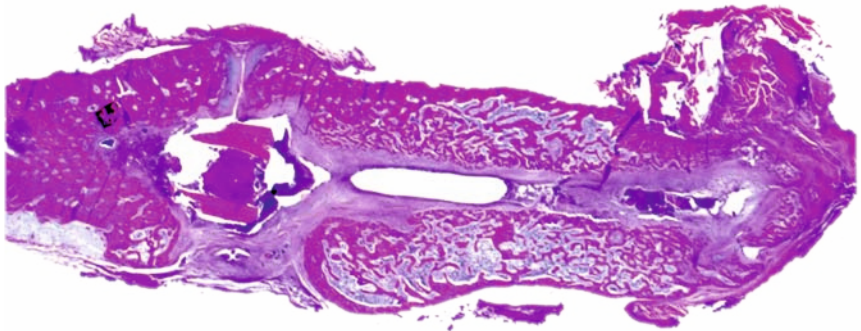


**Dominik Muhrer**

Ein neues Tiermodell zur Induktion infizierter  
Pseudarthrosen an der Tibia und Nachweis von  
Bakterien im Knochengewebe mittels  
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

---

Etablierung eines neuen Tiermodells bei Ratten



**INAUGURALDISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Ein neues Tiermodell zur Induktion infizierter Pseudarthrosen  
an der Tibia und Nachweis von Bakterien im Knochengewebe  
mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

**Etablierung eines neuen Tiermodells bei Ratten**

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Dominik Muhrer**

aus Gießen

Gießen 2013

**Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen**

**Direktor:**

**Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. med. Dr. h.c. Dr. med. vet.**

**Reinhard Schnettler**

**Gutachter: Prof. Dr. Dr. V. Alt**

**Gutachter: Prof. Dr. E. Domann**

**Tag der Disputation: 25.09.2013**

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung .....	1
1.1. Offene und geschlossene Frakturformen .....	1
1.1.1. Die Klassifikation von offenen und geschlossenen Schienbeinfrakturen .....	1
1.1.2. Häufigkeit und Verteilung offener Tibiafrakturen .....	5
1.1.3. Management von offenen Unterschenkelfrakturen .....	6
1.2. Osteitis .....	9
1.2.1. Akute posttraumatische und postoperative Osteitis .....	9
1.2.1.1. Pathophysiologie .....	11
1.2.1.2. Klinische Zeichen der akuten Osteitis .....	13
1.2.1.3. Bildgebende Verfahren der akuten Osteitis .....	14
1.2.1.4. Bakteriologischer Keimnachweis .....	15
1.2.1.5. Therapie der akuten Osteitis .....	17
1.2.2. Chronifizierung der Osteitis .....	19
1.2.2.1. Pathophysiologie der chronischen Osteitis .....	19
1.2.2.2. Klinische Zeichen der chronischen Osteitis .....	22
1.2.2.3. Bildgebende Verfahren bei der chronischen Osteitis .....	24
1.2.2.4. Histomorphologie der chronischen Osteitis .....	25
1.2.2.5. Bakteriologischer Keimnachweis .....	27
1.2.2.6. Therapie der chronischen Osteitis .....	27
1.2.3. Infizierte Pseudarthrose .....	29
1.2.3.1. Pathophysiologie der infizierten Pseudarthrose .....	31
1.2.3.2. Klinische Zeichen der infizierten Pseudarthrose .....	32
1.2.3.3. Bildgebende Verfahren bei der infizierten Pseudarthrose .....	32
1.2.3.4. Bakteriologischer Keimnachweis .....	33

1.2.3.5. Therapie der infizierten Pseudarthrose .....	34
1.3. Zusammenhang zwischen Schweregrad der Fraktur und infizierter Pseudarthrose .....	35
1.4. Zielsetzung.....	39
2. Material und Methoden .....	42
2.1. Tierversuche .....	42
2.1.1. Ethikkommissionsvotum.....	42
2.1.2. Versuchstiere .....	42
2.1.3. Pilotstudiendesign .....	42
2.1.4. Hauptstudiendesign.....	44
2.2. Erreger .....	45
2.3. Versuchsdurchführung .....	47
2.3.1. Narkose .....	47
2.3.2. Operationsvorbereitung.....	47
2.3.3. OP-Technik .....	48
2.3.4. Postoperative Röntgenkontrolle .....	52
2.3.5. Postoperative systemische Antibiotikaphylaxe .....	
und Nachbeobachtung .....	53
2.3.6. Dokumentation des Körpergewichts .....	54
2.3.7. Euthanasie, klinische Beurteilung der Infektion und der Knochenstabilität .....	54
2.3.8. Röntgenuntersuchung .....	55
2.3.9. Entnahme der Tibia .....	56
2.3.9.1. Überprüfung der Knochenstabilität .....	57
2.3.9.2. Ausrollen des Implantats auf Agarplatten .....	58
2.3.9.3. Verwendung der Tibiahälften .....	58
2.3.9.4. Aufbereitung von Knochenproben für Bakterienkulturwachstumstest .....	59

2.4. Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	60
2.5. Histologie .....	61
2.6. Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	62
2.7. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	62
2.8. Micro-CT .....	64
3. Ergebnisse.....	66
3.1. Pilotstudie .....	66
3.1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der Pilotstudie .....	67
3.2. Hauptstudie.....	68
3.2.1. Körpergewichtsaufzeichnung .....	69
3.2.2. Klinische Ergebnisse der Hauptstudie .....	70
3.2.3. Röntgenologische Ergebnisse der Hauptstudie.....	73
3.2.4. Mikrobiologische Ergebnisse der Hauptstudie.....	75
3.2.5. Histologische Befunde.....	77
3.2.6. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie .....	81
3.2.7. Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	82
3.2.8. Ergebnisse des Micro-CT .....	84
3.2.9. Zusammenfassung der Ergebnisse der Hauptstudie.....	85
4. Diskussion.....	86
4.1. Zielsetzung.....	86
4.2. Vergleich mit publizierten Tiermodellen .....	87
4.3. Verwendetes Tiermodell .....	90
4.4. Korrelation der Untersuchungsergebnisse .....	92
4.5. Diskussion der FISH-Technik.....	94
5. Zusammenfassung .....	96
6. Summary.....	98
7. Literaturverzeichnis.....	99

8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....	112
8.1. Tabellenverzeichnis .....	112
8.2. Abbildungsverzeichnis .....	113
9. Publikation .....	115
10. Erklärung .....	116
11. Danksagung .....	117
12. Lebenslauf .....	XI

## **1. Einleitung**

### **1.1. Offene und geschlossene Frakturformen**

Jährlich treten in Deutschland über 800.000 Frakturen auf, die stationär behandelt werden müssen (Scheuringer et al., 2005).

Dabei wird zwischen geschlossenen und offenen Frakturen unterschieden. Die geschlossenen Frakturen werden von Tscherne in Abhängigkeit vom Weichteilschaden klassifiziert (Tscherne und Oestern, 1982).

In der Beurteilung der Schweregrade der offenen Frakturen hat sich die Klassifikation nach Gustilo und Anderson (Gustilo und Anderson, 1976; Gustilo et al., 1984) etabliert.

In beiden Klassifikationen wird neben dem Frakturtyp auch der Schweregrad des Weichteilschadens berücksichtigt. Beide Klassifikationen haben nicht nur für die Einteilungen der Frakturen eine wichtige Bedeutung, sondern weil sich daraus Vorgaben für die Behandlung der Frakturen und das therapeutische Vorgehen ableiten lassen.

#### **1.1.1. Die Klassifikation von offenen und geschlossenen Schienbeinfrakturen**

Tscherne klassifiziert die geschlossenen Frakturen wie folgt. Grad 0 bezeichnet in der Klassifikation der geschlossenen Frakturen die einfachste Frakturform. Häufig lässt sich hier keine, oder nur eine unbedeutende Weichteilverletzung diagnostizieren.

Bei geschlossenen Unterschenkelfrakturen 1. Grades findet sich neben der Fraktur oft eine oberflächliche Schürfungsverletzung der Haut. Ebenfalls kann es durch den Fragmentdruck des Knochens von innen zu einer fraktur nahen

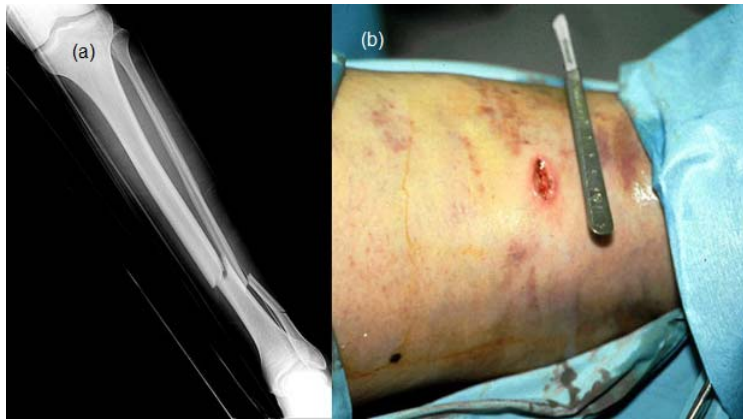
Weichteilkontusion kommen. Frakturen dieses Grades stellen eine einfache bis mittelschwere Frakturform dar.

Zweitgradige geschlossene Frakturen repräsentieren mittelschwere bis schwere Frakturformen. Sie werden meist durch direkte Traumata hervorgerufen und weisen ausgedehntere Weichteildefekte auf. Es kommt zu tiefen, kontaminierten Schürfwunden, sowie lokalisierte Haut- und Muskelkontusionen.

Die schwersten Bruchformen stellen die drittgradigen Frakturen dar. Da diese Frakturformen sehr häufig mit Trümmerfrakturen assoziiert sind, sind sie mit erheblichen Weichteilschadensdefekten vergesellschaftet. Es lassen sich flächenhafte Ablösungen der Haut, Zerstörung von Muskulatur oder sogar die Verletzung eines Hauptgefäßes durch Rotation bzw. Quetschung der traumatisierten Extremität diagnostizieren. Bei dieser schweren Frakturform besteht ein erhöhtes Risiko der Entwicklung eines manifesten Kompartmentsyndroms.

### **Die Klassifikation offener Schienbeinfrakturen nach Gustilo und Anderson**

Die gebräuchlichste Klassifikation offener Unterschenkelfrakturen geht auf Gustilo und Anderson zurück (Gustilo und Anderson, 1976; Gustilo et al., 1984), die je nach Schwere der Haut- und Weichteilverletzung insgesamt fünf verschiedene Typen unterscheiden und auf den Abbildungen 1-5 erläutert werden:



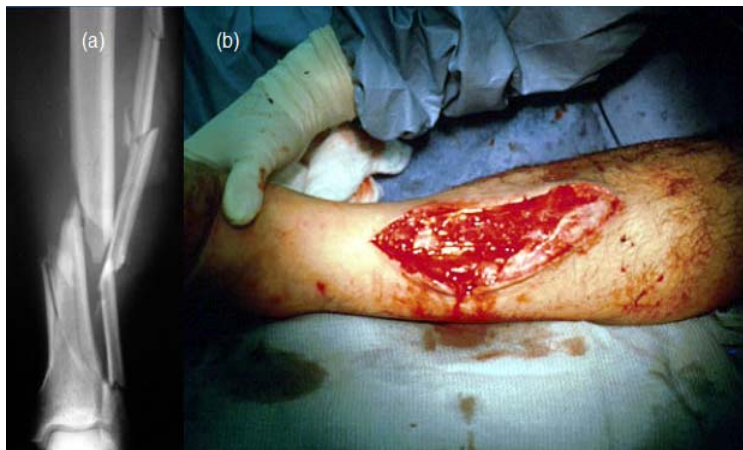
**Abbildung 1:**

Offene Unterschenkelfraktur vom Gustilo-Anderson-Typ I: Röntgenbild einer offenen Fraktur **(a)** mit einer Durchspießungswunde in der Haut von <1 cm Länge **(b)**.



**Abbildung 2:**

Offene Unterschenkelfraktur vom Gustilo-Anderson-Typ II: Offene Fraktur mit einer Durchspießungswunde länger als 1 cm ohne größeren Weichteilsubstanzverlust.



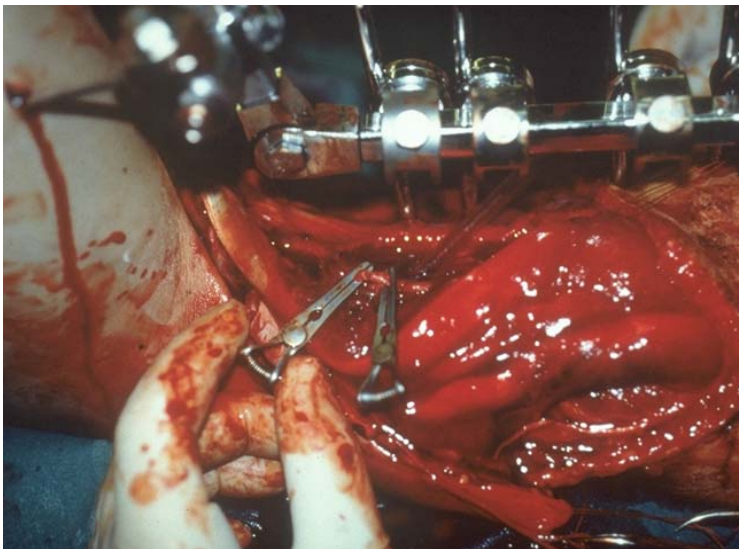
**Abbildung 3:**

Offene Unterschenkelfraktur vom Gustilo-Anderson-Typ IIIA: Röntgenbild einer offenen Fraktur **(a)** mit großem Weichteilsubstanzverlust mit verbliebener adäquater Weichteildeckung des Knochens **(b)**.



**Abbildung 4:**

Offene Unterschenkelfraktur vom Gustilo-Anderson-Typ IIIB: Verletzung mit großem Weichteilsubstanzverlust und fehlender Weichteildeckung des Knochens. Meistens mit Periost-Stripping und massiver Kontamination einhergehend.



**Abbildung 5:**

Offene Unterschenkelfraktur vom Gustilo-Anderson-Typ IIIC: Verletzung mit massivem Weichteilsubstanzverlust, Verletzung neuro-vaskulärer Strukturen und massiver Kontamination.

### 1.1.2. Häufigkeit und Verteilung offener Tibiafrakturen

Die offene Tibiafraktur ist die häufigste offene Fraktur. Die meisten Brüche entstehen durch eine Kombination von Biegung, Stauchung und Torsion. Aufgrund des dünnen Weichteilmantels über der medialen Tibiafläche und Tibiakante, sowie der oft direkten Krafteinwirkung sind offene Frakturen am Unterschenkel besonders häufig und komplikationsträchtig (Siewert, 1997).

Die Inzidenz offener Tibiafrakturen wird von der British Orthopaedic Association and British Association of Plastic Surgeons bei ungefähr 5,53 pro 100.000 Einwohner pro Jahr angegeben (British Orthopaedic Association and British Association of Plastic Surgeons, 1997), was für die Bundesrepublik Deutschland mit ca. 80 Mio. Einwohnern ca. 4.500 offene Schienbeinbrüche pro Jahr ergibt.

Die prozentuale Verteilung offener Schienbeinfrakturen nach ihrem Schweregrad stellt sich annäherungsweise gemäß folgender Tabelle dar (British Orthopaedic Association and British Association of Plastic Surgeons, 1997).

<b>Verteilung offener Schienbeinfrakturen in Deutschland ( n = 4557) pro Jahr</b>		
	<b>%</b>	<b>Anzahl an Frakturen in Deutschland pro Jahr</b>
Gustilo-Anderson-Typ I	24,1	1.098
Gustilo-Anderson-Typ II	21,7	989
Gustilo-Anderson-Typ IIIA	22,5	1.025
Gustilo-Anderson-Typ IIIB	27,9	1.272
Gustilo-Anderson Typ IIIC	3,8	173

**Tabelle 1:** Verteilung offener Schienbeinfrakturen in Deutschland pro Jahr.

Bei den offenen Tibiaschaftfrakturen mit Weichteilschaden muss immer von einer Kontamination der Wunde mit Bakterien ausgegangen werden. Die Bakterienkontamination erklärt sich durch den Kontakt der offenen Fraktur mit der Umwelt (z.B. Erde oder Wasser). Eine Besiedlung des Weichteildefektes mit hauteigenen Keimen ist ebenfalls möglich.

Bei den offenen Frakturen des Unterschenkels mit ausgedehnten Weichteildefekten ist die Inzidenz einer Infektion des Knochens mit einer Wahrscheinlichkeit von 15 bis 40 % deutlich erhöht (Ostermann et al., 1993; Tsukayama, 1999).

Melcher et al. (1995) zeigten auf, dass speziell offene Unterschenkelbrüche gehäuft mit Infektionen vergesellschaftet sind, da der dünne Weichteilmantel über dem Schienbein und die entsprechend verletzungsanfällige Gefäßversorgung in dieser Region die Besiedlung mit Erregern nach einem Trauma begünstigt.

### **1.1.3. Management von offenen Unterschenkelfrakturen**

Dem richtigen Management der offenen Fraktur kommt eine große Bedeutung zu, um das Risiko einer Weichteil- und Knocheninfektion zu reduzieren. Eine schonende, adäquate und zeitgerechte Versorgung des verletzten Knochens und der Weichteile ist hinsichtlich einer wirksamen Vorbeugung entscheidend (Fosberg et al., 2011; Krettek, 1998; Gustilo et al., 1990).

Neben der Sicherung und Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen, muss bereits am Unfallort eine Infektionsprophylaxe eingeleitet werden.

Der Unfallhergang ist zu eruieren – auch durch Fremdanamnese. Die äußeren Verletzungszeichen, sichere Frakturzeichen, periphere Durchblutung, Motorik und Sensibilität sind zu erfassen.

Die ersten Maßnahmen bei der Versorgung der offenen Fraktur beinhalten die Reposition, Abdecken des Weichteilschadens mit einem sterilen Verband und die äußere Schienung.

Durch diese erste Stabilisierung wird das Auftreten von Drucknekrosen und Durchblutungsstörungen reduziert. Wenn möglich, wird bereits am Unfallort ein Antibiotikum mit einem möglichst breiten Wirkungsspektrum intravenös verabreicht.

Mehrere Studien belegen, dass bei offenen Frakturen eine frühzeitige routinemäßige Antibiotikagabe manifeste posttraumatische Infektionen reduzieren kann.

Die Maßnahmen in der Notaufnahme des Krankenhauses konzentrieren sich an der verletzten Extremität auf die periphere Durchblutung, den Neurostatus und sollten die benachbarten Gelenkabschnitte mit einbeziehen. Die Röntgendiagnostik in 2 Ebenen umfasst den Frakturbereich einschließlich der angrenzenden Gelenke. Der am Unfallort angelegte sterile Verband bleibt in dieser Phase ungeöffnet, um eine weitere Kontamination der Wunde zu verhindern. Sollte eine Blutung bei offener Fraktur nicht nach kurzer Zeit sistieren, ist ein zusätzlicher Kompressionsverband zur Blutstillung anzulegen. Der Tetanus-Schutz muss überprüft und gegebenenfalls aufgefrischt werden.

Die offene Fraktur stellt immer eine Indikation zur Notfalloperation dar. Nach Narkoseeinleitung werden die angelegten Notverbände unter sterilen Bedingungen entfernt und die offene Fraktur dann beurteilt.

Grundsätzlich richtet sich die Behandlung offener Schienbeinfrakturen vor allem nach dem Schweregrad des Weichteilschadens und somit nach der Gustilo-Anderson-Klassifikation der Weichteilverletzung. Generell muss bei allen offenen Tibiafrakturen sowohl eine adäquate Versorgung der Weichteilverletzung als auch des frakturierten Knochens erfolgen.

Die an die Wunde angrenzende Haut wird mit steriler Ringer- bzw. Seifenlösung gesäubert und gegebenenfalls enthaart. Zur Reinigung werden aseptische Handwaschbürsten benutzt. Sobald die Spülung und Ausbürstung der umgebenden Haut beendet ist, werden unter Verwendung steriler Instrumente die Wunde und die Fragmentenden gespült, mechanisch gereinigt und desinfiziert. Für die Wundreinigung bietet sich ein hydromechanisches Hochdruckspülsystem (Jet-Lavage) an.

Ein ganz entscheidender Schritt im Management der offenen Frakturen gilt dem adäquaten Debridement der Haut und der geschädigten Weichteile. Die Wunde muss großzügig debridiert werden, wobei Nekrosen und minderdurchblutetes Gewebe abgetragen werden. Eingesprengte Fremdkörper und avitale Knochenfragmente sind zu entfernen. Lokale Antibiotikaträger, z.B. Gentamicin-getränkte Kollagenvliese oder Antibiotikaketten, können eingebracht werden (Ostermann et al., 1995).

Nach diesem Debridement der Haut und der Weichteile erfolgt die Stabilisierung der Fraktur durch Osteosyntheseverfahren. Die Art der Osteosynthese ist abhängig vom Ausmaß und Lokalisation des Weichteilschadens, Typ und Lokalisation der Fraktur sowie lokalen und allgemeinen Begleitverletzungen. Die Versorgung einer Gefäßverletzung hat dabei absoluten Vorrang.

Bei 1.° offenen Frakturen kann aufgrund der meist nur geringen bakteriellen Kontamination zumeist eine definitive Osteosynthese durch einen Marknagel erfolgen.

Bei 2.° und vor allem 3.° offenen Frakturen, die mit einer erheblichen Weichteilschädigung einhergehen ist eine initiale temporäre Versorgung mit einem Fixateur externe sinnvoll. Nach Verbesserung der Weichteilverhältnisse, was zumeist ca. 1 bis 2 Wochen dauert, kann dann ein Verfahrenswechsel des Fixateur externe zu einem intramedullären Verriegelungsnagel erfolgen.

Auch hier ist eine systemische Antibiotikaprophylaxe über 3 bis 5 Tage zur Verringerung des Infektrisikos sinnvoll (Breithaupt, 2004).

Trotz aller infektionsprophylaktischen Maßnahmen und stabiler Osteosynthese kann es zur posttraumatischen Weichteilinfektion kommen, die im weiteren Verlauf auf den Knochen übergreifen kann.

## **1.2. Osteitis**

### **1.2.1. Akute posttraumatische und postoperative Osteitis**

Als Folge kann sich eine akute Osteitis entwickeln. Man unterscheidet eine posttraumatische und eine postoperative Osteitis. Beide Formen der Osteitis spielen im klinischen Alltag in den Industrieländern eine wichtige Rolle und machen 80 % der Knocheninfektionen aus (Walter et al., 2012). Durch die Veränderung der Altersstruktur in der Bevölkerung und die wachsende Zahl chirurgisch-orthopädischer Implantate wird in den nächsten Jahren mit einem weiteren Anstieg gerechnet (Darouiche, 2004; Trampuz und Zimmerli, 2005). Die akute postoperative Osteitis stellt eine der am meisten gefürchteten Komplikationen nach einer operativen Frakturversorgung dar.

