopedic device-related infections. *J Clin Microbiol*. <https://doi.org/10.1128/jcm.00688-18>
- Puig-Verdié L, Alentorn-Geli E, González-Cuevas A, Sorli L, Salvadó M, Alier A et al (2013) Implant sonication increases the diagnostic accuracy of infection in patients with delayed, but not early, orthopaedic implant failure. *Bone Jt J*. <https://doi.org/10.1302/0301-620x95b2.30486>
- Yano MH, Klautau GB, da Silva CB, Nigro S, Avanzi Q, Mercadante MT et al (2014) Improved diagnosis of infection associated with osteosynthesis by use of sonication of fracture fixation implants. *J Clin Microbiol* 52:4176–4182. <https://doi.org/10.1128/jcm.02140-14>
- Portillo ME, Salvadó M, Trampuz A, Siverio A, Alier A, Sorli L et al (2015) Improved diagnosis of orthopedic implant-associated infection by inoculation of sonication fluid into blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 53:1622–1627. <https://doi.org/10.1128/jcm.03683-14>
- Esteban J, Gomez-Barrena E, Cordero J, Martín-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Fernandez-Roblas R (2008) Evaluation of quantitative analysis of cultures from sonicated retrieved orthopedic implants in diagnosis of orthopedic infection. *J Clin Microbiol* 46:488–492. <https://doi.org/10.1128/jcm.01762-07>
- Holinka J, Bauer L, Hirschl AM, Graninger W, Windhager R, Presterl E (2011) Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 29:617–622. <https://doi.org/10.1002/jor.21286>
- Onsea J, Depypere M, Govaert G, Kuehl R, Vandendriessche T, Morgenstern M et al (2018) Accuracy of tissue and sonication fluid sampling for the diagnosis of fracture-related infection: a systematic review and critical appraisal. *J Bone Jt Infect* 3:173–181. <https://doi.org/10.7150/bj.27840>
- Govaert GAM, Kuehl R, Atkins BL, Trampuz A, Morgenstern M, Obrensky WT et al (2020) Diagnosing fracture-related infection: current concepts and recommendations. *J Orthop Trauma* 34:8–17. <https://doi.org/10.1097/bot.0000000000001614>
- Fisher JS, Kazam JJ, Fufa D, Bartolotta RJ (2019) Radiologic evaluation of fracture healing. *Skeletal Radiol* 48:349–361. <https://doi.org/10.1007/s00256-018-3051-0>
- Schmidmaier G, Moghaddam A (2015) Long bone nonunion. *Z Orthop Unfall*. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1558259>
- Meisemakers WJ, Morgenstern M, McNally MA, Moriarty TF, McFadyen I, Scarborough M et al (2018) Fracture-related infection: a consensus on definition from an international expert group. *Injury* 49:505–510. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2017.08.040>
- Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR et al (2007) Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 357:654–663. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA061588>
- Tiemann A, Hofmann GO, Krukenmeyer MG, Kenn V, Langwald S (2014) Histopathological osteomyelitis evaluation score (HOES)—an innovative approach to histopathological diagnostics and scoring of osteomyelitis. *GMS Interdiscip Plastic Reconstr Surg DGPW*. <https://doi.org/10.3205/iprs00049>
- Ueda N, Oe K, Nakamura T, Tsuta K, Iida H, Saito T (2019) Sonication of extracted implants improves microbial detection in patients with orthopedic implant-associated infections. *J Arthroplasty* 34:1189–1196. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2019.02.020>

22. Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant RX (2013) Assessing the fit of the model. In: Hosmer DW, Lemeshow S, Sturdivant RX (eds) Applied logistic regression, 3rd edn. Wiley, New York
23. Rothenberg AC, Wilson AE, Hayes JP, O'Malley MJ, Klatt BA (2017) Sonication of arthroplasty implants improves accuracy of periprosthetic joint infection cultures. *Clin Orthop Relat Res* 475:1827–1836. <https://doi.org/10.1007/s11999-017-5315-8>
24. Fuchs M, Kinzel S, Gwinner C, Perka C, Renz N, von Roth P (2019) Clinically asymptomatic patients show a high bacterial colonization rate of osteosynthetic implants around the knee but not the hip. *J Arthroplasty* 34:1761–1766. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2019.03.058>
25. Maniar HH, Wingert N, McPhillips K, Foltzer M, Graham J, Bowen TR et al (2016) Role of sonication for detection of infection in explanted orthopaedic trauma implants. *J Orthop Trauma* 30:e175–e180. <https://doi.org/10.1097/bot.0000000000000512>
26. Zitron R, Wajsfeld T, Klautau GB, da Silva CB, Nigro S, Mercadante MT et al (2016) Concentration of sonication fluid through centrifugation is superior to membrane filtration for microbial diagnosis of orthopaedic implant-associated infection. *J Clin Microbiol* 54:788–790. <https://doi.org/10.1128/jcm.02427-15>