Bei der akuten posttraumatischen Osteitis kommt es innerhalb von 8 Wochen nach initialem Trauma durch die offene Wunde in das Gewebe gelangten Keimen zu einer Wundinfektion (Hofmann, 2004a). Sie gewinnt durch die Zunahme offener Frakturen als Unfallfolge (Holtom und Smith, 1999) an Bedeutung.

Als akute postoperative Osteitis bezeichnet man eine bakterielle Infektion der Weichgewebe, des Implantatlagers und der Fraktur innerhalb von acht Wochen nach Operation ohne zuvor bestehende offene Wunden durch die während der Operation in den Operationssitus inokulierten Bakterien. Die Inzidenz der akuten Osteitiden korreliert mit der Topographie der Verletzung, mit dem Verletzungstyp, insbesondere mit dem Ausmaß des Weichteilschadens, mit der Implantatart und der bei der primären Osteosynthese erreichten Stabilität sowie mit der erzielten Weichteildeckung über der Osteosynthese (Hofmann, 2004a).

Insgesamt kommt es bei 5 % der traumatologisch/orthopädischen Implantate im Laufe ihrer Standzeit zu Infektkomplikationen (Trampuz und Zimmerli, 2006).

Als weiterer Faktor ist die traumatische Schädigung von Haut und Unterhautfettgewebe, Muskulatur und Weichteilen des Knochens sowie die vorübergehend auftretende Minderdurchblutung zu nennen, die jeder operative Eingriff mit sich bringt (Lazzarini et al., 2004).

Die Häufigkeit der akuten postoperativen Osteitis beträgt für Elektiveingriffe 0,1 bis 0,7 %, für geschlossene Frakturen unterschiedlicher Schweregrade 1 bis 5 % (Bhandari et al., 2000; Smejtala et al., 1999). Andere Autoren geben für offene und geschlossene Frakturen in Abhängigkeit vom Schweregrad eine Häufigkeit der postoperativen bzw. posttraumatischen Osteitis von 2,7 bis 43 % an (Carsenti-Etesse et al., 1999).

Auch individuelle Risikofaktoren des Patienten spielen in der Manifestation einer Infektion eine Rolle (Schnettler und Alt, 2004; Zimmerli und Fluckiger, 2004). Beispielhaft seien Diabetes mellitus, Adipositas, sowie eine geschwächte Immunabwehr genannt.

Der häufigste Keim, der eine ossäre Infektion auslöst, ist *Staphylococcus aureus* (Adler, 1983; Hudson 1993). *Staphylococcus epidermidis*, verschiedene Anaerobier, *Pseudomonas aeruginosa* oder Mischinfektionen sind häufig bei Knocheninfektionen zu finden (Nair, 1996; Schwameis, 1996).

### 1.2.1.1. Pathophysiologie

Normalerweise weist Knochengewebe eine sehr gute Widerstandsfähigkeit gegenüber einer Infektion auf. Deshalb müssen neben einer Kontamination noch weitere Faktoren vorliegen, die die Entstehung einer Infektion begünstigen (Andriole et al., 1973; Klemm, 1979).

Emsli und Nade (1983) beschrieben die bei einem Trauma oder nach einer Operation auftretende lokale Ischämie und avitale Knochenfragmente als begünstigende Faktoren für die Vermehrung von Bakterien. Allein die Anwesenheit eines Implantates im Körper erhöht die lokale Infektanfälligkeit. Die natürliche Resistenz von Knochen gegenüber Infektionen wird durch Implantate um den Faktor 1.000 reduziert, wobei die Schwellendosis (Infektionsdosis, die eine Infektion des gesunden Knochens bewirkt) von  $10^8$  auf  $10^5$  Keime reduziert wird (Seybold und Schildhauer, 2010; Elek und Conen, 1957).

Southwood et al. (1995) und Gristina (1987) beschrieben eine höhere Infektrate bei Operationen, bei denen körperfremde Materialien verwendet wurden, im Vergleich zu Operationen, bei denen kein Fremdmaterial eingebracht wurde.

Sobald das Implantat in den Organismus eingebracht wird, entbrennt der „Kampf“ um die Besiedlung der Fremdkörperoberfläche, d.h., die Zellbildung und Gewebsintegration des Körpers konkurriert zeitgleich mit der bakteriellen Adhäsion. Dies wird mit dem englischen Ausdruck „race for surface“ treffend ausgedrückt (Gristina, 1990).

Die Bakterien haften besonders gut durch Adhäsion an Oberflächen wie Knochen und Osteosynthesematerial. Verantwortlich hierfür sind bakterielle Faktoren, Oberflächeneigenschaften der Implantate und Wirtsfaktoren. Durch ihre spezielle Oberflächenstruktur (Polysaccharidkapsel, fibrinähnliche Adhäsionskomponenten) schaffen es die Keime, sich an Knochen oder Implantaten festzusetzen. Es werden auch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Kräfte) zwischen Bakterien und Implantatoberfläche diskutiert. Fischer et al. (1996) konnten zeigen, dass

Fibronektin – ein extrazelluläres Glykoprotein - welches bei der Gewebsreparatur eine wichtige Rolle spielt, hinsichtlich der Adhäsion der Keime an Implantaten eine besondere Funktion zukommt. Das Metall bzw. die Metalloberfläche des Osteosynthesematerials stellt für die Bakterien eine gute Voraussetzung für das Anhaften und die anschließende Kolonisation des Implantates dar, aus der sich im weiteren Verlauf die Infektion etabliert. Diese Situation kann zur Entstehung eines bakteriellen Biofilms führen, die den Bakterien die Möglichkeit gibt sich dauerhaft am Fraktur-Implantat-Situs festzusetzen. Der Biofilm ist eine bakterielle produzierte Polysaccharid-Glycocalix-Matrix. Er beinhaltet auch strukturiert Ansammlungen von Bakterien (Mikrokolonien), die sich dadurch gezielt abschotten und so ideale Bedingungen für ihr eigenes Überleben schaffen. Auf diese Weise schaffen es die Erreger, sich der körpereigenen Immunabwehr und Antibiotikatherapie zu entziehen (Peters, 1982). Für die Proliferation der Erreger im Knochengewebe oder auf dem auf dem Knochen liegenden Implantat, stellt der Biofilm die entscheidende Grundlage dar. Durch lokale Ischämie und avitale Knochenfragmente nach Operation oder Trauma wird die Vermehrung der Bakterien entscheidend begünstigt (Norden und Kennedy, 1970; Emslie und Nade, 1983). Der Biofilm kann sowohl mono- also auch polymikrobiell sein und als potentieller Streuherd angesehen werden (Costerton et al., 1999; Berendet und McLardy-Smith, 1999; Donlan, 2002; O' Gara und Humphreys, 2001).

Im infizierten Knochen ist ein signifikanter Anstieg von Arachidonsäuremetaboliten nachweisbar. Die Prostaglandine können in hohen Konzentrationen zu einer deutlichen Senkung der Knochendurchblutung führen (Hofmann, 2004c). Infolge können Mikroembolien, Endotoxinfreisetzung der Bakterien und Granulationsgewebe auftreten (körpereigene Entzündungsvorgänge), die die Durchblutung weiter schwächt und Störungen der medullären und periostalen Blutversorgung mit Sequesterbildung auslösen (Khouri und Shaw, 1989).

Knochensequester dienen den Bakterien als ideale Nahrungsgrundlage für ihre weitere Vermehrung und Ausbreitung. Aufgrund der Avitalität der Sequester mit fehlender Durchblutung entziehen sich die Bakterien auf den Sequestern effektiv der Antibiotikatherapie und Immunabwehr (Notzli et al., 1989).

### **1.2.1.2. Klinische Zeichen der akuten Osteitis**

Wenn sich im Anschluss an das Trauma und operativer Frakturversorgung die postoperativen Entzündungszeichen nicht innerhalb weniger Tage zurückbilden, ist dies höchst verdächtig auf eine posttraumatische Infektion.

Die lokalen Infektzeichen sind Rötung, Schwellung, Sekretion, Überwärmung und Schmerz in Verbindung mit Bewegungseinschränkung. Liegen dieses Zeichen vor, ist die akute Osteitis sehr wahrscheinlich.

Wenn sich zudem eine länger als 5 Tage nach osteosynthetischer Versorgung bestehende Temperaturerhöhung, persistierende Schmerzen, reduzierter Allgemeinzustand, einhergehend mit fehlender klinischer Befundbesserung feststellen lassen, spricht dies ebenfalls für das Vorliegen einer akuten Knocheninfektion.

Für die Frühdiagnostik einer akuten Infektion sind regelmäßige Wundkontrollen notwendig, sie stellen die Grundlage für die klinische Diagnose der akuten Osteitis dar. Mittels Laborparameter lässt sich der Verdacht auf eine akute Osteitis erhärten.

Laborchemisch deutet der fehlende Rückgang oder der erneute Anstieg der Entzündungsparameter – Leukozytenzahl, BSG und C-reaktives Protein – auf eine Frühinfektion hin. Auch die Anlage von Blutkulturen im Falle des Auftretens von Fieber kann hilfreich sein (Schnettler, 2004).

### **1.2.1.3. Bildgebende Verfahren der akuten Osteitis**

Der Röntgenuntersuchung und der Sonographie kommt in der Frühdiagnose der Osteitis keine große Bedeutung zu. In der Frühphase der Infektion kommt es häufig vor, dass das Röntgenbild völlig unauffällig aussieht und nur unspezifische Veränderungen zu erkennen sind (Mader et al., 1997; Peters et al., 1993; Schultheis und Ecke, 1991; Wheat, 1985).

Im konventionellen Röntgenbild findet man als initiales Zeichen eine Obliteration der Fettlinien und eine Weichteilverdichtung als Hinweis auf das Ödem der paraossalen Weichteile (Krötz et al., 2004).

Radiologisch sind frühestens nach 2 – 3 Wochen charakteristische Zeichen des Knochenbaus, die für eine Osteitis typisch sind zu erkennen. Die im konventionellen Röntgenbild sichtbaren Zeichen wie Osteolysen, kortikale Destruktionen und periostale Reaktionen sind aber keinesfalls typisch und oftmals nicht von der physiologischen Kallusbildung zu unterscheiden (Hofmann, 2004a).

Die Röntgendiagnostik sollte daher später zur Verlaufskontrolle eingesetzt werden und spielt im Akutfalle keine große Rolle.

Die Sonographie kann zum Nachweis von Weichteilinfektionen und Gelenkergüssen, die im Rahmen einer Osteitis auftreten können, herangezogen werden, ist aber wegen der geringen Eindringtiefe zur Darstellung entzündlicher Vorgänge im Knochen nur bedingt aussagekräftig. Wenn sich periostale Flüssigkeitsstreifen im Ultraschall erkennen lassen, stützt dies die klinische Diagnose der ossären Infektion (Peters et al., 1993).

#### **1.2.1.4. Bakteriologischer Keimnachweis**

Allein durch die klinische Untersuchung ist ein akuter ossärer Infekt nicht sicher nachzuweisen. Die Methode, die die Diagnose der akuten Osteitis sichern kann, ist der bakteriologische Keimnachweis aus dem Fraktur-Implantat-Situs bzw. aus den Weichteilen (Abb. 6).

Um das Vorliegen einer Knocheninfektion zu beweisen, ist die Materialgewinnung im Rahmen eines Revisionseingriffes und der direkte Erregernachweis unumgänglich. Durch Abstriche und chirurgische Gewebsgewinnung aus dem Fraktur-Implantat-Situs mit anschließender bakteriologischer und histologischer Untersuchung kann die Diagnose der akuten Osteitis definitiv gestellt werden. Grundsätzlich sollten mehrere Abstrich- bzw. Gewebeproben gewonnen und auf aerobe und anaerobe Keime hin untersucht werden. Dabei ist es wichtig, dass Gewebeanteile und nicht nur Flüssigkeit am Abstrichtupfer in das Nährmedium gelangen, um die Wahrscheinlichkeit für einen Erregernachweis zu erhöhen (Heppert et al., 2002).

Es ist darauf zu achten, dass vor Abstrichentnahme der möglicherweise noch vom Voreingriff einliegende Antibiotikumträger entfernt wird und nicht mit in das Röhrchen gelangt, was zu einem falsch negativen bakteriellen Testergebnis führen könnte. Die Bearbeitung der entnommenen Proben für die mikrobiologische Untersuchung muss zügig erfolgen, wobei der Zeitraum zwischen Abstrichnahme und Verarbeitung der mikrobiologischen Proben nicht länger als 48 Stunden betragen sollte (Kirschner et al., 2004).

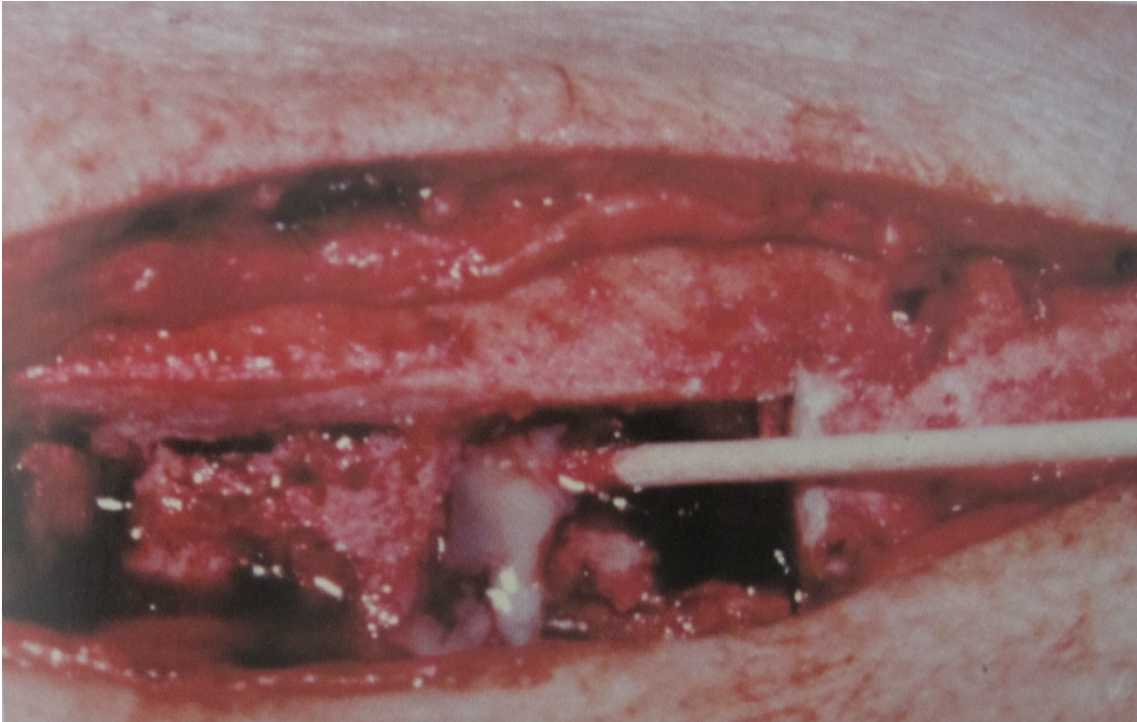
Von entscheidender Bedeutung ist auch die Zeitdauer zwischen der Materialentnahme und der bakteriologischen Untersuchung, weil empfindliche Keime eine zu lange Wartezeit bis zur Inkubation nicht überleben.

Lassen sich trotz hochgradigem Infektionsverdacht aus einem Situs wiederholt keine Keime isolieren, sollte auch an eine spezifische Infektion (z.B. Tuberkulose, Lues) gedacht werden (Hofmann, 2004a).

Zeigt ein Patient klinische Zeichen (hohes Fieber), die für einen akuten Osteitisschub sprechen, ist die Abnahme von Blutkulturen zur Isolation der Erreger sinnvoll.

Ein sehr wichtiges molekulares Typisierungsverfahren zur Identifizierung von Bakterienstämmen stellt die Methode der Pulsfeld-Gelelektrophorese dar (Tenover et al., 1997). Diese Methode wird in der Molekularbiologie zur Analyse und Typisierung von bakteriellen Genomen und Plasmiden bzw. zum Vergleich von Isolaten einer Bakterienspezies eingesetzt. Die PFGE ist eine Untersuchungstechnik bei der DNA-Fragmente, die von den Bakterien stammen, mittels spezifischer Enzyme geschnitten und nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Als Ergebnis erhält man ein DNA-Bandenmuster, welches durch die Restriktionsfragmente des Bakteriengenoms gebildet wird und für den jeweiligen Stamm typisch ist. Letztendlich werden diese Banden durch Färbung sichtbar gemacht, und der Keim kann anhand dieses „DNA-Fingerprints“ identifiziert werden. Das entstehende DNA-Bandenmuster ist für die jeweiligen Stämme charakteristisch, so dass nach Vergleich mit dem Referenzstamm der Keim mit Hilfe einer Software eindeutig identifiziert werden kann (Becker, 2004, van Belkum et al., 1998, Schwarzkopf et al., 1995).

Nach erfolgreichem bakteriologischen Keimnachweis kann eine gezielte Therapie eingeleitet werden.



**Abbildung 6:** Materialgewinnung mittels Watteträger (Abstrich und Gewebe) aus dem Fraktur-Implantat-Situs. Aus: Schnettler, 2004.

### 1.2.1.5. Therapie der akuten Osteitis

Ist die Diagnose der akuten postoperativen Osteitis klinisch und laborchemisch gesichert, ist die Indikation zur dringlichen Intervention gegeben.

Kommt es zur Ausbildung einer postoperativen bzw. posttraumatischen Infektion, so müssen zu deren Behandlung Sekundäreingriffe durchgeführt werden (Schnettler, 2004).

Innerhalb der ersten 2 Wochen nach Erstoperation lässt sich bei Frühintervention eine chronische Knochen-Weichteil-Infektion häufig verhindern (Schnettler, 2004).

Auch Hofmann et al. (1997) publizierten ein bestimmtes chirurgisches Revisionskonzept, welches auf Revisionseingriffen, die bei der akuten Osteitis durchgeführt werden müssen, basiert.

Bei der chirurgischen Therapie der akuten postoperativen Osteitis hat die Beherrschung der akuten Infektion Priorität. Die komplexe Problematik von akuten Osteitiden ist in der Regel nur schrittweise therapierbar, dient der knöchernen Konsolidierung sowie der Rekonstruktion des Weichteilmantels und damit dem Wiedergewinn einer grundsätzlich funktionsfähigen Extremität. Die Indikation zur frühzeitigen Revisionsoperation muss bei klinischen Zeichen einer Wundheilungsstörung mit beginnenden Infektionszeichen sowie bei postoperativer Hämatombildung kompromisslos gestellt werden. Nur dadurch besteht die Möglichkeit, die Osteosynthese zu erhalten und die Infektion wirksam zu bekämpfen. Speziell die Stabilität ist sowohl für die Frakturheilung als auch für die Infektsanierung von großer Wichtigkeit, da sie die Infektionsausbreitung verzögert (Klemm 1993; Klemm und Schnettler, 1992; Schnettler et al., 1997).

Der Erhalt der Osteosynthese ist anzustreben, ist jedoch nur dann möglich, wenn das Implantat noch fest im Knochen verankert und nicht bereits durch den Entzündungsprozess gelockert ist (Schnettler, 2004).

Der Revisionseingriff umfasst ein ausgiebiges Weichteildebridement, eine konsequente Nekrosektomie aller avitalen Strukturen und eine ausgiebige Spülung, welches in Abhängigkeit der Schwere der Infektion mehrmals wiederholt werden muss. Es folgt die Entnahme mehrerer Gewebeproben aus der Umgebung des Implantatlagers für die bakteriologische und histologische Untersuchung. Im Idealfall erreicht man durch diese Therapie einen infektfreien Erhalt der Osteosynthese.

Für die erfolgreiche Sanierung der akuten Osteitis ist der Zeitfaktor entscheidend: Innerhalb der ersten 8 Wochen nach primärer Osteosynthese gelangen Infektsanierung und Erhaltung der Osteosynthese in 40 % der Fälle. Verstreichen die ersten 8 Wochen nach einem Revisionseingriff, kann die Infektfreiheit – aufgrund der etablierten Biofilmbildung - nahezu in keinem Fall mehr erreicht werden (Hofmann et al., 1997).

## **1.2.2. Chronifizierung der Osteitis**

Wird die akute Osteitis nicht oder nur unzureichend behandelt, entwickelt sich als Spätzustand die chronische Form der Osteitis. Dieser Übergang findet in 10-30% der Fälle statt und droht insbesondere dann, wenn eine akute Osteitis nicht innerhalb der ersten acht Wochen nach Trauma und Primärversorgung zur Ausheilung gebracht werden kann (Hofmann, 2004a). Daher kommt der frühestmöglichen Diagnose und der konsequenten Behandlung einer akuten postoperativen Osteitis immense Bedeutung zu. Denn nur wenn der Infekt vollständig beseitigt wird, kann die chronische Verlaufsform verhindert werden. Dieser Übergang in die chronische Form der Osteitis stellt den Einstieg in einen langwierigen und komplizierten Krankheitsverlauf dar.

### **1.2.2.1. Pathophysiologie der chronischen Osteitis**

Infizierte Knochennekrosen und die Fistelbildung kennzeichnen das Krankheitsbild der chronischen Osteitis (Schnettler und Alt, 2004; Mader et al., 1997; Cierny et al., 1985).

Die Knochennekrosen schaffen den Bakterien eine hervorragende Ausgangsposition, sich fortwährend im Knochen- und Weichteilgewebe festzusetzen und sich zu vermehren. Dies ist das Hauptcharakteristikum der chronisch ossären Infektion, denn die dauerhafte Anwesenheit von entzündlichen Infiltraten verhindert den Heilungsprozess und zerstört immer mehr Knochensubstanz. Es bildet sich mit Eiter durchsetztes nekrotisches Material, das sich den Weg durch das Weichteilgewebe durch eine Fistel verschafft. In diesem Milieu kommt es zu einer Akkumulation der infektauslösenden Keime. Dieser Zustand stellt ein ideales Potential zur Erhaltung des chronisch-entzündlichen Geschehens dar.

Ganz entscheidend für die Entwicklung der chronischen Osteitis ist die Beteiligung der Gefäße: Im Rahmen des etablierten Entzündungsprozesses kommt es zu Gefäßveränderungen und einem daraus resultierenden Sauerstoffmangel. Die lokal beeinträchtigte Mikrozirkulation kann dann ggf. in Synergie mit einer systemisch reduzierten Sauerstoffverfügbarkeit schnell dazu führen, dass ein kritischer Sauerstoffmangelzustand im Gewebe erreicht wird. Der pH-Wert sinkt, der Laktatspiegel steigt, in der Folge sind die physiologischen Reparaturprozesse (Angiogenese, Kollagenproliferation) gestört. Resvaskularisation und Resorption avitaler Knochenbezirke, wie sie physiologischerweise ablaufen sollten, finden nicht mehr statt. Pathophysiologisch werden diese Areale dann durch Granulozyten und Makrophagen aus ihrem Gewebekontext herausgetrennt und bilden Sequester (Hofmann, 2004c).

Die zunehmende Verschlechterung der Gefäßversorgung bzw. der komplette Ausfall von Vaskularisation und Perfusion hat zur Folge, dass weitere Knochensubstanz zugrunde geht und sich weitere Knochensequester aus dem vitalen Knochenbund herauslösen. Diese bilden dann den Nährboden für die weitere Proliferation von Bakterienkolonien.

Auch die Virulenz der Erreger ist ein wichtiger Grund für die Manifestation einer chronischen Osteitis. Der Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ist durch Biofilmbildung und Besiedlung von Knochensequestern in der Lage, sich hartnäckig einer Antibiotikatherapie zu entziehen (Nair et al., 1996).

Die Erreger wechseln von einer planktonischen Phase mit hoher Stoffwechselrate und rascher Vermehrung in eine sessile Form mit stark reduziertem Metabolismus und verlangsamten biologischen Reaktionen. Dadurch kann sich ihre Empfindlichkeit auf Antibiotika um den Faktor  $10^3$  reduzieren (Costerton, 2005).

Dies erklärt, warum eine systemische Antibiose spätestens zu diesem Zeitpunkt keine Wirksamkeit mehr entfaltet. Der Zusammenbruch der lokalen Gewebsperfusion lässt hier keine ausreichend hohen lokalen Wirkspiegel mehr

entstehen. Zudem können immunkompetente Zellen gegen die eingedrungenen Erreger nicht wirksam werden, da sie den Ort des Geschehens wegen fehlender Perfusion nicht erreichen.

Die Immunabwehr schafft es nicht, die Ausbreitung der Keime effektiv zu verhindern. Die Folge ist ein dauerhaftes, kaum einzudämmendes, diffuses Entzündungsgeschehen, welches zur fortschreitenden Destruktion des Knochens mit einem Nebeneinander von destruierenden und reparativen Veränderungen führt.

Dieser Vorgang wird auch durch Bakterien, die über deren Endotoxine, Lipopolysaccharide, sowie N-Acetyl-Muramin-Dipeptide diesen Vorgang unterhalten, moduliert (Nair et al., 1996; Dewhirst 1982; Ishimi et al., 1990).

Der Organismus versucht durch phagozytosefähige Abwehrzellen wie Monozyten und Makrophagen die eingedrungenen Keime und avitalen Knochen- und Gewebsstrukturen abzuräumen. Allerdings wird durch die gebildeten toxischen Radikale und proteolytischen Enzyme das umliegende Gewebe ebenfalls angegriffen und dadurch zusätzlich Knochenstrukturen zerstört (Lew und Waldvogel, 1997). In diesem Zusammenhang spielen auch körpereigene Immunmediatoren IL-1, IL-6 und TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) eine Rolle (Stashenko et al., 1987). Diese Zytokine wirken stark osteolytisch und zerstören Knochensubstanz (Klosterhalfen et al., 1996).

Prostaglandin E-2, ein körpereigenes Molekül, das nach Frakturen verstärkt ausgeschüttet wird, wirkt als Osteoklasten-Aktivator und erhält ebenfalls die knochenabbauenden Prozesse (Lew und Waldvogel, 1997). Der Mechanismus wie *Staphylococcus aureus* die Knochendestruktion bewirkt, ist nicht im letzten Detail bekannt. Nair et al. (1996) diskutieren drei mögliche Varianten:

- Zerstörung von Knochensubstanz durch Exprimierung verschiedener Proteasen und Säuren
- Anstoßen der zellulären Zytokinproduktion.
- Hemmung der Knochenmatrixbildung durch Osteoblastenzerstörung und osteolytisch wirksamer Metabolite experimentell nachgewiesen werden

Es ist erwiesen, dass dieses Bakterium nach Aufnahme in Osteoblasten überleben kann (Lew und Waldvogel, 1997) und in der Zelle Apoptosevorgänge induzieren kann (Tucker et al., 2000). Man nimmt an, dass dieser Überlebensmechanismus zum einen entscheidend zur Chronifizierung der stattgefundenen Infektion beiträgt, zum anderen, dass es bei der chronischen Osteitis sehr häufig zu Rezidiven kommt.

### **1.2.2.2. Klinische Zeichen der chronischen Osteitis**

Die Diagnose der chronischen Osteitis wird, wie die der akuten Osteitis, klinisch gestellt. Kann eine akute Osteitis nicht saniert bzw. ausgeheilt werden, führt sie über ein subakutes Stadium zu einer chronischen Osteitis (Bohndorf und Imhof 2006).

Auch nach mehreren Jahren kann es immer wieder zu einem Aufflackern einer bereits „geheilt“ geglaubten Osteitis mit periodischen Infektexazerbationen und einem konsumierendem Krankheitsverlauf kommen. Deshalb ist ein genauer Überblick über die bisherige komplette, oftmals jahrelang andauernde, Krankheitsgeschichte unbedingt erforderlich (Walter et. al., 2012; Schnettler, 2004).

Erste Hinweise auf eine Chronifizierung der Infektion sind eine über 8 Wochen hinausgehende verzögerte oder ausbleibende Wundheilung über der betroffenen Knochenregion. Es sind ulzeröse Weichteildefekte, die sehr oft mit einer Fisteleiterung, durchblutungsgestörten, vernarbten und zum Teil pigmentierten Haut vergesellschaftet sind (Hofmann, 2004b).

Eine Fistelbildung, sezierend oder trocken, spricht für die Diagnose einer chronischen Osteitis. Sie ist das Leitsymptom der chronischen Osteitis und nimmt ihren Ausgang von Sequestern, die durch Abkapselung im Narbengewebe isoliert werden und als Keimreservoir für Rezidive dienen (Schnettler und Alt, 2004).

Im Gegensatz zur akuten postoperativen Osteitis fehlen bei der chronischen Form meist allgemeine Entzündungszeichen wie Rötung, Schwellung, Übelkeit, Überwärmung und Fieber. Diese treten nur im akuten Schub auf (Diefenbeck und Hofmann, 2003).

Nachts können subfebrile Temperaturen auftreten. Die chronische Osteitis führt zu einem schleichenden Verfall der körperlichen Leistungsfähigkeit, die über Gewichtsverlust, Muskelatrophie bis hin zur Kachexie führen kann.

Das klinische Bild ist zusätzlich von einem rezidivierend auftretendem, dumpfen Schmerz in der betroffenen Extremität geprägt.

Laborparameter wie das Blutbild, BSG und das C-reaktive Protein (CRP) helfen hier nur bedingt weiter. Im chronischen Stadium können sämtliche Laborwerte unauffällig sein, einzig das CRP erweist sich als sensibler Verlaufparameter mit dem man die Aktivität des Entzündungsprozesses nachweisen kann.

### 1.2.2.3. Bildgebende Verfahren bei der chronischen Osteitis

Durch Röntgenaufnahmen können reaktivierte Entzündungsprozesse nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden.

Im fortgeschrittenen Stadium der chronischen Osteitis spiegelt das Röntgenbild das Nebeneinander von An- und Abbauvorgängen am Knochen wider. Typisch sind Aufhellungs- und Verdichtungszone im Wechsel mit einer völlig unregelmäßigen Struktur des Knochens (Schmidt et al., 2011; Hofmann, 2004b).

Radiologische Zeichen der chronischen Osteitis sind (Bohndorf und Imhof, 2006):

- Periostreaktion
- Sequesterbildung (irreguläre, umschriebene Zonen starker Verdichtung, „Totenlade“)
- Aufhellungsräume um Implantate als Zeichen der Lockerung der Osteosynthese
- Inaktivitätsosteoporose
- Ossäre Destruktionen als Ausdruck des nekrotisierenden Entzündungsprozesses

Des Weiteren lassen sich typische Zeichen wie eine das Defektareal umgebende Inaktivitätsosteoporose und ausgedehnte ossäre Destruktionen als Ausdruck der nekrotisierenden Entzündung feststellen. Gelockertes Osteosynthesematerial ist ein weiteres Indiz für eine chronische Osteitis (Diefenbeck und Hofmann 2003).

Die radiologischen Zeichen sind in ihrer Ausprägung abhängig von der Aggressivität der Entzündung, der Virulenz des Erregers und der Abwehrlage des Patienten (Bohndorf und Imhof, 2006; Gold et al., 1991).

Die Röntgendiagnostik erlaubt jedoch keine zuverlässige Aussage über den aktuellen Aktivitätsgrad, der Lokalisation und Ausdehnung der chronischen Knochenentzündung (Hofmann, 2004b).

#### **1.2.2.4. Histomorphologie der chronischen Osteitis**

Das histologische Bild der chronischen Osteitis zeigt die typischen morphologischen Kriterien eines fortwährenden infektiösen Prozesses am Knochen. Diese charakteristischen Merkmale sind auf den Abbildungen 7-9 dargestellt.

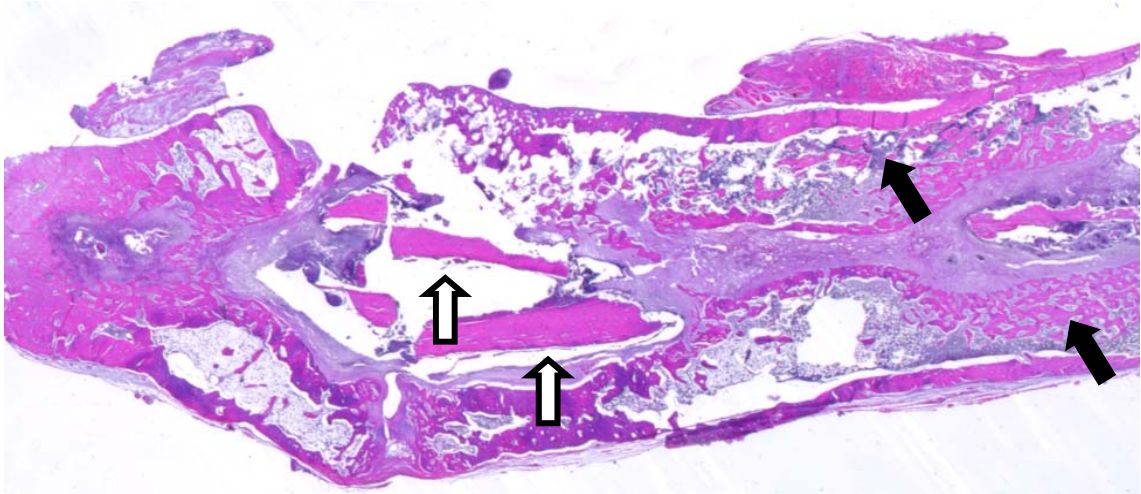
Ein wichtiges Merkmal sind abgekapselte, infizierte Nekroseherde mit Knochensubstanzdefekten (Osteolysen), die sich in fast allen Knochensegmenten als leere Knochenhöhlen ohne Osteozyten zeigen. Man bezeichnet diese Knochenhöhlen auch als „Lacunae“.

Im Zuge des Entzündungsprozesses lassen sich osteitische Destruktionsherde, einhergehend mit starkem Knochenumbau und einer zunehmenden Fibrosierung des Markraumes erkennen (Wünsch und Woltmann, 1991).

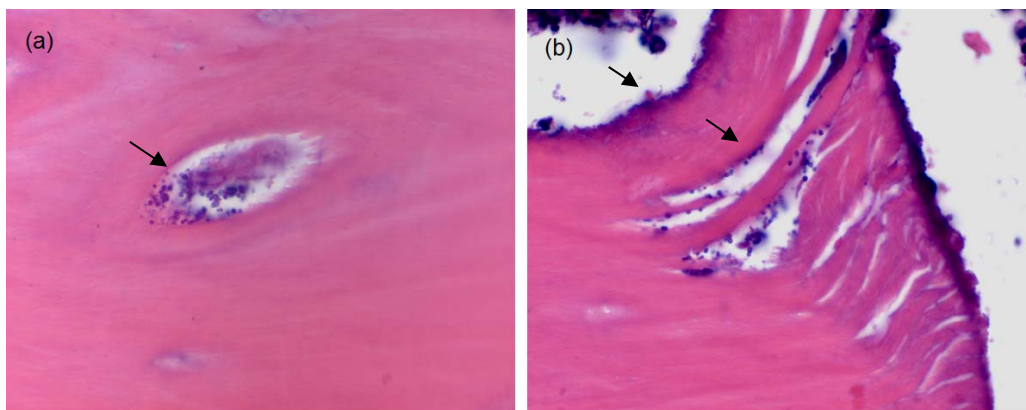
Des Weiteren lässt sich sklerosierter, geflechtartig strukturierter Knochen nachweisen, der die Abgrenzung zum noch nicht von entzündlichen Veränderungen betroffenen Knochengewebe bildet (Böhm 1986; Seligson und Klemm, 1999).

Es zeigt sich zudem eine intramedulläre Abszessbildung mit Ödemen, die zur Spongiosierung corticaler Knochenstrukturen und letztlich zur Abhebung des Periosts mit nachfolgender Fisteleiterung führt (Böhm und Könn 1976). Des Weiteren gelingt der Nachweis von Bakterien und deren Biofilmaktivität.

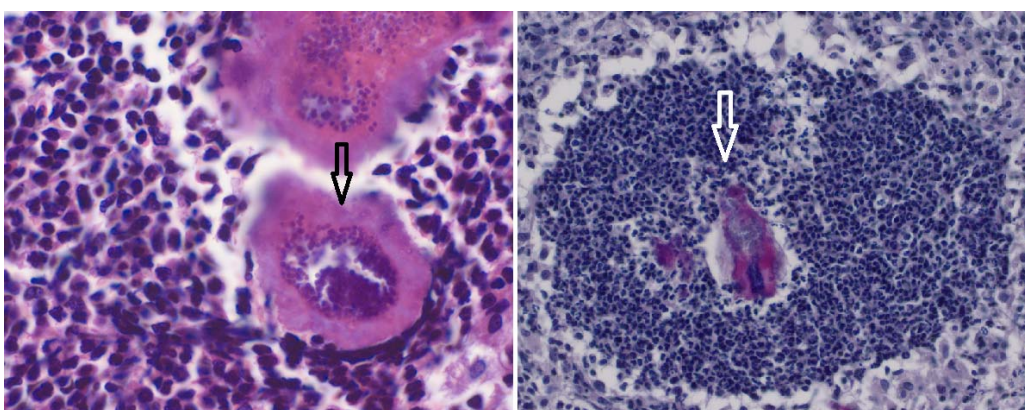
Diese Keimansammlungen liegen meist in Haufen und sind sehr stark mit der Ausbildung von Knochensequestern assoziiert. Diese avitalen Knochenfragmente liegen meist im Narbengewebe und sind umgeben von immunkompetenten Zellen: Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und vielkernige Riesenzellen.



**Abbildung 7:** Histologisches Schnittbild einer chronischen Osteitis mit kortikaler Osteolyse (**dunkle Pfeile**), zell- und gefäßreichem Granulationsgewebe, Knochensequesterbildung (**helle Pfeile**) und Anzeichen von Knochenumbau.



**Abbildung 8:** Histologische Detailaufnahmen zeigen Knochensequester, die sowohl im Knochen **(a)** als auch an der äußeren **(b)** Oberfläche mit Pünktchen besiedelt sind, die auf eine Bakterienkontamination hindeuten.



**Abbildung 9:** Zwei eingekapselte Ansammlungen von kokkenartigen Bakterienansammlungen, die von Biofilmstrukturen umgeben sind (**Pfeil dunkel**). Ansammlung immunkompetenter Zellen, die im Zentrum eine Biofilm-Matrix (**Pfeil hell**) umschließen. (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie Justus-Liebig-Universität Gießen)

### **1.2.2.5. Bakteriologischer Keimnachweis**

Auch bei der chronischen Osteitis ist der Keimnachweis der Mittel der Wahl um die klinische Verdachtsdiagnose zu beweisen. Der Nachweis pathogener Keime gelingt oftmals schon im Fistelsekret, wobei dieses diagnostische Ergebnis sehr wenig weiterhilft. Fistelgänge beherbergen häufig Mischpopulationen, während der eigentliche Osteitisherd in der Tiefe von einer bakteriellen Monokultur beherrscht wird. Deshalb sollte aus unterschiedlicher Tiefe einer Fistel, des Fistelsystems und des Herdes bei jeder operativen Gelegenheit jeweils bakteriologische Proben gewonnen werden. Nicht ungewöhnlich ist es, dass im Verlauf einer chronischen Osteitis ein Wechsel im Keimspektrum stattfindet. Einige primäre Kontaminationskeime verschwinden, andere beginnen zu überwuchern und es findet eine Selektion bestimmter prädestinierter Keime statt (Hofmann, 2004b).

*Staphylococcus aureus* und Koagulase-negative Staphylokokken finden sich in etwa 75 % als Ursache einer chronischen Osteitis (O'May et al., 2011; Lipsky und Berendt, 2010; Lew und Waldvogel, 2004).

Zudem sollte man intraoperativ unbedingt Probeentnahmen aus der Fistel zur histologischen Aufarbeitung zum Ausschluss eines Fistelkarzinoms planen und durchführen (Schnettler, 2004).

### **1.2.2.6. Therapie der chronischen Osteitis**

Zunächst muss bei chronischen Infekten zumeist auch die einliegende Osteosynthese zur Ausheilung der Infektion zunächst entfernt werden und die Tibia entweder mit einem Fixateur externe oder mit einem Gips stabilisiert werden. Erst nach Ausheilung des Infektes können Eingriffe zur Ausheilung der Fraktur in Erwägung gezogen werden (Schnettler, 2004).

In der Therapie der chronischen Osteitis hat sich heute ein Phasenkonzept bewährt (Schnettler, 2004):

## Primär: Infektsanierung

### **1. Am Knochen**

- Metallentfernung
- Radikales Debridement und Sequestrotomie
- Abstrichnahme, ggf. Gewebeprobe
- Stabile Reosteosynthese
- Keimreduktion durch gepulste Jet-Lavage
- Lokale Antibiosen (Gentamicin-PMMA-Kette, Septopal)
- Evtl. Spül-Saug-Drainage

### **2. Am Weichgewebe**

- Radikales Debridement
- Temporärer Hautverschluss, ggf. als Vakuumversiegelung
- Serielle Revisionseingriffe

## Sekundär: Rekonstruktion

### **1. Am Knochen (nach 4-6 Wochen)**

- Revision
- Entfernung der Lokalantibiose (Septopal)
- Intraoperative Spülung, ggf. Jet-Lavage
- Abstrichnahme ggf. Gewebeprobe
- Autogene/Allogene Spongiosaplastik
- Freier Beckenkammspan
- Resorbierbare Knochenersatzmaterialien, ggf. vermischt mit Antibiotika
- Resorbierbare Knochenmatrix mit Antibiotika

## **2. Am Weichgewebe:**

Frühestmöglicher definitiver Wundverschluss durch

- Spalthauttransplantation
- Lokale Lappenplastiken
- Freie mikrovaskulär angeschlossene Lappentransplantate (z.B. Latissimus-dorsi-Lappen, Paraskapularlappen)

### **1.2.3. Infizierte Pseudarthrose**

Eine spezielle Form der chronischen Osteitis stellt die infizierte Pseudarthrose dar.

Trotz unbestreitbarer Fortschritte im Zusammenhang mit der operativen Behandlung offener Frakturen lassen sich leider postoperativ auftretende Infekte und knöcherne Heilungsstörungen nicht gänzlich vermeiden (Kinzl und Suger, 1996).

Liegt eine Knocheninfektion vor, so erhöht sich das Risiko für die Ausbildung einer verzögerten Knochenbruchheilung (Goulet und Bray, 1989; Heppenstall et al., 1984).

Führt eine infektbedingte Knochenresorption, die zur Montageinsuffizienz einer Osteosynthese führt, wird jegliche knöcherne Konsolidierung der Frakturzone unterbleiben, da Infekt und Instabilität sich gegenseitig begünstigen (Kinzl und Suger, 1996).

Die Folge ist, dass die bereits stattgefundenene Infektion fortwährend persistiert und sich dauerhaft im Bereich der Fraktur manifestiert und erheblichen Einfluss auf die Knochenneubildung nimmt. In dieser Situation kommt es nicht nur zu einer bakteriellen Besiedlung des Implantates mit begleitenden Infektionen des Weichteil- und Knochengewebes, sondern auch zu einer dauerhaften

Festsetzung der Bakterien in den Knochen- und Weichteilstrukturen. Dies hat eine schwerwiegende Störung der Knochenbruchheilung zur Folge und führt zu einer infizierten Pseudarthrose. Es handelt sich hierbei um eine Falschgelenkausbildung, die durch die persistierende Entzündung und durch Ausbleiben der knöchernen Heilung hervorgerufen wird.

Die infizierte Pseudarthrose - als Sonderform der chronischen Osteitis - ist die Kombination von zwei schwerwiegenden, lokalen, sich gegenseitig potenzierenden – Komplikationen - Instabilität und Infektion (Schnettler und Alt, 2004).

Die infizierte Pseudarthrose tritt bei einer chronischen Infektsituation, die auf dem Boden einer infizierten Frakturregion entsteht. Hiervon zu unterscheiden sind die aseptischen Pseudarthrosen, die eine Knochenbruchheilungsstörung ohne bakterielle Infektion repräsentieren.

Weit über die Hälfte der infizierten Pseudarthrosen sind an der wenig Weichteilgedeckten Tibia lokalisiert und charakterisiert durch ausgedehnte knöcherne Defekte (Kinzl und Suger, 1996).

### **1.2.3.1. Pathophysiologie der infizierten Pseudarthrose**

Pseudarthrosen lassen sich immer auf mechanische oder biologische Ursachen zurückführen.

Mechanische Ursache ist der fehlende Fragmentkontakt, verursacht durch Knochendefekte, Muskelinterponate, Frakturdistraction, aber auch eine Instabilität, die deren Dehnungsbelastung im Bruchspalt die regeneratorsche Potenz des fixierenden Kallusgewebes übersteigt.

Biologische Ursachen sind kortikale Durchblutungsstörungen, die entweder durch das Trauma selbst, durch Behandlungsmaßnahmen, oder durch Infektionen entstehen. Gerade die Infektion führt zur Ausdehnung der Knochennekrose, da bakterielle Embolien und Endotoxine die Durchblutung stören und die Nekrosezone (biologische Defekte) vergrößern (Ekkernkamp et al., 1996).

Diese biochemischen Mechanismen sind der Grund für die septische Lockerung des Osteosynthesematerials und für die ausbleibende knöcherne Überbrückung des Frakturspaltes (Ciampolini und Harding, 2000).

Selbst wenn radiologisch der knöcherne Kontakt vorhanden nachweisbar ist, verhindert die fehlende Fragmentvitalität die Heilung.