27. Portillo ME, Salvadó M, Trampuz A, Plasencia V, Rodríguez-Villasante M, Sorli L et al (2013) Sonication versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol* 51:591–594. <https://doi.org/10.1128/jcm.02482-12>
28. Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Gomez Urena EO et al (2013) Rapid molecular microbiologic diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol* 51:2280–2287. <https://doi.org/10.1128/jcm.00335-13>
29. Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wüst 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. <https://doi.org/10.1128/jcm.00006-10>
30. Piper KE, Jacobson MJ, Cofield RH, Sperling JW, Sanchez-Sotelo J, Osmon DR et al (2009) Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection by use of implant sonication. *J Clin Microbiol* 47:1878–1884. <https://doi.org/10.1128/jcm.01686-08>
31. Schäfer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L (2008) Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis* 47:1403–1409. <https://doi.org/10.1086/592973>
32. Simpson AH, Wood MK, Athanasou NA (2002) Histological assessment of the presence or absence of infection in fracture non-union. *Injury* 33:151–155. [https://doi.org/10.1016/s0020-1383\(01\)00078-x](https://doi.org/10.1016/s0020-1383(01)00078-x)
33. Morgenstern M, Athanasou NA, Ferguson JY, Metsemakers WJ, Atkins BL, McNally MA (2018) The value of quantitative histology in the diagnosis of fracture-related infection. *Bone Jt J* 100-b966–972. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.100b7.Bj-2018-0052.R1>
34. Egol KA, Karunakar MA, Maroum MC, Sims SH, Kellam JF, Bosse MJ (2002) Detection of indolent infection at the time of revision fracture surgery. *J Trauma* 52:1198–1201. <https://doi.org/10.1097/00005373-200206000-00030>
35. Bori G, Soriano A, Garcia S, Gallart X, Casanova I, Mallofe C et al (2006) Low sensitivity of histology to predict the presence of microorganisms in suspected aseptic loosening of a joint prosthesis. *Mod Pathol* 19:874–877. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800606>
36. Abdul-Karim FW, McGinnis MG, Krazy M, Errampicator SN, Goldberg V (1998) Frozen section biopsy assessment for the presence of polymorphonuclear leukocytes in patients undergoing revision of arthroplasties. *Mod Pathol* 11:427–431
37. Ko PS, Ip D, Chow KP, Cheung F, Lee OB, Lam JJ (2005) The role of intraoperative frozen section in decision making in revision hip and knee arthroplasties in a local community hospital. *J Arthroplasty* 20:189–195. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2004.06.034>
38. Banit DM, Kaufer H, Hartford JM (2002) Intraoperative frozen section analysis in revision total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. <https://doi.org/10.1097/00003086-200208000-00026>
39. Musso AD, Mohanty K, Spencer-Jones R (2003) Role of frozen section histology in diagnosis of infection during revision arthroplasty. *Postgrad Med J* 79:590–593. <https://doi.org/10.1136/pmj.79.936.590>
40. Oichwemah R, Moczko T, Marche B, Mattner F, Probst C, Tjardes T (2020) High prevalence of bacteria in clinically aseptic non-unions of the tibia and the femur in tissue biopsies. *Eur J Trauma Emerg Surg* 46:1093–1097. <https://doi.org/10.1007/s00068-018-1010-z>
41. Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, Khelaifa S (2020) Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect* 34:100622. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>
42. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 8:15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
43. Shahin M, Jamal W, Verghese T, Rotimi VO (2003) Comparative evaluation of anaeromat and conventional anaerobic GasPak jar systems for the isolation of anaerobic bacteria. *Med Princ Pract* 12:81–86. <https://doi.org/10.1159/000069116>
44. Summanen PH, McTeague M, Väisänen ML, Strong CA, Finegold SM (1999) Comparison of recovery of anaerobic bacteria using the anaeromat, anaerobic chamber, and GasPak jar systems. *Anaerobe* 5:5–9. <https://doi.org/10.1006/anae.1999.0184>
45. Jeverica S, El Sayed F, Čamernik P, Kocjančič B, Sluga B, Rottman M et al (2020) Growth detection of cutibacterium acnes from orthopaedic implant-associated infections in anaerobic bottles from BACTEC and BacT/ALERT blood culture systems and comparison with conventional culture media. *Anaerobe* 61:102133. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102133>
46. Evangelopoulos DS, Stathopoulos IP, Morassi GP, Koufos S, Albarni A, Karampinas PK et al (2013) Sonication: a valuable technique for diagnosis and treatment of periprosthetic joint infections. *Sci World J*. <https://doi.org/10.1155/2013/375140>

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](https://www.springeropen.com)