Zudem entsteht durch die lokale Instabilität der Fragmentenden in Anwesenheit der Infektion ein Granulationsgewebe, das keinerlei osteogenetische Potenz besitzt. Damit stellt die Kombination von Instabilität und Infektion und biologischem Defekt die komplizierteste Form der Knochenbruchheilungsstörung dar (Ekkernkamp et al., 1996).

### **1.2.3.2. Klinische Zeichen der infizierten Pseudarthrose**

Im Rahmen der klinischen Untersuchung finden sich typischerweise bewegungs- und belastungsabhängige Schmerzen mit Schwellung im Frakturbereich. Es ist prinzipiell auch möglich, dass Patienten völlig symptomfrei sind. Es muss auf mögliche Achsen- und Rotationsfehler geachtet werden. Die an die infizierte Pseudarthrose angrenzenden Gelenke sind ebenfalls sorgfältig zu untersuchen, da Bewegungseinschränkungen oder Einsteifungen sekundär durch eine infizierte Pseudarthrose verursacht werden können. Im Hinblick auf die Therapie müssen die Weichteile sorgfältig inspiziert werden. Bei Infektpseudarthrosen ist darauf zu achten, ob septische Allgemeinzeichen oder eine Fistelung vorliegt. Die Weichteildeckung, die Durchblutung und Sensibilität ist ebenfalls zu erfassen.

### **1.2.3.3. Bildgebende Verfahren bei der infizierten Pseudarthrose**

Das radiographische Erscheinungsbild ist abhängig von der Aktivität des entzündlichen Prozesses. Ältere Infektionsherde ohne Aktivität zeigen eine unregelmäßige Begrenzung, eine Verdickung des kortikalen Knochens, harmonische Periostverdickungen und eine vermehrte Sklerose des kallösen Knochens (Krötz et al., 2004)

Aktive infizierte Pseudarthrosen zeigen eine Weichteilschwellung, Destruktion des Kortex und des kallösen Knochens sowie periostale Reaktionen (Bohdorf und Imhof, 2006).

Radiologisch können bei Pseudarthrosen 3 Stadien unterschieden werden. Das Resorptionsstadium mit erweitertem Frakturspalt und fehlender knöcherner Durchbauung (I), die Ausbildung von Knochenresorptionszonen und Zysten (II) und die fortschreitende Sklerosierung der Fragmentenden bei Nichtfusion (III).

In einzelnen Fällen kann die Diagnostik durch eine Dreiphasenzintigraphie, Leukozytenszintigraphie, CT oder MRT ergänzt werden (Krötz et al., 2004).

#### **1.2.3.4. Bakteriologischer Keimnachweis**

Da die infizierte Pseudarthrose eine spezielle Ausprägungsform der chronischen Osteitis darstellt, ist auch hier der Keimnachweis mit nachfolgender bakteriologischer Untersuchung beweisend.

Im Rahmen operativer Revisionseingriffe werden mehrere Gewebeproben entnommen, deren Bearbeitung zügig erfolgen sollte. Um eine Verfälschung zu vermeiden, werden die Proben idealerweise direkt und umgehend ins mikrobiologische Labor gebracht und dort sofort verarbeitet. Bis zur Bearbeitung ist eine Lagerung der Proben bei Raumtemperatur möglich, wobei der Zeitraum zwischen Probeentnahme und Verarbeitung der mikrobiologischen Proben nicht länger als 48 Stunden betragen sollte.

### **1.2.3.5. Therapie der infizierten Pseudarthrose**

Im Vergleich zur aseptischen Pseudarthrose ist die Behandlung einer infizierten Pseudarthrose wesentlich schwieriger.

Die infizierte Pseudarthrose erfordert eine sehr aufwendige Behandlung zur Sanierung des Infektes und zur Herbeiführung einer erfolgreichen Knochenheilung. Das Therapieprinzip bei Infektpseudarthrosen sieht zunächst die Sanierung des Infektes (ähnlich den Prinzipien der Tumorchirurgie an Knochen und Weichteilen) sowie eine Stabilisierung der Defektzone und dann die Rekonstruktion der Weichteile und des Knochens vor. Die Deckung des Defektes mit gut durchbluteten Weichteilen schafft die Voraussetzung für eine rasche Einheilung transplantierten Knochengewebes (Ekkernkamp et al., 1996).

Sehr wichtig ist die Schaffung einer stabilen Situation und das operative Anfrischen der Fraktarenden, um den Heilungsverlauf zu induzieren. Oft sind dafür mehrere chirurgische Revisionseingriffe erforderlich, die einen langwierigen Behandlungsverlauf über Monate nach sich ziehen.

Außerdem sollen etwaige Fehlstellungen und Längenunterschiede, Bewegungseinschränkungen nahegelegener Gelenke und Weichteildefekte behandelt werden.

In den letzten Jahren wurde diese Problematik durch das Auftreten multiresistenter Bakterien zusätzlich verschärft, da durch die Antibiotikaresistenz der Einsatz wirksamer Antibiotika zur lokalen und systemischen Therapie erheblich eingeschränkt wird.

Neben den operativen Behandlungsmöglichkeiten haben sich in den letzten Jahren auch alternative Therapieansätze entwickelt.

Schoellner et al. (2002) und Rompe et al. (1997) zeigten in einer Studie, dass man mit der Technik der extrakorporellen Stoßwellentherapie (ESWL) positive Ergebnisse bzgl. der Behandlung von Infektpseudarthrosen erreichen kann.

Des Weiteren haben sich auch der Einsatz von Bone Morphogenetic Protein-7 (Friedlaender et al., 2001) und Bone Morphogenetic Protein-2 (Govender et al., 2002), aber auch von Ultraschall (Heckman et al., 1994) oder Elektrotherapie (Brighton und Pollack, 1984) als nützlich erwiesen.

### **1.3. Zusammenhang zwischen Schweregrad der Fraktur und infizierter Pseudarthrose**

Eine chronische Osteitis ist oft das Endresultat eines komplizierten Behandlungsverlaufes nach Frakturen an langen Röhrenknochen. In der Bundesrepublik Deutschland rechnet man mit einem jährlichen Auftreten von etwa 1.500 Fällen an chronischer Osteitis. Die stationären und ambulanten Behandlungskosten, die Kosten des Arbeitsausfalls, der Rehabilitation und Berentung werden für jeden Fall auf etwa 700.000€ geschätzt. Der sich dadurch ergebende volkswirtschaftliche Schaden liegt in Milliardenhöhe. (Hofmann, 2004b).

Auch Court-Brown, Lortat-Jacob und Malik (2004, 1986, 2004) zeigten in einer Untersuchung auf, dass speziell implantat-assoziierte Knocheninfektionen oftmals zu chronischer Osteitis, in Form von infizierten Pseudarthrosen führen und hohe sozio-ökonomische Auswirkungen nach sich ziehen.

Typische Komplikationen nach offenen Unterschenkelfrakturen sind eine verzögerte Knochenbruchheilung, die in eine Pseudarthrosenbildung münden kann und das Entstehen von Wund- und Knocheninfektionen (Bonatus et al., 1997; Edwards et al., 1988; Malik et al., 2004; Riemer et al., 1995).

Generell ist die Komplikationsrate bei offenen Schienbeinfrakturen sehr eng mit dem Ausmaß der Weichteilschädigung assoziiert. Die Häufigkeit der Pseudarthroseausbildung nach Fraktur wird je nach Frakturform und Weichteilschaden mit 4-69% angegeben (Court-Brown, 2004; Friedlaender, 2004, Littenberg et al., 1998).

Komplexe offene Unterschenkelfrakturen mit einhergehendem Weichteilschaden zeigen sich in ihrer Behandlung bezüglich Knochenheilung problematisch. Hinsichtlich des Auftretens von postoperativen Komplikationen, wie bakterielle Infektionen, Wundheilungsstörungen und Entwicklung von Pseudarthrosen, die den Heilungsverlauf hinauszögern, lässt sich bei diesen Patienten ein deutlich höheres Risiko verzeichnen (Claes et al., 2004; Rommens und Broos, 1992).

In einer größeren Studie (Court-Brown, 2004) wurde eine Patientengruppe von insgesamt 1.106 Frakturen untersucht, die durch Marknagelung stabilisiert wurden. Eine Gruppe bestand aus 859 Patienten, die geschlossene Frakturen aufwiesen und die zweite Gruppe bestand aus 247 Patienten, die offene Tibiafrakturen aufwiesen. Die Frakturen wurden in Untergruppen entsprechend ihrem Schweregrad nach den gültigen Klassifikationen nach Tscherny und nach Gustilo unterteilt.

Für die Gruppe der offenen Frakturen konnten die Autoren eine mittlere Frakturheilungsdauer von 30 Wochen feststellen. Bei Frakturen, bei denen keine Komplikationen wie Infektion oder Pseudarthrosenbildung festzustellen waren, (68,5 % der Fälle) betrug die Frakturheilungsdauer 21,8 Wochen.

Wie erwartet stieg die durchschnittliche Zeit bis zur vollständigen Frakturüberbrückung mit steigendem Schweregrad der offenen Fraktur.

Bei 67 Patienten mit Gustilo IIIb Frakturen zeigte sich eine mittlere Frakturheilungsdauer von 46,7 Wochen. Dieses Ergebnis bestätigte sich für geschlossene Frakturen mit höhergradigem Weichteilschaden. Auch hier konnte man eine längere Heilungsdauer dokumentieren.

In dieser Studie untersuchte sollte auch eine Aussage bezüglich des Auftretens von Komplikationen, wie Infektion und Pseudarthrosebildung getroffen werden.

In der Gruppe der offenen Tibiafrakturen wiesen 7,7% der Patienten eine Infektion auf.

Die Autoren zeigten auf, dass mit höherem der Schweregrad offener Frakturen, die Wahrscheinlichkeit einer Infektion steigt:

Bei 128 Patienten mit Gustilo Grad III Frakturen wurden bei 61 Grad IIIa Frakturen keine Infektionen beobachtet. Bei den 67 offenen Frakturen von Typ IIIb betrug die Infektionsrate 16,4 %.

Die Autoren konnten auch belegen, dass das Auftreten von Pseudarthrosen ebenfalls vom Schweregrad der Fraktur abhängig ist. Während man bei 859 Patienten mit geschlossenen Frakturen eine Inzidenz von 4,4 % feststellen konnte, lag sie bei den offenen Frakturen mit 24,7 % wesentlich höher.

Bei den Gustilo IIIb Frakturen (67 Patienten) entwickelte fast jeder 2. Patient eine Pseudarthrose (49,2 %).

Riemer et al. (1995), Caudle und Stern, (1987) und Sanders et al. (1994) beschrieben in ihren Publikationen die Komplikationsraten bei offenen Schienbeinfrakturen für verzögerte Knochenbruchheilung zwischen 16 und 60 % bei Gustilo Grad I, II und IIIa Verletzungen. Für ausgedehnte Weichteilverletzungen (Gustilo Grad IIIb und IIIc Verletzungen) zeigen sie eine Komplikationsrate von sogar 43 – 100 % auf.

Court-Brown et al. (1990) untersuchten die Behandlungsergebnisse von 125 Patienten mit geschlossenen Tibiafrakturen und offenen Tibiafrakturen des Gustilo Grades I. Die durchschnittliche Frakturheilungszeit betrug 16,7 Wochen, die Inzidenz für Infektionen und Pseudarthrosen lag bei 1,6 %.

Die gleichen Autoren analysierten in einer weiteren Publikation eine Gruppe von jeweils 41 offenen Tibiafrakturen Gustilo Grad II und III. Sie konnten dabei einen Unterschied bezüglich durchschnittlicher Frakturheilungszeit und Auftreten einer Infektion bzw. Ausbildung einer Pseudarthrose nachweisen: Die durchschnittliche Frakturheilungszeit betrug 33,2 Wochen mit einer Inzidenz von 9,7 % für Infektionen und 36,3 % für Pseudarthrosenbildung.

Dieser Zusammenhang bestätigte sich auch für Frakturen mit höherer Verletzungsschwere: 13 Patienten mit Gustilo IIIb Frakturen wurden untersucht. Hier zeigte sich eine durchschnittliche knöcherne Heilungsdauer von 50,1 Wochen, die Infektionsrate betrug 23,1 %, 69,2 % der Patienten zeigten eine Pseudarthrosenbildung (Court-Brown, 1991).

Da sich das Krankheitsbild der infizierten Pseudarthrose sehr komplex darstellt und von sehr heterogenen Variablen beeinflusst wird, können klinische Studien bezüglich neuer Therapieansätze nur schwer durchgeführt werden. Die Patientenkollektive wären zu heterogen und nur bedingt vergleichbar.

Der individuelle und schwer vorhersehbare Krankheitsverlauf verdeutlicht die Notwendigkeit der Forschung an Tiermodellen, um neue Erkenntnisse in der Therapie dieses schweren Krankheitsbildes zu gewinnen.

Daher ist die Etablierung eines standardisierten Tiermodells sinnvoll, das eine möglichst präzise Simulation der klinischen und pathologischen Vorgänge gewährleistet und das Krankheitsbild der infizierten Pseudarthrose reproduzierbar macht. In einem derartigen in-vivo Tiermodell können neue experimentelle Ansätze bezüglich Prophylaxe und Therapie der akuten und chronischen Osteitis erarbeitet werden.

## 1.4. Zielsetzung

Bei der infizierten Pseudarthrose handelt es sich um ein Krankheitsbild mit wenig Behandlungsoptionen, aufwendiger und langfristiger Therapie, sowie mit hoher sozio-ökonomischer Bedeutung sowohl für den Patienten als auch für das Gesundheitssystem. Deshalb ist die Erforschung neuer Ansätze zur Prophylaxe und Therapie von infizierten Pseudarthrosen vonnöten. Hierfür ist ein adäquates Tiermodell notwendig, das die entsprechenden klinischen Gegebenheiten adäquat widerspiegelt.

Ein solches Modell zur Simulation einer implantat-assoziierten Pseudarthrose nach osteosynthetischer intramedullärer Stabilisation einer Tibiafraktur ist bislang nicht bekannt.

Deshalb ist es die Zielsetzung dieser Arbeit, ein Tiermodell an der Ratte zu etablieren, welches zuverlässig die Induktion einer infizierten Pseudarthrose mit Berücksichtigung der klinisch relevanten Gegebenheiten ermöglicht. Hierzu gehören die Verwendung von *Staphylococcus aureus* als infektionsauslösendem Keim, intramedulläre Stabilisation der Fraktur mit einem nagelähnlichen Implantat und die Verwendung einer systemmischen Antibiotikaprophylaxe. Dieses Modell kann die Grundlage für neue Therapieansätze liefern.

Im klinischen Alltag stellt die Diagnose von Implantat-assoziierten Knocheninfektionen weiterhin ein ungelöstes Problem dar. Mit Hilfe mikrobiologischer Untersuchungstechniken kann eine Osteitis - bei erfolgreichem Keimnachweis - sicher diagnostiziert werden, allerdings verfügt die Methode des Keimnachweises nur über eine eingeschränkte Sensitivität und Spezifität, so dass sich trotz nachweisbaren Infektionszeichen, keine Bakterien isolieren lassen.

Trampuz et al., Moter und Gobel (2007, 2000) zeigten, dass in Fällen einer Gelenksprotheseninfektion, die Rate der positiven Keimnachweisraten bei nur 54% liegt.

Trotz korrekt durchgeführter intraoperativer Gewebentnahme der infizierten periprothetischen Gelenksregion und der Anlage von bakteriellen Kulturmedien, gelingt der positive Keimnachweis zu einem wesentlichen Prozentsatz nicht.

Um die Diagnosemöglichkeiten zu verbessern, untersuchten Tunney et al. erstmals explantierte Prothesen mittels Ultraschallbad-Behandlung, um die innerhalb eines Biofilms der Implantat-Oberfläche anhaftenden Bakterien besser identifizieren zu können. Diese Technik ermöglicht es die etablierte Biofilmbildung und deren Anhaftung zu reduzieren und sogar von der Implantat-Oberfläche ablösen zu können. Im Rahmen dieser Studie konnten mit dieser Methode die Keimnachweisraten bis zu 75% verbessert und aufgezeigt werden, dass eine Verbesserung der Detektionsraten mittels dieser Technik möglich ist. (Tunney et al., 1999).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch die Anwendung quantitativer molekularer Methoden dazu beitragen kann, die Diagnostik der Osteitis zu verbessern. Allerdings muss sich ihr Nutzen in der klinischen Diagnostik noch herausstellen.

Um eine klare und zuverlässige Diagnose bei Verdacht auf eine Knocheninfektion stellen zu können, sind neue Instrumente und Ansätze vonnöten.

Mit der Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist im Falle einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* ein Nachweis dieser Bakterien möglich. Diese Methode wurde bisher im Weichteilgewebe etabliert. Hier werden mittels spezieller Sonden spezifische bakterielle 16S rDNA Regionen oder *Staphylococcus aureus*-spezifische DNA-Regionen detektiert (Bentley et al., 1993; Fuchs et al., 1998; Amann et al., 1999).

Eine Anwendung dieser Technik zum Nachweis von *Staphylococcus aureus* bei chronischer Osteitis in Form einer infizierten Pseudarthrose wurde bislang noch nicht beschrieben. Als neues Instrument könnte diese Methode wesentlichen Anteil daran haben, die schwierige Diagnostik der Osteitis entscheidend zu verbessern.

Deshalb beinhaltet die zweite Zielsetzung dieser Arbeit die Beantwortung der Frage, ob eine Bakteriendetektion in infizierten Pseudarthrosen mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) möglich ist.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Tierversuche**

#### **2.1.1. Ethikkommissionsvotum**

Die Experimente im Rahmen dieses Tierversuchsvorhabens wurden durch die Tierkommission des Staates Thüringen, Erfurt geprüft und genehmigt bevor die Operationen durchgeführt wurden. (RP Thüringen, Erfurt, Deutschland, Referenznummer: 14-03/07).

Die Durchführung des Versuchsvorhabens erfolgte im Forschungszentrum für Medizin und Biotechnologie (fzmb) e.V. in Bad Langensalza, Thüringen.

#### **2.1.2. Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten ausgewachsene Sprague-Dawley Ratten, deren Körpergewicht zwischen 320 und 440g lag. Die Tiere wurden von Charles River (L' Arbresle, Frankreich) bezogen und 2 Wochen vor dem OP-Termin eingestallt. Die Haltung in Doppelkäfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter der erworbenen Versuchstiere und die Durchführung der tierexperimentellen Versuche erfolgte in der Tierklinik für Groß- und Kleintiere in Bad Langensalza, Thüringen.

#### **2.1.3. Pilotstudiendesign**

Für die Etablierung des Tiermodells wurde zunächst eine Pilotstudie durchgeführt, um die ideale Inokulationsdosis an Keimen für den Hauptversuch zu ermitteln.

Ziel war es eine Kontaminationsdosis zu ermitteln, die eine verlässliche Induktion einer infizierten Pseudarthrose ermöglicht.

Für diese tierexperimentelle Studie wurde bei 8 Ratten nach vorausgehender Narkotisierung, mittels einer oszillierenden Säge eine Osteotomie am mittleren Tibiaschaft gesetzt und mit zwei unterschiedlichen Inokulationsdosen ( $10^3$  oder  $10^5$  keimbildende Einheiten (KBE) von *Staphylococcus aureus*) kontaminiert und intramedullär mit einer 21G Punktionsnadel (21G microlance needle, B & D Microlance, BD, Drogehd, Ireland) stabilisiert. Anschließend erhielten jeweils 2 der Tiere je nach Gruppenzuteilung eine systemische Antibiotikaprophylaxe mit Ceftriaxon (50mg/kg KG s.c.) über einen Zeitraum von 14 Tagen.

Hierfür wurden die 8 Tiere in 4 verschiedene Gruppe aufgeteilt:

**Gruppe 1:**  $10^3$  KBE *Staphylococcus aureus*, ohne systemische Antibiotikagabe

**Gruppe 2:**  $10^3$  KBE *Staphylococcus aureus*, mit systemischer Antibiotikagabe

**Gruppe 3:**  $10^5$  KBE *Staphylococcus aureus*, ohne systemische Antibiotikagabe

**Gruppe 4:**  $10^5$  KBE *Staphylococcus aureus*, mit systemischer Antibiotikagabe

	<b><math>10^3</math> KBE <i>St. aureus</i></b>	<b><math>10^5</math> KBE <i>St. aureus</i></b>	<b>Total</b>
<b>Kein Antibiotikum</b>	2	2	4
<b>Antibiotikum</b>	2	2	4

**Tabelle 2:** Pilotstudiendesign zur Ermittlung der Keimdosise für die Hauptstudie.

### 2.1.4. Hauptstudiendesign

Für die Hauptstudie wurden 18 Ratten verwendet, bei denen mittels einer oszillierenden Säge eine Osteotomie im mittleren Tibiaschaftbereich gesetzt wurde, mit nachfolgender Kontamination mit dem Erreger *Staphylococcus aureus*.

Hierfür wurden die Tiere in 2 Gruppen aufgliedert:

**Gruppe 1:** Kontamination des Frakturspalts mit  
 $10^4$  KBE von *Staphylococcus aureus* (12 Tiere)

**Gruppe 2:** Keine bakterielle Kontamination des Frakturspalts (6 Tiere)

	<b>10<sup>4</sup> KBE St. aureus</b>	<b>Total</b>
<b>Keine Kontamination (Kontrollgruppe)</b>	6	18
<b>Kontamination (Kontaminationsgruppe)</b>	12	

**Tabelle 3:** Hauptstudiendesign zur experimentellen Herbeiführung einer infizierten Pseudarthrose.

Nach 42 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und die Infektions- und Frakturheilungssituation durch klinische Untersuchung, Röntgenaufnahmen, mikrobiologische Methoden, einschließlich Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit *EUB* und *STAPHY*-Sonden analysiert. Zusätzlich wurden Micro-CT-Untersuchungen zur Bestimmung der knöchernen Neubildung, histologische und

rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Beurteilung einer Biofilm-Besiedelung der intramedullären Implantate durchgeführt.

Eine Antibiotikaprophylaxe mit Ceftriaxon (50mg/kg KG s.c.) wurde in beiden Gruppen über einen Zeitraum von 14 Tage durchgeführt. Es erfolgte eine kontinuierliche klinische Evaluation inklusive Gewichtsbestimmung der Tiere über 6 Wochen.

## 2.2. Erreger

Für die Infektionsinduktion wurde *Staphylococcus aureus* mit der Kennzeichnung EDCC 5055 (Eugen Domann Kultur Kollektion, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen, Deutschland) als Erreger verwendet. Dieser Bakterienstamm wurde aus einer Weichteilwunde eines Patienten, die mit diesem Keim infiziert war isoliert. Das Isolat wurde durch Testung der biochemischen Charakteristika von *St.aureus* mittels API®Staph (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) sowie durch Sequenzierung des 16S rDNA Gens und des Nachweises der *femB*- und *coa*-Gene durch PCR geprüft. Als besondere Merkmale des Stammes traten eine starke hämolytische Aktivität und eine gute Biofilmbildung in den Vordergrund.

Es bestand eine Sensibilität des Bakteriums Ceftriaxon. Als minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) wurde 0,16 µg/ml ermittelt.

Zur Herstellung der zu verwendenden Keimsuspension für die Operationen wurde das Isolat in Brain Heart Infusion (BHI)-Nährbouillon bei 37°C 16 Stunden unter kräftigem Schütteln inkubiert. Dieses Nährmedium ermöglicht durch eine optimale Nährstoffzusammensetzung (Gehirn-Herz-Bestandteile vom Rind, Casein, Peptongemisch, Hefeextrakt, Dextrose, Natriumchlorid) ein gutes Wachstum der Keime. Die Kultur wurde 1:50 mit PBS-Puffer verdünnt und wiederholt mit oben beschriebenem Verfahren für 4 Stunden bearbeitet.

Anschließend erfolgte eine weitere Verdünnung auf 1:10 und die Kultivierung der Keimsuspension auf BHI-Agarplatten.

Um eine genau definierte Konzentration des *Staphylococcus aureus*- Stammes (in keimbildenden Einheiten (KBE/ml)) zu erhalten, erfolgte die Ausimpfung mittels „Spiral Plater“. (Abb.10)

Dieses Gerät gewährleistet die gleichmäßige Auftragung der richtigen Keimdichte des *Staphylococcus aureus* in KBE pro ml.



**Abbildung 10:** Spiral Bacterial Plater (Topac, Cohasset, USA) (a) mit im Spiralmuster beimpfter Agarplatte (b).

Die fertigen Konzentrate, welche bei der Testung des Tiermodells appliziert werden sollten, enthielten 160µl als endgültiges Volumen. Darin waren verschiedene Inokulationsdosen mit einer Konzentration von  $10^3$ ,  $10^4$ , und  $10^5$  KBE pro 20µl in einem 20prozentigem BHI/glycerol Gemisch enthalten, die bis zu ihrer Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.

Die Inokulationsdosis betrug 20µl, die später intraoperativ mit der entsprechenden Keimzahl verabreicht wurde.

## **2.3. Versuchsdurchführung**

### **2.3.1. Narkose**

Die Anästhesie und die perioperative Überwachung wurden von einem Tierarzt/Tierärztin der tierärztlichen Institution in Bad Langensalza durchgeführt.

Jedes Tier erhielt als erstes eine intramuskuläre Injektionsnarkose bestehend aus Ketamin (60mg/kg KG; Ketanest®, Pfizer, Karlsruhe) und Xylazin (6mg/kg KG; Rompun®) und Atropin (0.1mg/kg KG)

### **2.3.2. Operationsvorbereitung**

In Narkose wurde zunächst das Operationsgebiet durch eine gründliche Rasur gesäubert, alle Haare entfernt und anschließend mit Polyvidon-Iod desinfiziert. Das zu operierende Tier wurde nun auf einem steril bezogenen Operationstisch gelagert und korrekt in Rückenlage positioniert (Abb.11).

Es folgte die Abdeckung des Operationsgebietes durch ein steriles Lochtuch. Um eine Kontamination zu verhindern wird während allen Eingriffen auf absolute Sterilität geachtet. Das beinhaltet das Tragen von steriler Operationskleidung, Handschuhen, Mundschutz und Operationshaube (Abb. 12).



**Abbildung 11:** Ratte nach Narkoseeinleitung und Desinfektion.



**Abbildung 12:** Schaffung steriler Bedingungen vor dem operativen Eingriff.

### 2.3.3. OP-Technik

Die Operation wird bei jedem Tier in Vollnarkose am linken Unterschenkel durchgeführt, die kontralaterale Seite bleibt unberührt.

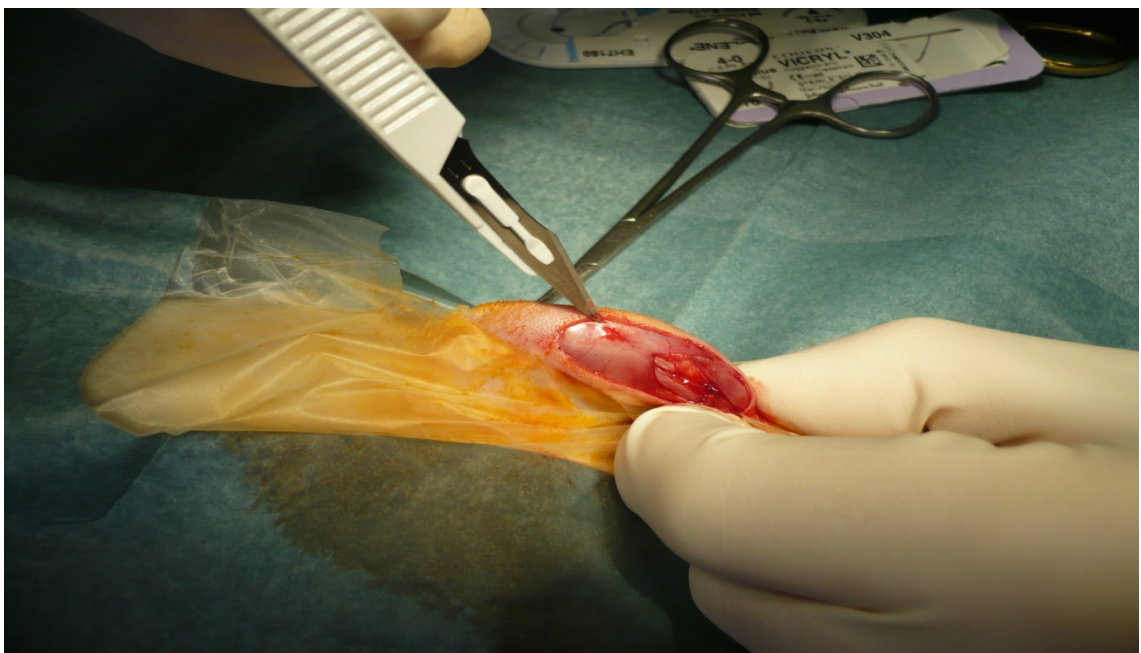
Mit einem 11er Skalpell erfolgt eine Hautinzision im mittleren Diaphysenbereich des Margo anterior der Tibia auf einer Länge von 3cm. Die Präparation wird entlang der Facies medialis at lateralis tibiae durchgeführt, gefolgt von einer

stumpfen Präparation der Dorsalseite der Tibia mittels Overhold-Klemme, die zwischen Facies posterior und Compartmentum posterius sowie Compartmentum anterius geschoben wird (Abb. 13).



**Abbildung 13:** Darstellung der freigelegten Tibia nach Hautinzision.

Die Hautinzision wird bis zur Tuberositas tibiae fortgeführt. Der Zugang zum intramedullären Kanal wird über eine Eröffnung des Canalis medullaris tibiae an der Tuberositas tibiae mittels Skalpell-Spitze erreicht (Abb. 14).



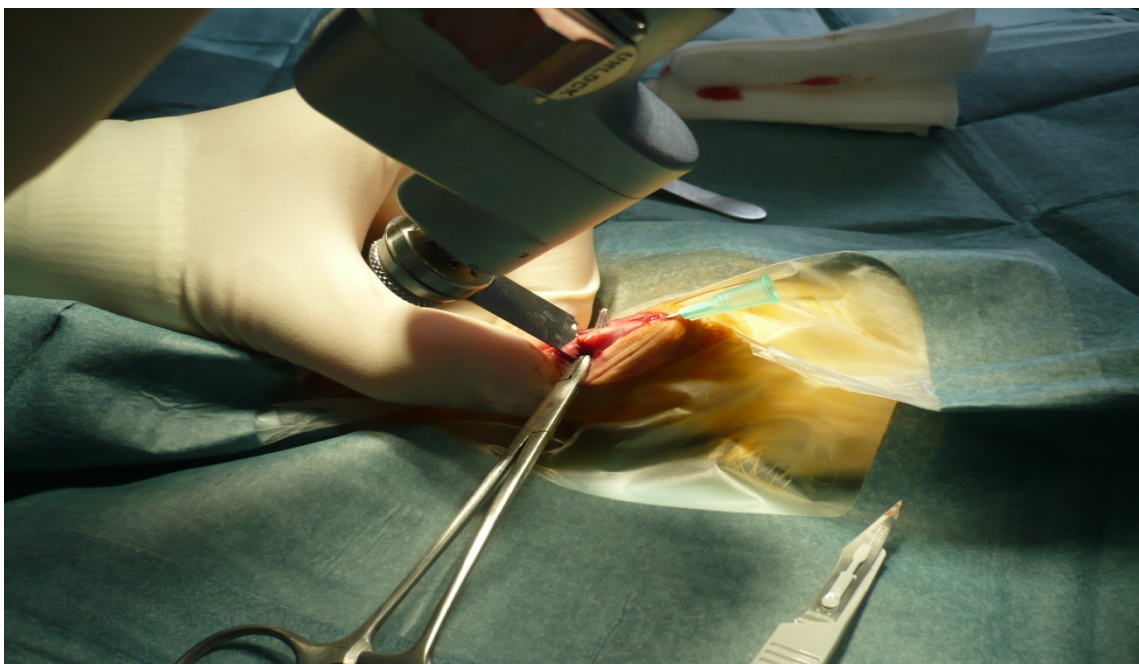
**Abbildung 14:** Schaffung eines Zugangs zum Markkanal durch Penetration der Tuberositas tibiae.

Es folgt das Einführen einer 21G Kanüle/K-Draht (grün) (21G microlance needle, B & D Microlance, BD, Drogehdha, Ireland) als intramedulläres Implantat in die Tibiamarkhöhle (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Einbringung des Implantates in den Knochenmarkkanal der Tibia.

Nach Einbringen des 0,6 mm durchmessenden Implantates wird die mittlere Tibiadiaphyse senkrecht zur Schaftachse mit einer oszillierenden Säge osteotomiert (Abb. 16).

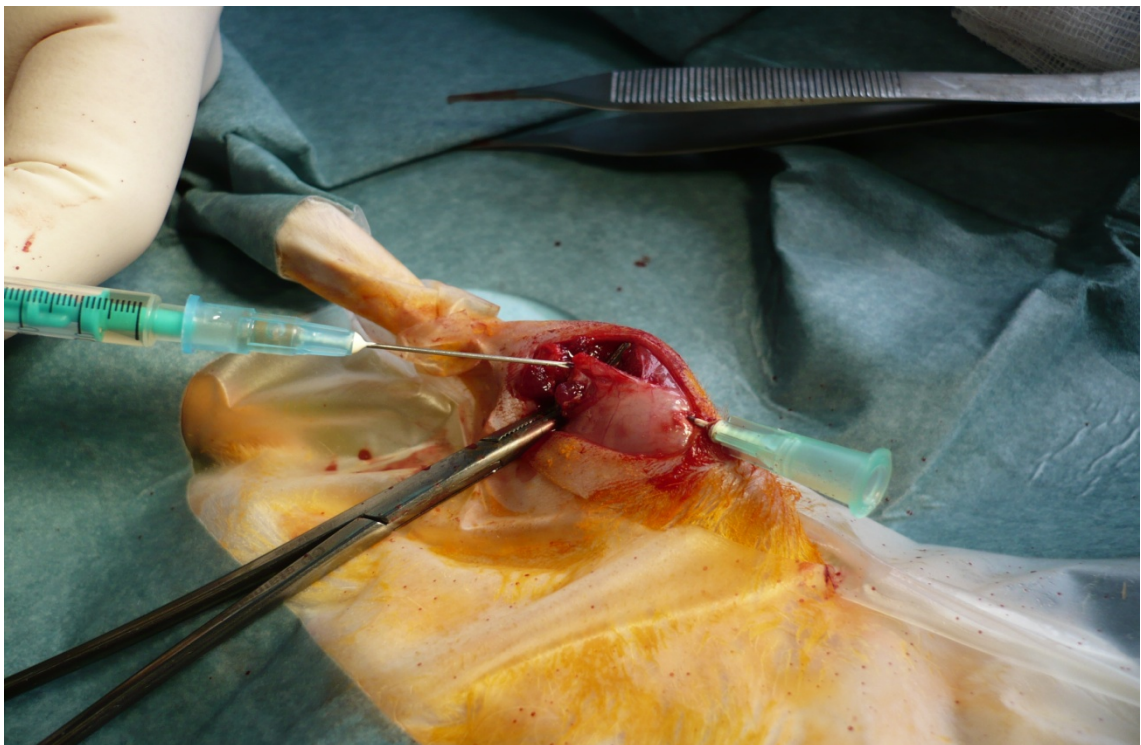


**Abbildung 16:** Durchführung der Osteotomie auf Höhe des mittleren Tibiaschaftes.

Sobald man auf das Implantat stößt, wird dieses zurückgezogen und die Osteotomie, bis zur vollständigen Durchtrennung der Tibia fortgesetzt.

Nach der Osteotomie wird die achsgerechte Reposition der Fragmente und eine Prüfung der Rotationsstabilität vorgenommen. Dabei muss die 21G Kanüle im distalen Tibiamarkkanal am Übergang zum oberen Sprunggelenk platziert sein.

Es folgt die Inokulation der Bakterien über eine 1ml Insulinspritze dorsolateral auf den Osteotomiespalt. Es werden 20µl der Bakterienlösung mit der entsprechenden Keimzahl entsprechend dem Studienprotokoll inokuliert (Abb. 17). In der Kontrollgruppe entfällt dieser Arbeitsschritt.



**Abbildung 17:** Inokulation der Bakterien in den Osteotomiespalt.

Es folgt ein schichtweiser Wundverschluss mit Subkutanverschluss mit 4-0 Vicryl-Faden.

Das Implantat wird anschließend geringfügig zurückgezogen und gekürzt, so dass es ohne Überstehen am proximalen Tibiarand in den Markkanal versenkt werden kann.

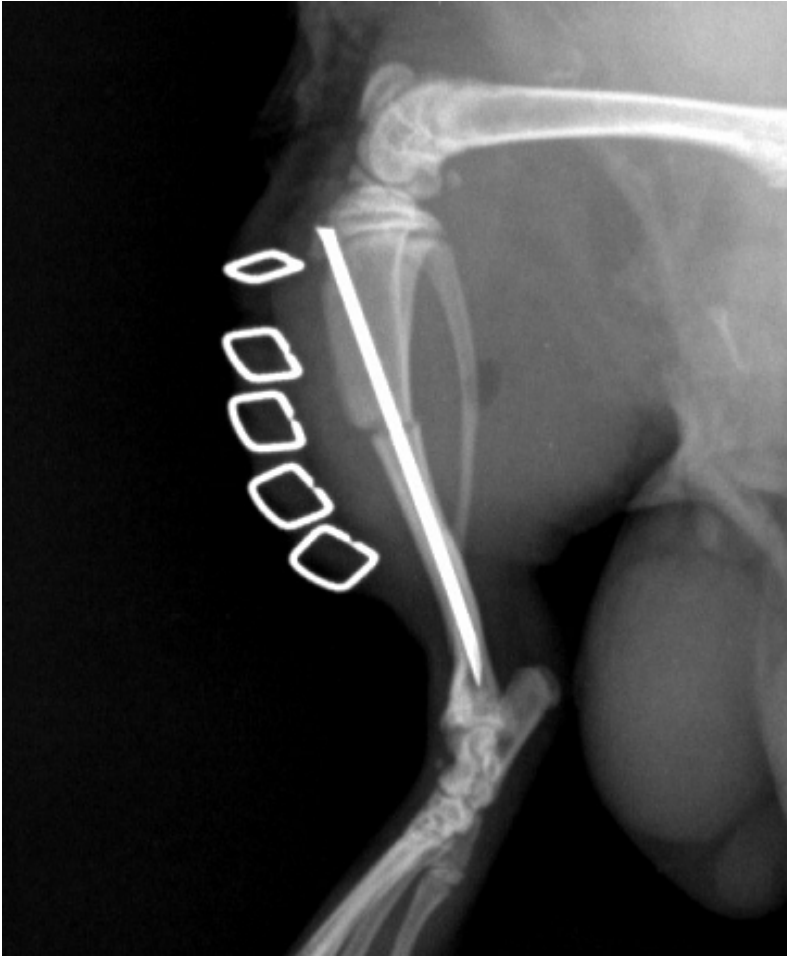
Demnach erfolgt der Hautverschluss mit 4-0 Prolene-Faden mit zusätzlichem Hautklammerverschluss. Abschließend erfolgt ein Sprühverband der Wunde (Abb. 18).



**Abbildung 18:** Zum Wundverschluss wird die Wunde vernäht und zusätzlich mit Hautklammern versorgt.

#### **2.3.4. Postoperative Röntgenkontrolle**

Direkt nach der Operation wird bei allen Tieren eine Röntgenkontrolle im seitlichen Strahlengang durchgeführt. Hierdurch wird das Vorliegen einer kompletten Osteotomie und die korrekte Implantatlage dokumentiert. Als Röntgengerät wurde ein Gierth HF 300 (Gierth X-ray, Riesa) benutzt. Bei einem Abstand des Unterschenkels zum Röntgengerät von 30 cm wurde mit 40 kV und 60 mA gearbeitet (Abb. 19).



*Abbildung 19: Postoperative Röntgenaufnahme mit einsehbarem Frakturspalt, korrekter Lage des Implantats und Hautklammern.*

### **2.3.5. Postoperative systemische Antibiotikaphylaxe und Nachbeobachtung**

Postoperativ erhalten die Ratten einmal täglich eine Schmerzmedikation Carprofen (0,4 mg/kg KG s.c.) über 5 Tage. Diese Medikation kann bei Bedarf bis zu zweimal täglich verabreicht werden, gegebenenfalls auch über den 5. postoperativen Tag hinaus.

Alle operierten Tiere erhalten über 14 Tage – entsprechend des Durchführungsprotokolls – eine systemische Antibiotikaphylaxe (Ceftriaxon 50mg/kg KG s.c.). Allen Ratten wurde eine Vollbelastung ihres operierten

Hinterlaufs gestattet. Sie wurden in Käfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

Während des 6-wöchigen Beobachtungszeitraums wurden das Verhalten und der körperliche Zustand der Ratten täglich dokumentiert. Aus tierärztlicher Sicht wurde dabei speziell der Heilungsverlauf der Operationswunde, Bewegungsaktivität und die Belastung der operierten Extremität begutachtet. Da bei der Operation Bakterien in den Frakturspalt appliziert wurden, wurde hier sehr genau auf die Entstehung von Infektionszeichen wie Rötung oder Schwellung geachtet. Dazu gehört auch die Dokumentationen bezüglich Futteraufnahme und die Kontrolle des Körpergewichts der Tiere.

### **2.3.6. Dokumentation des Körpergewichts**

Die Dokumentation des Körpergewichts der operierten Tiere wurde am Tag der Operation und an bestimmten postoperativen Tagen vorgenommen. Die Messzeitpunkte waren der 7., 14., 21. und 42. postoperative Tag.

### **2.3.7. Euthanasie, klinische Beurteilung der Infektion und der Knochenstabilität**

Nach der Beobachtungszeit wurden alle Tiere mittels Kohlendioxid-Gas (CO<sub>2</sub>) euthanasiert. Der Tod der Ratten wurde tierärztlich verifiziert.

Direkt nach der Tötung erfolgte die klinische Untersuchung des operierten Unterschenkels. Die gesamte untere Extremität, einschließlich der Wade und des angrenzenden Kniegelenks und Knöchelregion wurden auf das Vorliegen von klinischen Entzündungszeichen untersucht. Dabei wurde speziell auf Rötungen, subkutane Abszesse, Schwellungen, Fistelbildung im Rahmen von

Weichteildefekten und damit verbundenem eitrigem Ausfluss geachtet. Sämtliche Beobachtungen wurden für jedes Tier protokolliert.

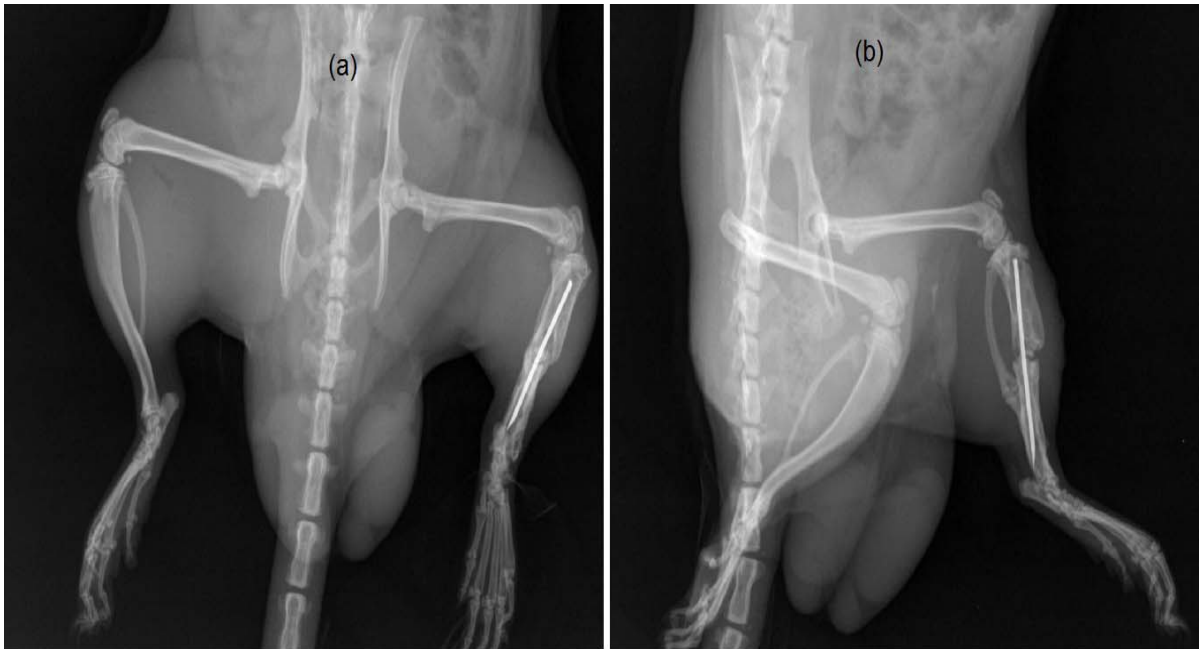
### **2.3.8. Röntgenuntersuchung**

Vor der Explantation der Tibia wurden von den euthanasierten Ratten Röntgenbilder der operierten Extremitäten in 2 Ebenen (lateral und anterior-posterior) angefertigt, um röntgenologische Hinweise auf Infektentstehung und Frakturheilung zu erhalten (Gierth HF 300, Gierth X-ray, Riesa, Germany) (Abb. 20).

Knochen- und Gelenkdestruktion, Knochensequesterbildung, Lyse der Kortikalis und Auftreibung des Periosts wurden als Zeichen für eine Infektion des Knochens gewertet.

Die Frakturheilung wurde hinsichtlich der kortikalen Frakturkonsolidierung anhand der Überbrückungszustände der 4 Cortices beurteilt. Eine kortikale Überbrückung von mehr als 3 Cortices im anterior-posterior und lateralen Strahlengang wurde als konsolidierte Fraktur gewertet.

Erkennt man auf den im anterior-posterior und lateralen Strahlengang angefertigten Röntgenbildern mehr als 3 knöcherne (kortikale) Überbrückungen, so wurde dies als geheilte Fraktur gewertet (Govender et al., 2002). Sind auf den Röntgenbildern weniger als 3 überbrückende kortikale Strukturen zu erkennen, wird dies als ausbleibende Knochenheilung der Frakturregion und somit als Pseudarthrose angesehen.



**Abbildung 20:** Röntgenaufnahme des linken Unterschenkels im ap (a) und im seitlichen Strahlengang (b).

### 2.3.9. Entnahme der Tibia

Die Explantation des Unterschenkels erfolgte direkt nach der Inspektion und klinischen Untersuchung. Unter Schonung des Frakturbereichs, wurde das Schienbein von sämtlichen anliegenden Muskel- und Bandstrukturen freipräpariert und im angrenzenden Knie- und Knöchelbereich exartikuliert. Die Explantation der Tibia erfolgte unter sterilen Kautelen (Abb. 21).



**Abbildung 21:** *Durchtrennung des Bandapparates der Kniegelenksregion zur Explantation der Tibia.*

Während der entnommene Unterschenkel für weitere Untersuchungen mit einer oszillierenden Säge längs zerteilt wurde, ließ sich der nun freiliegende Markraum der Tibia genauer einsehen. Das umliegende Weichteilgewebe des Schienbeins, sowie der Markkanal wurden ebenfalls auf Infektionszeichen wie Eiterherde, Abszessbildung, Kortikalislyse und auf Blutergüsse an den angrenzenden Gelenken untersucht. Das Auftreten von einem oder mehrerer dieser Symptome wurde als Infektion gewertet.

### **2.3.9.1. Überprüfung der Knochenstabilität**

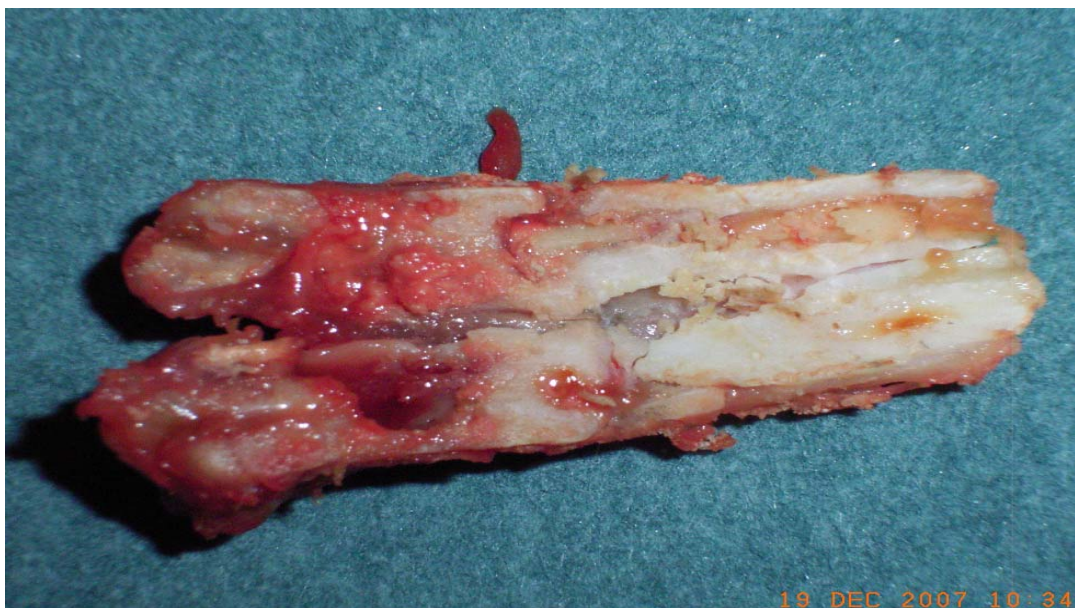
Um die Knochenstabilität zu beurteilen, wurde das distale Tibiafragment sehr vorsichtig gegen den proximalen Knochenteil manuell verdreht. Jede Beweglichkeit wurde als Instabilität gewertet.

### 2.3.9.2. Ausrollen des Implantats auf Agarplatten

Das noch im Markraum befindliche Implantat wurde steril entfernt und mit einer Pinzette auf einer BHI-Agarplatte ausgerollt. Der Nachweis von bakteriellem Kulturwachstum nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden auf dem Nährmedium zeigt eine bakterielle Keimbesiedlung der Implantatoberfläche an und wurde als Infektion gewertet.

### 2.3.9.3. Verwendung der Tibiahälften

Die Tibiae der Tiere wurden nach Resektion mittels einer oszillierenden Säge längs in 2 Hälften gespalten. Dabei entstanden ein medialer und ein lateraler Kortikalisteil (Abb. 22). Beide Stücke wurden mit PBS-Puffer gewaschen und danach gewogen. Während die mediale Hälfte für die Histologie vorbereitet wurde, wird das laterale Knochenfragment dazu verwendet, die Menge der Bakterien pro Gramm Knochen zu bestimmen (KBE/g Knochen). Der K-Draht wurde ebenfalls für mikrobiologische Untersuchungen auf Keimnachweis herangezogen.



**Abbildung 22:** Gespaltene Tibia nach Entfernung des Implantats.

#### **2.3.9.4. Aufbereitung von Knochenproben für Bakterienkulturwachstumstest**

Um die Bakterienbelastung jedes einzelnen Tieres im infizierten Knochen nachweisen und berechnen zu können, wurde - entsprechend den von Alt et al. (2006b) publizierten Schritten vorgegangen (Abb. 23).

Das laterale Knochenfragment wird gewogen und anschließend in ein mit 10ml PBS-Puffer gefülltes Dispergiergefäß GS 15 gegeben und für die Zermahlung vorbereitet.

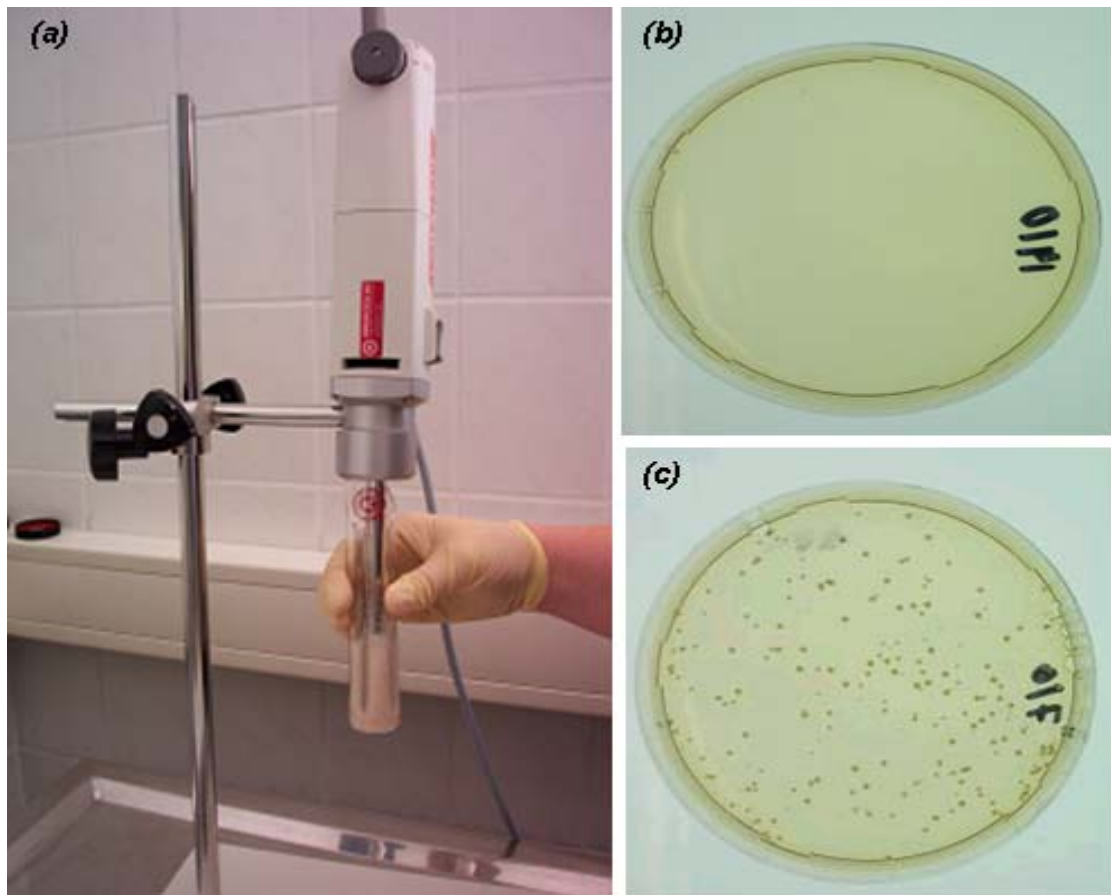
Das gewonnene Knochenmaterial der Tibia wird mit dem POLYRON T2100 Tissue Grinder (Kinematica, Littau, Schweiz) zermahlen, um die Knochenpartikel zu zerkleinern. Die Zerkleinerung der Knochenstücke in der Maschine erfolgte unter steigender Rotationsgeschwindigkeit über 10 Minuten. Die Knochensuspension wurde anschließend verdünnt (1:2, 1:10, 1:100), wovon jeweils 10 µl der drei verschiedenen Konzentrationen auf BHI-Agarplatten ausplattiert wurde. Die Platten wurden jeweils bei 37°C über 24 h in einem Kulturschrank kultiviert. Die mikrobiologische Definition eines vorliegenden Infektes war der Nachweis von *Staphylococcus aureus* auf der Agarplatte (Abb. 23c).

Die Anzahl der keimbildenden Einheiten (KBE) wurde pro Agarplatte bestimmt. Diese konnte dann zum Gewicht der initial verwendeten Knochenprobe, die für diese Untersuchung zerkleinert wurde, ins Verhältnis gesetzt und daraus die Kenngröße KBE/g Knochen errechnet werden. Aus den drei unterschiedlichen Verdünnungen einer Knochenprobe wurde schließlich der Durchschnittswert von KBE/g Knochen für jedes Tier mit Bakteriennachweis berechnet.

Sämtliche Vorgänge finden unter sterilen Bedingungen statt.

Lies sich eine positive Bakterienproliferation mit Kolonienbildung auf den Nährmedien nachweisen, wurde dies als Infektion gewertet.

Der statistische Vergleich der beiden Behandlungsgruppen bezüglich der bakteriellen Belastung pro g Knochen wurde mit einem t-Test für logarithmisch transformierte Daten durchgeführt. Dabei wurden p-Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.



**Abbildung 23:** Zermahlen der Knochenproben mittels eines "Tissue Grinders" mit nachfolgender Auftragung des Homogenisats auf BHI-Agarplatten (a). Bei einem Tier der Knotrollgruppe lässt sich nach 48stündiger Kultivierung kein Bakterienwachstum feststellen (b) hingegen lässt sich bei einem Tier mit bakterieller Kontamination der Fraktur ein positives Kulturwachstum verzeichnen (c).

## 2.4. Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Nach 48 Stunden wurden aus den auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien Proben für die PFGE gewonnen, um die Keime genetisch exakt zu identifizieren und damit einen Vergleich zwischen dem inokulierten Stamm EDCC 5055 und den infektauslösenden Keimen vorzunehmen, um somit eine Kontamination ausschließen zu können. Dazu wurden die PFGE und das CHEF-DR II-System

(Biorad, München, Deutschland) verwendet, wie es von Linhardt et al. (1992) beschrieben wurde.

## **2.5. Histologie**

Nach Euthanasie der Tiere wurden die medialen Hälften der Tibiae für histologische Untersuchungen aufgearbeitet. Die Knochenproben wurden 24 Stunden in 4% phosphatgepuffertem Paraformaldehyd fixiert und zur weiteren histologischen Aufbereitung in Paraffin eingebettet. 5 µm längsverlaufende Schnitte wurden mit der von Donath und Breuer (1982) publizierten Schnitttechnik abgetragen und mit Toluidine-Blau und Hämatoxylin-Eosin angefärbt.

Als histologische Zeichen einer Knocheninfektion wurden die folgenden Kriterien verwendet (Adler, 1983, Strauß, 1999):

- Abszessbildung mit Ödemen im Knochenmarkskanal oder der kortikalen Knochenstrukturen
- Infiltration von Entzündungszellen: Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und mehrkernige Riesenzellen
- Nachweis von Bakterien
- Abbau von lamellärer Knochensubstanz mit subperiostaler Knochenbildung und Periostauftreibung
- Bildung von Knochennekroseherden, die sich als leere Knochenhöhlen ohne Osteozyten darstellen
- Ausbildung von Knochensequestern

## 2.6. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die aus dem Markraum der Ratten explantierten Implantate wurden einer REM-Analyse zugeführt, um dadurch eine eventuelle Biofilmbildung und/oder Bakterienkolonien auf der Implantatoberfläche zu identifizieren. Sie wurden über einen Zeitraum von 4 bis 8 Wochen an der Luft getrocknet. Mit einem Seitenschneider, der vor jeder Benutzung mit 70% Ethanol desinfiziert wurde, wurde jedes Implantat in 3 Stücke geschnitten. Die 3 Stücke jeder Probe wurden mit Hilfe von haftenden carbon-pads auf Aluminiumbefestigungsplatten fixiert und mit Gold/Palladium mittels Sprühung (SC7640 Sputter Coater, VG Microtech, Uckfield, East Sussex, Großbritannien) beschichtet. Die Implantatfragmente wurden in einem Feldelektronen – Rasterelektronenmikroskop (LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Deutschland), welches bei 7,5 oder 15kV betrieben wurde, näher betrachtet.

## 2.7. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Zum Nachweis der inokulierten Bakterien im Paraffinschnitt wurde eine Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Bei dieser Methode werden Fluoreszenz-gekoppelte DNA-Sonden eingesetzt, die bei der Hybridisierung spezifisch an die DNA der Bakterien bindet.

Es wurden 2 Anti-Sense-DNA Sonden eingesetzt: a) EUB0338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'), die durch Bindung an die 16s DNA zur allgemeinen Detektion von Bakterien dient und b) STAPHY (5'-CGGACGAGAAGCTTGCTTCTCT-3') mit der ausschließlich *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden kann. Als Negativkontrolle wurden folgende Sense-Sonden verwendet: a) non-EUB0338 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3') und b) non-STAPHY (5'-CGGACGAGAAGCTTGCTTC-3'). Die Sonden wurden in Auftragssynthese von der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und an Cy3 bzw. Fluorescein-5-Isocyanat gekoppelt.

Folgendes Protokoll wurde für die FISH verwendet: Es wurden Paraffinschnitte in einer Dicke von 6 µm mit einem Rotationsmikrotom (RM 2155, Leica, Nussloch, Deutschland) hergestellt und auf Objektträgern aufgezogen, die zuvor mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (Fluka, Basel, Schweiz) beschichtet wurden. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte 2x 10 Minuten (min) in Xylol und jeweils 5 min in 100%, 96%, und 70% Ethanol inkubiert. Anschließend erfolgte ein kurzer Waschschrift in Aqua bidest und in 0,1 M phosphatgepufferter Saline, bevor die Schnitte in 4% phosphatgepuffertem Paraformaldehyd für 1 Stunde (h) nachfixiert wurden. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit 2 mg/ml Lysostaphin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 0,1 M NaCl für 3 min bei 37°C permeabilisiert. Nach gründlichem Waschen wurde 100 µl der Prähybridisierungslösung, die aus 35 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 2,5x standardisierten Natriumcitratpuffer (SSC), 2,5x Denhardt's, 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,05% Natriumlaurylsulfat (SDS), 50 µg/ml Hering-Sperma-DNA, 0,45 M NaCl und 22,5% deionisierten Formamid bestand, für 30 min bei 43°C aufgetragen. Dann wurden 5 µl der Fluoreszenz-gekoppelten Sonde dazugegeben und für 2 h bei 43°C inkubiert. Nach erfolgter Hybridisierung wurden sie Schnitten 35 min in 2x SSC gewaschen und mit Vectashield Einbettmedium mit 4',6 Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector, Lörrach, Deutschland) eingedeckelt. Die Auswertung wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot2, Zeiss, Jena, Deutschland) und einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (TCS SP2, Leica, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

## 2.8. Micro-CT

Um die Knochenarchitektur der Osteotomiestelle dreidimensional darzustellen und die Knochenheilung und auch knöchernen Infektzeichen besser erfassen zu können, wurden Micro-CT-Untersuchungen durchgeführt. (Micro CT 80; Scano medical, Bassersdorf, Schweiz) (Abb. 24).



**Abbildung 24:** Micro-CT-Gerät ( $\mu$ CT 80, Scano Medical) mit PC-Station.

Bei einer randomisierten Auswahl von Tieren der Kontaminations- und Kontrollgruppe wurde eine Micro-CT-Untersuchung durchgeführt. Das gescannte Präparat bestand aus dem Tibiaschaftanteil 2cm distal bis 2cm proximal der Frakturstelle.

Zur Fixation im  $\mu$ CT-Behälter wurde zuerst ein Schaumstoffblock einseitig eingeschnitten. In den entstandenen Spalt drückte man die Knochenprobe vorsichtig hinein. Anschließend wurde der Schaumstoffblock inklusive Knochenpräparat im  $\mu$ CT-Behälter installiert. Dieser Behälter ist mit einem gekerbten Dorn ausgestattet, der die starre Fixation der Tibia innerhalb des Gerätes ermöglicht.

Bevor die eigentliche Untersuchung startet, wurde der  $\mu$ CT-Behälter mit 0,9% physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Der vollgesogene Schwamm sorgt für eine fixe Position der Tibia im Behälter während des 75minütigen Scanvorgangs.

Bei einer Integrationszeit von 400ms wurden insgesamt 400 Schichten von jeweils 36 $\mu$ m Dicke angefertigt.

Zuerst wurde ein Übersichtsscan durchgeführt, um den Frakturspalt zu lokalisieren und digital zu markieren. Von dort aus wurden anschließend 200 Schichten à 36 $\mu$ m nach kranial und 200 Schichten à 36 $\mu$ m nach kaudal angefertigt. Dies entspricht 0,72cm in beide Richtungen (insgesamt 1,44cm).

Eine Durchbauung („Bridging“) der Kortikalis im Frakturspalt von mehr als 75% wurde als stabile knöcherne Frakturheilung angesehen.

Knochendestruktionen, kortikale Osteolyse und Knochensequesterbildung wurden als Infektzeichen gewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Pilotstudie

Zur Etablierung des Tiermodells und Festlegung einer geeigneten Inokulationsdosis des *Staphylococcus aureus* Stammes EDCC 5055 für die Hauptstudie wurde eine Pilotstudie an 8 Tieren mit den Keimdosen  $10^3$ ,  $10^5$  KBE durchgeführt.

Alle Tiere der Kontaminations- und Kontrollgruppe überlebten die postoperative Beobachtungsphase. Zu keinem Zeitpunkt der 6-wöchigen Observationsdauer traten bei den operierten Ratten Komplikationen wie Sepsis oder Symptome einer systemischen Entzündungsreaktion auf.

Die Tiere, die zu den Gruppen gehörten, die keine systemische Antibiotikaprophylaxe mit Ceftriaxon erhielten, entwickelten alle eine chronische Osteitis. In beiden Gruppen ließen sich infizierte Pseudarthrosen für beide Kontaminationsdosen ( $10^3$  und  $10^5$  KBE) bei allen Tieren diagnostizieren (Infektionsrate 100%), (Tabelle 4).

In den Gruppen mit systemischer Antibiotikaprophylaxe, kam es bei keinem Tier, die mit  $10^3$  KBE *Staphylococcus aureus* kontaminiert wurden, zu einer infizierten Pseudarthrose. Bei einer Kontaminationsdosis von  $10^5$  KBE kam es bei einem der beiden Tiere zur Entwicklung einer infizierten Pseudarthrose.

<i>Infizierte Pseudarthrose</i>	<b>10<sup>3</sup> KBE <i>St. aureus</i></b>	<b>10<sup>5</sup> KBE <i>St. aureus</i></b>	<b>Total</b>
<b>Kein Antibiotikum</b>	2/2	2/2	4/4
<b>Antibiotikum</b>	0/2	1/2	1/4

**Tabelle 4:** Ergebnisse der Pilotstudie.

### 3.1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der Pilotstudie

Bei Inokulation der geringsten Keimdosis von  $10^3$  KBE kam es bei keinem der zwei Versuchstieren, die eine Antibiotikaphylaxe erhielten zum Ausbruch einer Infektion, wohin gegen sich bei allen Tieren, die keine Antibiotikaphylaxe verabreicht bekamen, mit der Inokulationsdosis von  $10^3$  und  $10^5$  KBE eine Infektion etablierte.

Die Durchführung der Pilotstudie konnte die Eignung des gewählten experimentellen Infektionsmodells bestätigen. Bei einer Kontaminationsdosis von  $10^5$  KBE kam es in allen Fällen zur Ausbildung einer chronischen Osteitis in Form einer infizierten Pseudarthrose.

Für die Eignung des gewählten experimentellen Infektionsmodells ist es von entscheidender Wichtigkeit, dass die Infektion zuverlässig induziert werden kann, ohne zu gravierenden, respektive vital bedrohlichen Begleiterkrankungen zu führen.

Um eine verlässliche Infektionsinduktion zu erreichen und um gleichzeitig das Auftreten von systemischen Komplikationen, wie z.B. einer septischen Bakteriämie vermeiden zu können, wurde aufgrund dieser Ergebnisse für die Hauptstudie eine Inokulationsdosis von  $10^4$  KBE gewählt.

### 3.2. Hauptstudie

Bei allen Tieren der Kontrollgruppe kam es zu einer ungestörten, infektfreien knöchernen Heilung der Osteotomie (Tab. 5). Bei den Tieren bei denen der Osteotomiespalt bakteriell kontaminiert wurde, waren in 11 von 12 Fällen klare Zeichen einer Knochen- und Weichteilinfektion, prätibialen Schwellung, Eiterbildung mit einhergehender Weichteildestruktion zu beobachten. Nur bei einem Tier der Kontaminationsgruppe wurden keine Knochen- bzw. Weichteilinfektionen diagnostiziert (Tab. 5).

Bei allen 10 infizierten Ratten ließ sich eine unzureichende knöcherne Heilungssituation konstatieren, einhergehend mit deutlicher Instabilität des Osteotomiespalts, ohne knöcherne Durchbauung. Das verbleibende Tier dieser Gruppe, welches keine Infektzeichen entwickelte, wies eine stabile Knochenheilung auf.

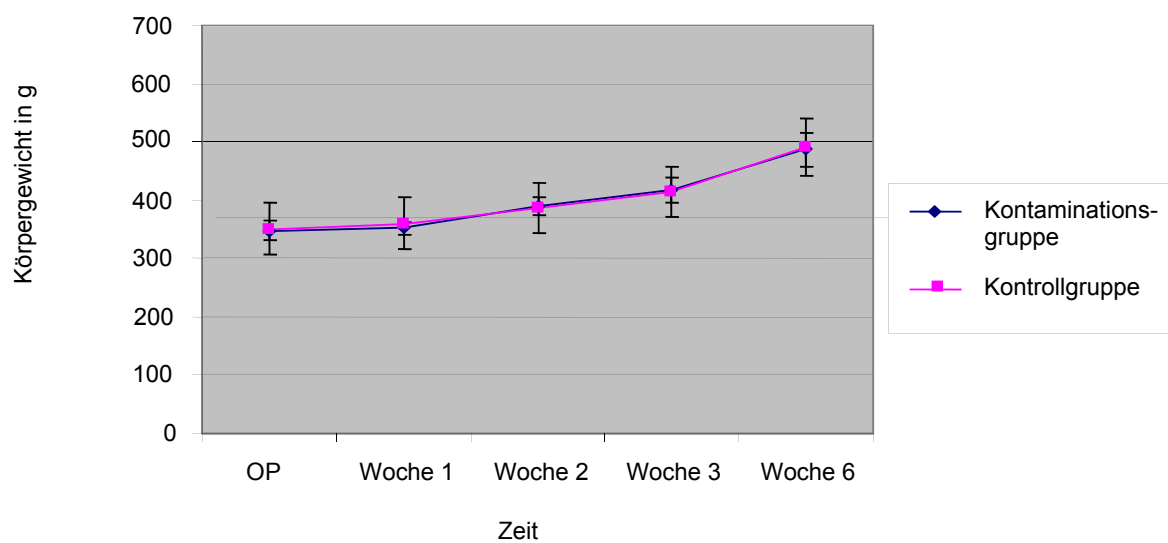
	<b><i>Klinische Zeichen der infizierten Pseudarthrose</i></b>	<b><i>Infektfreie, geheilte Fraktur</i></b>	<b>Total</b>
<b>Kontamination</b>	11	1	12
<b>Keine Kontamination</b>	0	6	6

**Table 5:** Überblick der Ergebnisse der klinischen Untersuchung.

### 3.2.1. Körpergewichtsaufzeichnung

Die wöchentlichen postoperativen Gewichtsbestimmungen zeigen für die Infektions- und Kontrollgruppe eine fast identische Entwicklung. In der 6-wöchigen postoperativen Beobachtungszeit ließ in beiden Gruppen eine konstante Gewichtszunahme feststellen und somit ein systemischer Gewichtsverlust, z.B. als Hinweis auf eine systemische Infektion, ausschließen.

(Abb. 25)



**Abbildung 25:** Graphische Darstellung der Entwicklung des Körpergewichts der Tiere während der 6-wöchigen Beobachtungsphase.

### 3.2.2. Klinische Ergebnisse der Hauptstudie

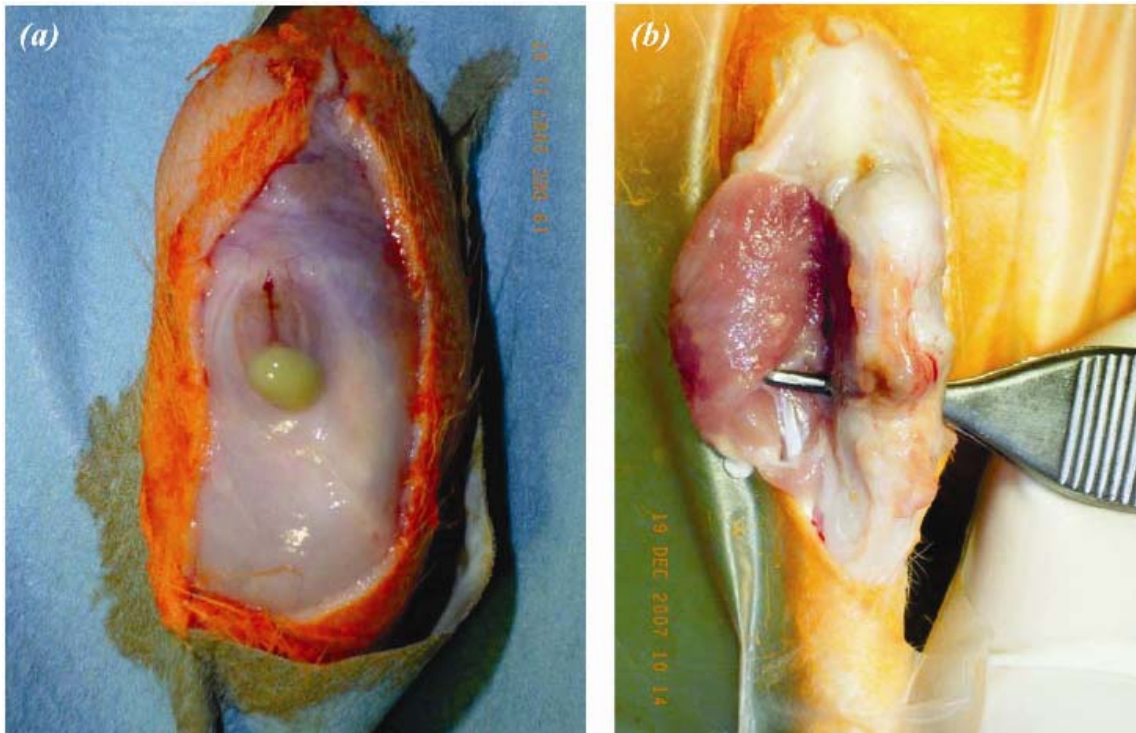
11 von 12 der zur Kontaminationsgruppe gehörenden Tiere, bei denen eine Kontamination des Osteotomiespalts durchgeführt wurde, zeigten an Weichteil- und Knochenstrukturen eindeutige Zeichen eines Infektionsgeschehens.

Infektionszeichen wie praetibiale Schwellung, mit Fistel- und Eiterbildung und Weichteilgewebszerstörung kennzeichneten das klinische Bild (Abb. 26a, 27, 28).

Bei den infizierten Tieren ließen sich eine fehlende knöcherne Durchbauung des Frakturspalts erkennen. Klinische Zeichen der knöchernen Heilung waren nicht zu erkennen. Durch die ausgebliebene Frakturheilung zeigten sich die Tibiae im Bereich der Fraktur als instabil (Abb. 26b).

Bei 6 Tieren der Kontrollgruppe, bei denen keine Kontamination des Frakturspalts erfolgte, konnten keine klinischen Zeichen, die eine Infektion der Knochenstrukturen oder des Weichteilmantels zeigen, diagnostiziert werden.

Bei diesen infektfreien Tieren fand man stabile Knochenverhältnisse vor, die auf eine ungestörte knöcherne Heilung hindeuten (Abb. 30).



**Abbildung 26:** Der klinische Untersuchungsbefund zeigt prätibiale Schwellung, subkutane Eiterbildung (a) und infiziertes Weichteilgewebe um den nicht knöchern durchbauten Frakturspalt (b) bei einem Tier der Kontaminationsgruppe.



**Abbildung 27:** Fisteleiterung als äußeres, sichtbares Zeichen und typisches Symptom der chronischen Osteitis.



**Abbildung 28:** Subkutane Eiterbildung als Zeichen einer Infektion des Weichteilmantels bei einem Tier der Kontaminationsgruppe.



**Abbildung 29:** Bei einem entnommenen Unterschenkel eines Tiers der Kontaminationsgruppe zeigt sich makroskopisch die fehlende knöcherne Überbrückung mit Eiterbildung des Osteotomiespalts als charakteristisches Zeichen einer infizierten Pseudarthrose.



**Abbildung 30:** Tibia der Kontrollgruppe mit stabiler knöcherner Durchbauung ohne Hinweise auf eine Infektion oder ausbleibende knöcherner Heilung.

### 3.2.3. Röntgenologische Ergebnisse der Hauptstudie

Auf den nach der 42 Tagen angefertigten Röntgenbildern ließen sich bei allen Tieren der Kontrollgruppe, bei denen keine bakterielle Kontamination des Osteotomiespalts vorgenommen wurde, eine ungestörte knöcherner Heilung nachweisen. Der Befund der klinischen Untersuchung bestätigte sich sowohl im anterior-posterioren, als auch im lateralen Strahlengang. Röntgenologisch zeigten diese Tiere eine vollständige knöcherner Durchbauung des Frakturspalts. Es ließen sich stabile knöcherner Verhältnisse ohne radiologische Hinweise auf ein Infektionsgeschehen feststellen (Abb. 31 a, b).

Bei den Tieren der Kontaminationsgruppe ließen sich deutlich erkennbare Zeichen eines chronisch-entzündlichen Prozesses erkennen, die die gesamte Tibia betrafen. Es war ein unregelmäßiges Auftreten von Verdichtungszone und Aufhellungsarealen zu erkennen, die auf die gesamte Tibia und angrenzende Gelenksstrukturen übergriffen. Man stellt radiologische Zeichen eines persistierenden Frakturspalts, ohne kortikale Überbrückung, mit

Knochensequesterbildung, kortikaler Osteolyse und einer Auftreibung des Periosts fest (Abb.31 c, d).



**Abbildung 31:** Nativröntgen nach 42 Tagen mit erfolgreicher knöcherner Heilung durch vollständige kortikale Überbrückung aller 4 Cortices im ap- (a) und lateralen Strahlengang (b) bei einem Tier der Kontrollgruppe.

Nativröntgen einer Tibia mit bakterieller Kontamination des Osteotomiespalts mit nicht durchbauter Osteotomie und deutlich osteolytischen Auftreibungen im Bereich der gesamten Tibia mit Sequesterbildung, im Sinne einer infizierten Pseudarthrose im Osteotomiespalt (Pfeil) (c), (d).

### 3.2.4. Mikrobiologische Ergebnisse der Hauptstudie

Bei den Tieren, bei denen der Osteotomiespalt bakteriell kontaminiert wurde, zeigte sich ein positives Keimwachstum in den mikrobiologischen Auswertungen. Diese positiven Keimnachweise zeigten sich genau bei den Tieren, die auch bereits klinisch und röntgenologisch eindeutige Hinweise auf eine infizierte Pseudarthrose aufwiesen. Die nach Explantation auf den Agarplatten ausgerollten Implantaten dieser Tiere zeigten im „Roll-Out-Experiment“ ein eindeutiges positives bakterielles Keimwachstum, dessen Wachstumsmuster auf eine bakterielle Besiedelung der gesamten Implantatlänge rückschließen ließ (Abb. 32a). Dies ist Hinweis darauf, dass die bakterielle Besiedelung des Implantates nicht auf die Nachbarschaft zu der initial kontaminierten Osteotomiestelle beschränkt war. Die homogenisierten Knochenproben aus der lateralen Tibiahälfte dieser Tiere wiesen ebenfalls ein Keimwachstum auf (Abb. 32b). Die Quantifizierung der Keimauszählung erbrachte eine bakterielle „Belastung“ der Implantate von ca.  $10^4$  KBE und bei den Knochenproben von ca.  $10^5$  KBE/g Knochen.

Die PFGE wies in allen Fällen, bei denen ein bakterielles Wachstum auf den Agarplatten zu beobachten war, den bei der Kontamination verwendeten *Staphylococcus aureus* Stamm EDCC 5055 nach (Abb. 32c). Somit konnte stets eine sekundäre Kontamination mit einem anderen Keim ausgeschlossen werden.

Weder bei den explantierten Implantaten beim „Roll-Out-Test“ noch bei den Anzuchtungen der Knochenproben der Tiere aus der Kontrollgruppe war ein bakterielles Wachstum zu beobachten. Sämtliche BHI-Platten blieben ohne Keimnachweis.

Somit korrelierten die mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse zu 100% mit den klinischen und röntgenologischen Resultaten sowohl bei klinisch und röntgenologischem V.a. auf infizierte Pseudarthrose als auch bei klinischem Hinweis auf ungestörte Frakturheilung in Infektfreiheit.



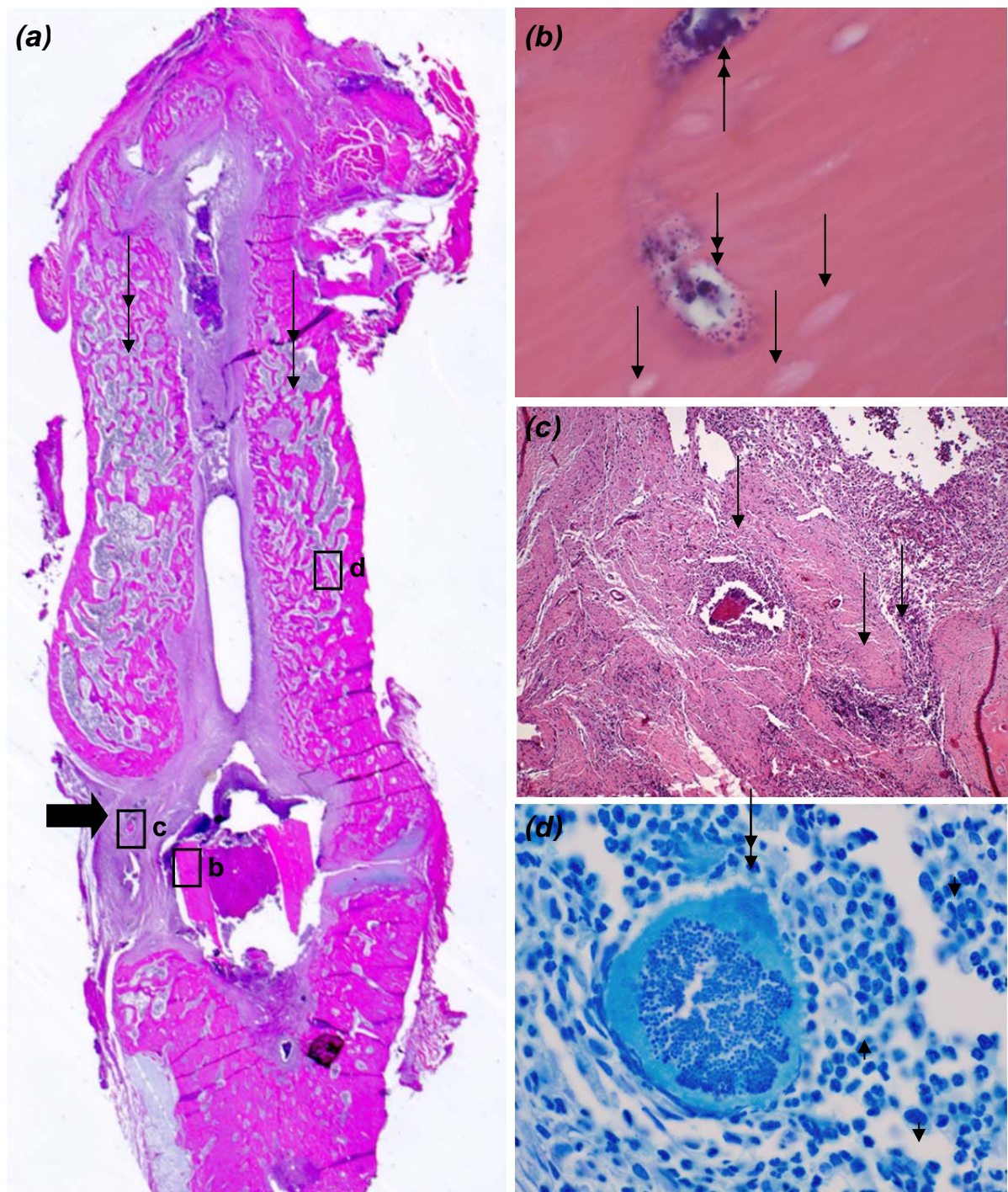
### **3.2.5. Histologische Befunde**

Wie bei der Auswertung der mikrobiologischen Untersuchung kam es auch bei der histologischen Auswertung zu einer 100%-igen Korrelation mit den klinischen und radiologischen Ergebnissen. Bei allen Tieren bei denen klinisch und radiologisch Hinweise auf eine infizierte Pseudarthrose bestand, zeigten sich klare histomorphologische Hinweise auf eine infizierte Pseudarthrose.

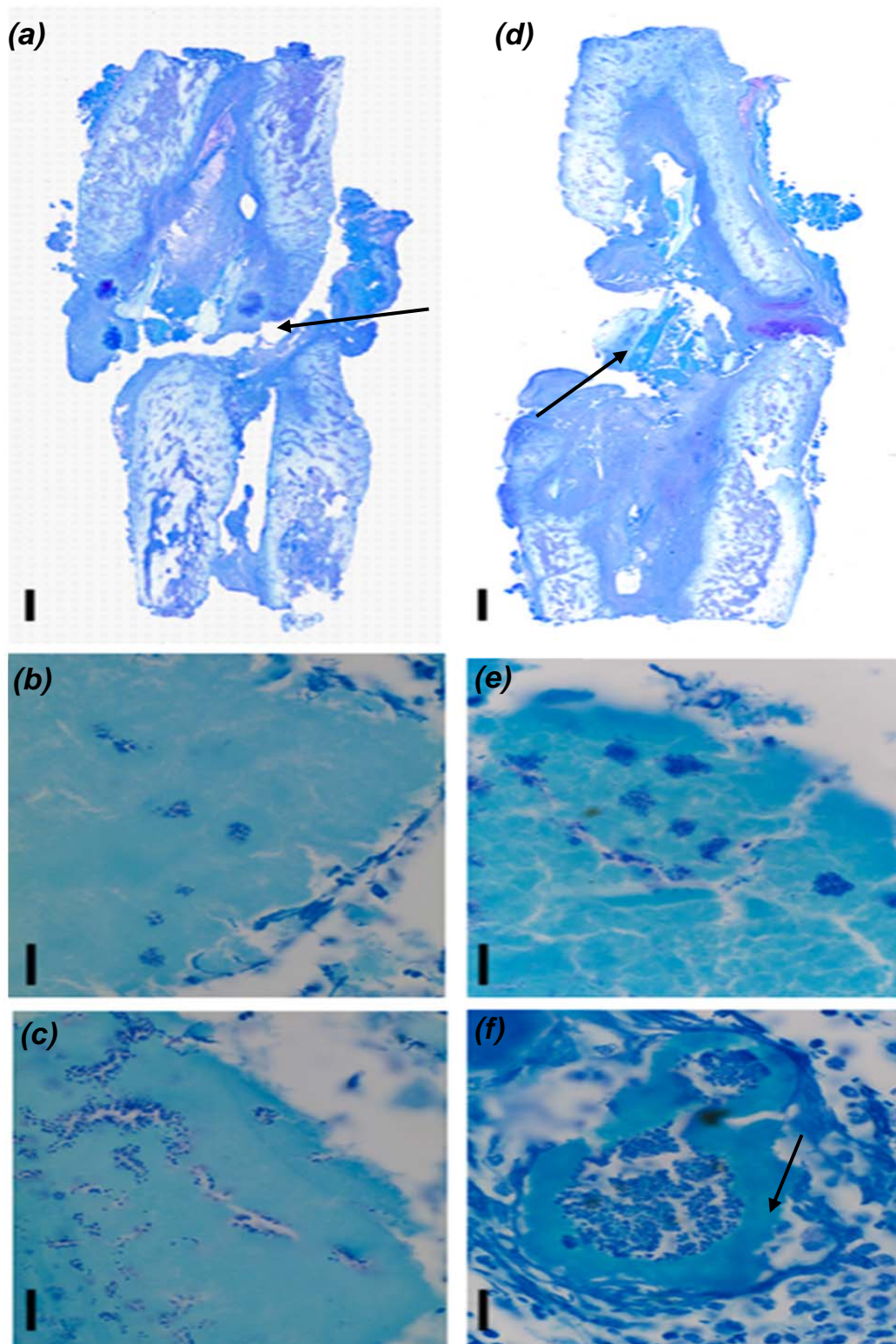
Bei allen anderen Tieren war histologisch eine ungestörte Heilung der Osteotomie zu konstatieren.

Die Tiere der Kontaminationsgruppe zeigten charakteristische histomorphologische Merkmale einer infizierten Pseudarthrose mit zusätzlicher Einbeziehung der kompletten Tibia im Sinne einer Osteitis des gesamten Röhrenknochens (Abb. 33a).

Die Präparate zeigen den im mittleren Schaftbereich der Tibia persistierenden Frakturspalt, der nicht knöchern durchbaut und hauptsächlich mit Bindegewebe durchsetzt ist (Abb. 34 a,c).



**Abbildung 33:** Fehlende knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalts (Pfeil) mit ausgedehnter Osteolyse der Kortikalis (Doppel-Pfeil) (a). Knochensequester mit eingemauerten toten Osteozyten (Lacunae) (Pfeile) mit eingekapselten kokkenähnlichen Strukturen (Doppel-Pfeil) (b). Granulationsgewebe im Frakturspalt im Rahmen der Infiltration (Pfeile) (c). Bakterienähnliche Strukturen (Pfeil) in einer extrazellulären Matrix (Doppel-Pfeil), die als Biofilm gewertet werden. Den Biofilm umgebende Lymphozyten und andere Abwehrzellen (Pfeilspitzen) (d). (a-c: HE Färbung, d: Toluidine Blau; Scale bar: 1mm (a), 100  $\mu$ m (b,d)).



**Abbildung 34:** Fehlende knöcherne Durchbauung des Osteotomiespalts (Pfeil) und massive Destruktion von kortikaler Knochenstruktur (a). Kokkenähnliche (bakterienähnliche) Gebilde im Bindegewebsspalt der infizierten Pseudarthrose (b) auch cortical sichtbar (c). Knochensequesterbildung im Gelenkspalt der infizierten Pseudarthrose (Pfeil) (d) mit Anwesenheit von bakterienähnlichen Strukturen im Weichteilgewebe des Frakturspalts (e) Biofilmbildung (Pfeil) (f). (Scale bar: 1mm (a,d), 100  $\mu$ m b,c,e,f).

Das histologische Bild ist weiterhin von massiver kortikaler Osteolyse mit erheblichem Verlust von Knochensubstanz geprägt, begleitend von beträchtlicher Infiltration von Entzündungszellen wie Lymphozyten, Plasmazellen und vielkernigen Riesenzellen.

In diesem ausgedehnten inflammatorischen Granulationsgewebe ließen sich ebenfalls Ansammlungen von eingekapselten Bakterien detektieren (Abb. 33b).

In Nachbarschaft zu den in Haufen liegenden Bakterienkolonien erkannte man eine extrazelluläre Matrix, die als bakterielle Biofilmstruktur interpretiert wurde (Abb. 33d, 34f).

Es wurden reichlich Knochensequester mit toten Osteozyten, die sich als Hohlräume oder auch „Lacunae“ darstellen gefunden. In diesen porösen Gewebsabschnitten, die sehr häufig zentral im Falschgelenkspalt der infizierten Pseudarthrose lokalisiert waren, sind bakterienähnliche Strukturen zu finden. Häufig ließ sich bei diesen kokkoiden Ansammlungen ein enger örtlicher Bezug zum Implantat nachweisen (Abb. 34b-e).

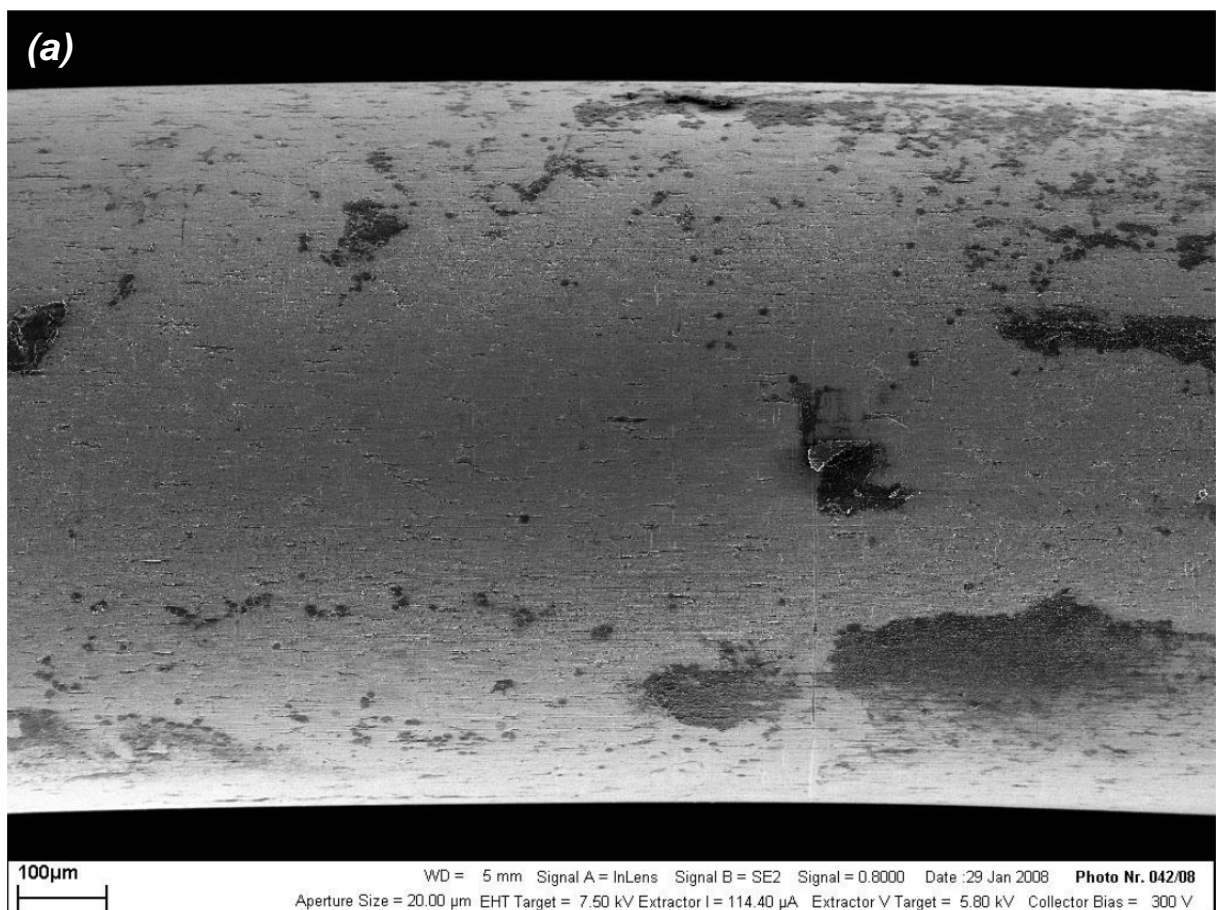
Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten eine erfolgreich abgelaufene knöcherne Konsolidierung. Der Osteotomiespalt stellte sich als vollständig durchbaut dar, so dass man eine histologisch gesicherte komplikationslose Knochenheilung feststellen konnte.

Es fanden sich keine histomorphologischen Zeichen für eine knöcherne Infektion oder sonstige knochenkonsumierende Entzündungsreaktionen.

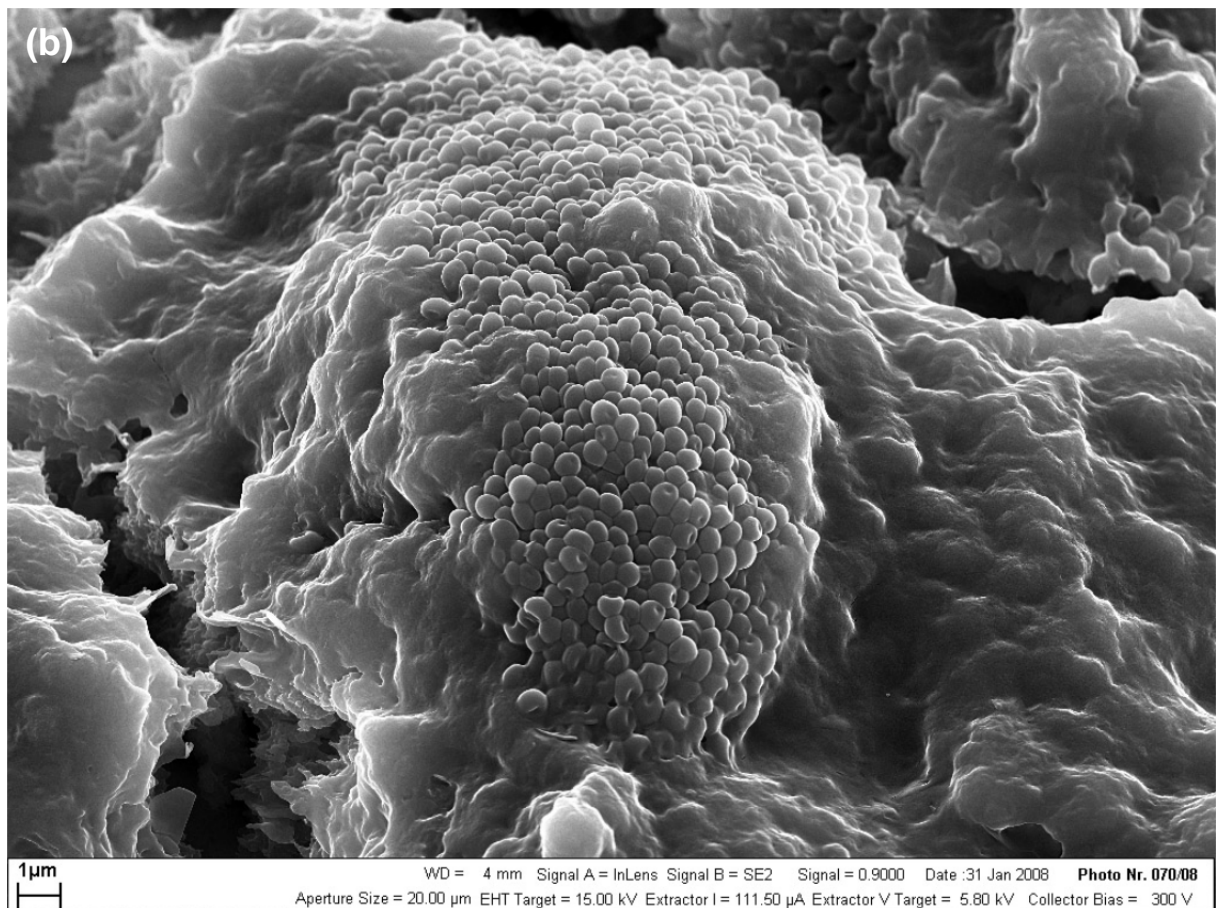
### 3.2.6. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie

Bei den Ratten, die klinische und histologische Zeichen für eine infizierte Pseudarthrose im Rahmen einer chronischen Osteitis aufwiesen, konnte man durch die Elektronenmikroskopie das Auftreten von Biofilmstrukturen bestätigen. Auf den explantierten Implantaten konnte man großflächig verteilte Bakterienkolonien erkennen. Diese Keimansammlungen waren nicht nur partiell auf den Implantaten vorhanden, sondern erstreckten sich über deren gesamte Länge. Es ließen sich kokkenartigen Bakterienkolonien, die in einer extrazellulären Matrixstruktur haften erkennen (Abb. 35 a, b). Diese keimdurchsetzte Besiedlung wurde als bakterieller Biofilm gewertet.

Die Implantate der Kontrolltiere zeigten keine Biofilmbildung oder Hinweise auf eine bakterielle Besiedlung auf der Oberfläche.



**Abbildung 35a:** Saumartige Anlagerung von Bakterienkolonien direkt an der Oberfläche des Implantats (a).



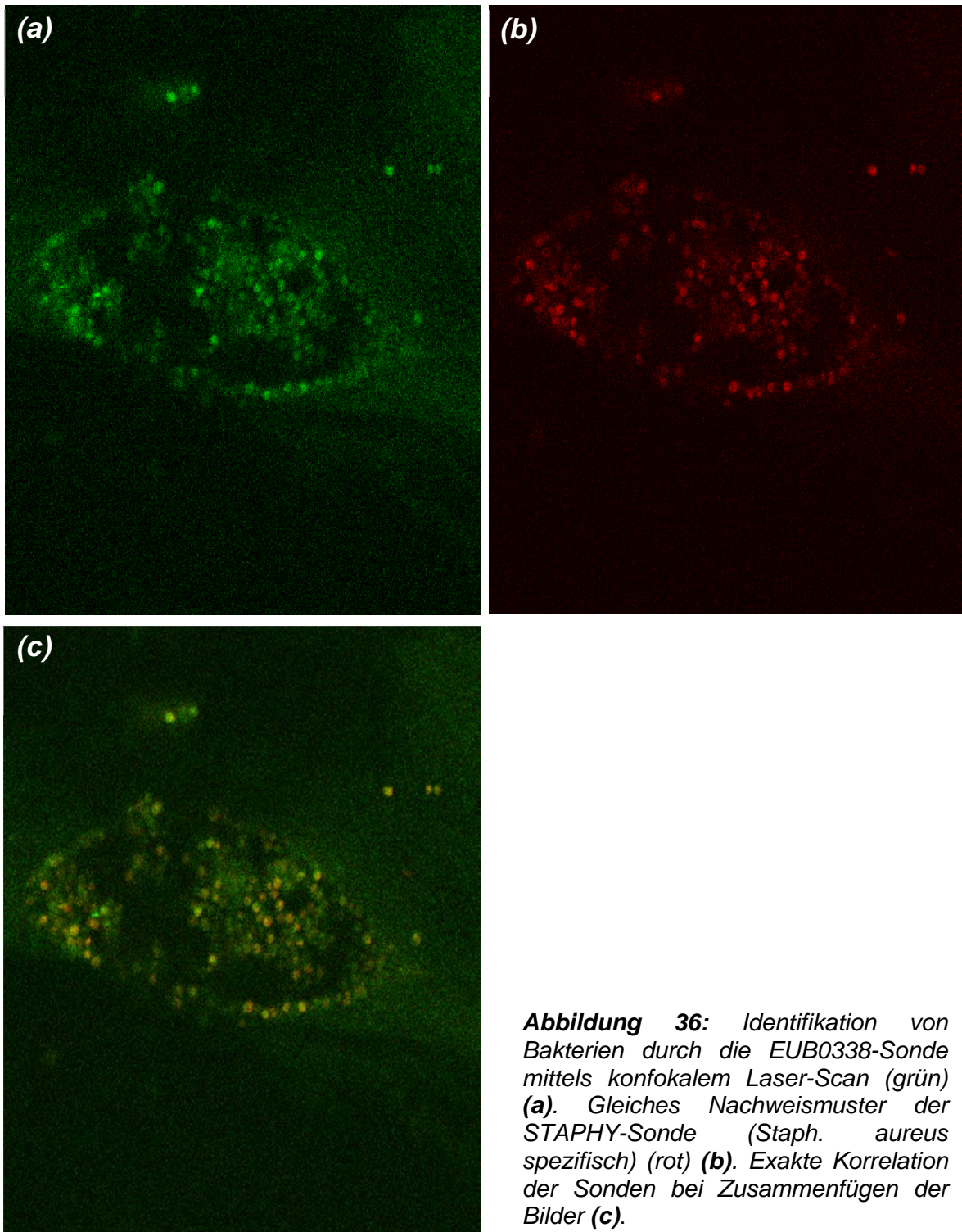
**Abbildung 35b:** *Rundliche, kokkenartige Ansammlungen, die in einer großflächigen Matrix, die als Biofilm gewertet wird, eingebettet sind (b).*

### 3.2.7. Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die FISH-Methode wurde bei den Tieren, die eine Infektion aufwiesen durchgeführt, um den Nachweis von bakteriellem DNA-Material zu ermöglichen.

Durch die EUB 0338-Sonde, die sämtliches prokaryontisches DNA-Material detektiert, ließ sich bei allen getesteten infizierten Knochenproben ein eindeutiger Nachweis bakterieller DNA erbringen (Abb. 36a).

Mit der Staphylokokken-spezifischen *STAPHY*-Sonde konnten exakt dieselben Strukturen detektiert werden (Abb. 36b), so dass auch hier zum einen bestätigt werden konnte, dass durch FISH-Technik Bakterien bei Knocheninfektionen detektiert und zum anderen Staphylokokken als infektionsauslösende Keime identifiziert werden konnten.

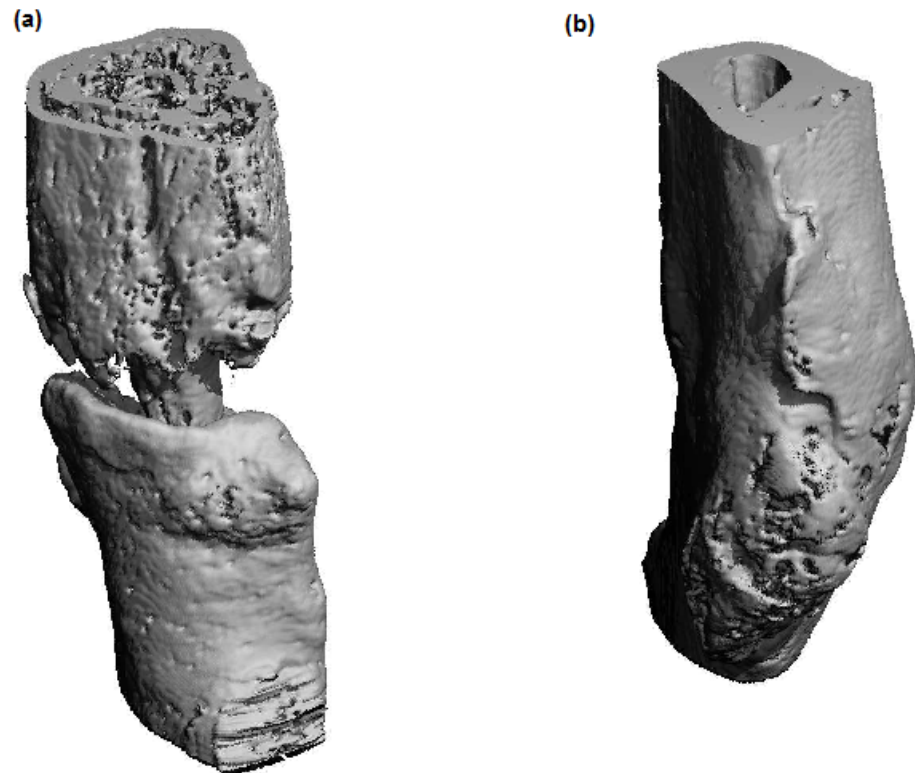


### **3.2.8. Ergebnisse des Micro-CT**

Durch die Technik des Micro-CTs konnten die Ergebnisse der bereits durchgeführten Methoden abermals bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungstechnik bestätigten die bereits genannten Erkenntnisse und unterstreichen erneut die exakte Korrelation der verschiedenen Methoden zur Feststellung einer etablierten chronischen Osteitis in Form einer infizierten Pseudarthrose.

Bei den Tieren der Kontaminationsgruppe zeigten sich im Micro-CT charakteristische knöcherne Veränderungen im Sinne einer infizierten Pseudarthrose. Die dreidimensionale Darstellung durch Micro-CT verdeutlicht die fehlende knöcherne Überbrückung, ausgedehnt auftretenden Osteolysen mit Verlust von kortikaler Knochensubstanz und die Formierung von Knochensequestern im Frakturspalt (Abb. 37a).

In der Kontrollgruppe hingegen zeigte sich bei allen Tieren das Bild einer geheilten Fraktur mit vollständiger knöcherner Konsolidierung aller 4 Cortices. Das Micro-CT Bild zeigt stabile ossäre Verhältnisse ohne Zeichen eines Entzündungsprozesses (Abb. 37b).



**Abbildung 37:** Persistierender Osteotomiespalt ohne knöcherne Überbrückung, kortikaler Osteolyse und Knochensequesterbildung **(a)**. Erfolgreiche knöcherne Heilung mit vollständiger Wiederherstellung der knöchernen Kontinuität **(b)**.

### 3.2.9. Zusammenfassung der Ergebnisse der Hauptstudie

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das vorgestellte Modell eine verlässliche Induktion einer Implantat-assoziierten infizierten Pseudarthrose an der Tibia ermöglicht. Die klinischen, radiologischen, mikrobiologischen und histologischen Befunde korrelieren sehr gut miteinander und bestätigen somit unabhängig voneinander die Verlässlichkeit des Modells. Die Resultate der Elektronenmikroskopie, der FISH-Technik und des Micro-CT bestätigen und komplettieren ebenfalls die exakte Korrelation der Untersuchungsergebnisse.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Zielsetzung**

Erstes Ziel dieser Arbeit war es ein neues Tiermodell zu etablieren, welches die zuverlässige Erzeugung einer infizierten Pseudarthrose an der Tibia von Ratten nach Osteotomie, anschließender intramedullärer Stabilisierung und bakteriellen Kontamination ermöglicht.

Der komplikationsträchtige Krankheitsverlauf und die hohe sozio-ökonomische Belastung einer infizierten Pseudarthrose verdeutlicht die Notwendigkeit der Forschung an Tiermodellen, um neue Erkenntnisse zur Verbesserung der Therapie zu gewinnen.

Daher ist die Erarbeitung zuverlässiger und standardisierter experimenteller Tiermodelle, die eine möglichst präzise Simulation der klinischen und pathologischen Veränderungen gewährleisten, unerlässlich. *In vivo* Experimente mit Tiermodellen haben eine große Wichtigkeit im Hinblick auf die Entwicklung neuer, verbesserter Behandlungsstrategien.

Dieses Tiermodell kann maßgeblich zur Entwicklung neuer Therapieoptionen, die auf die Verbesserung von Prophylaxe und Behandlung von infizierten Pseudarthrosen zielen, beitragen.

Die zweite Zielsetzung dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die FISH Fluoreszenz-in-situ-hybridisations-Technik (FISH) im Rahmen von Knocheninfektionen, als diagnostisches Mittel zur Verbesserung der Diagnostik von Knocheninfektionen beitragen kann.

## 4.2. Vergleich mit publizierten Tiermodellen

Aktuell ist in der Literatur kein Tiermodell beschrieben, welches die klinische Situation einer infizierten Pseudarthrose der Tibia nach intramedullärer Nagelung widerspiegelt. Es sind zwar verschiedene Tiermodelle beschrieben, die Implantat-assoziierte Infektionen erzeugen (An et al., 2006), allerdings spiegeln diese nicht die klinische Situation einer Implantat-assoziierten chronischen Osteitis in Form einer infizierten Pseudarthrose wider.

Es sind 2 Tiermodelle beschrieben, die annäherungsweise die klinische Situation einer chronischen Osteitis nach Osteosynthese simulieren.

Wichtige klinische Aspekte werden bei diesen beiden Tiermodellen allerdings nicht berücksichtigt und so ergeben sich im Vergleich zu dem neuen Tiermodell, welches in dieser Arbeit vorgestellt wurde, deutliche Unterschiede.

Das erste Modell geht auf die Arbeit von Lucke et al. (2005, 2003) zurück. In diesem Rattenmodell wird nach bakterieller Kontamination des Tibiamarkraums ein K-Draht intramedullär implantiert und die Tiere mit oder ohne systemische Antibiotikaprophylaxe behandelt. Dieses Modell wurde für die Untersuchung von Poly-L(lactid)-Gentamicin beschichteten intramedullären Implantaten entwickelt, um dadurch die Infektionsprophylaxe bei offenen Tibiafrakturen zu verbessern. *Staphylococcus aureus* wurde zur Kontamination des Knochenmarkkanals verwendet, mit anschließender intramedullärer Platzierung des Implantates, ohne zusätzlich eine Fraktur zu erzeugen. In diesem Modell kombinierte man die intramedullär eingebrachten Poly-L(lactid)-Gentamicin-beschichteten Implantate mit systemischer Antibiose und erreichte eine signifikante Reduktion der Infektionsraten verglichen mit unbeschichteten Implantaten.

Dieses Modell führte zur Entwicklung von poly-L(lactid)-Gentamicin-beschichteten intramedullären, unaufgebohrten Tibianägeln (UTN Protect<sup>®</sup>, Synthes, Oberndorf, Schweiz) (Schmidmaier et al., 2006).

Damit ergibt sich zu dem in dieser Arbeit vorgestellten Tiermodell ein wichtiger Unterschied.

Das Tiermodell von Lucke et al. führt zu einer Infektion des Markraumes im Sinne einer Osteomyelitis, allerdings wird auf eine Osteotomie verzichtet, so dass der Heilungsverlauf einer infizierten Fraktur nicht untersucht werden kann. Da bei diesem Tiermodell nur eine Infektion im Markkanal des stabilen Knochens provoziert und keine begleitende Osteotomie durchgeführt wurde, kommt es nicht zur Ausbildung einer infizierten Pseudarthrose wie in dem Tiermodell der vorliegenden Arbeit.

Ein weiteres Tiermodell, das eine Annäherung an das klinische Bild der infizierten Pseudarthrose ermöglicht, wurde von Chen et al. beschrieben (Chen et al., 2005).

Bei diesem Modell wurde ein 6 mm großer Substanzdefekt am Femur von Ratten erzeugt. Es folgte eine bakterielle Kontamination mit *Staphylococcus aureus* und die Versorgung der diaphysiären Fraktur mittels Plattenosteosynthese. Die Tiere entwickelten eine infizierte Pseudarthrose nach 14 Tagen.

Der erste große Unterschied zwischen dem Tiermodell von Chen et al. und diesem, welches in dieser Arbeit vorgestellt wurde zeigt sich darin, dass bei Chen et al. intraoperativ ein 6mm großer Knochensubstanzdefekt erzeugt wurde, wohingegen bei dem Tiermodell eine Osteotomie, die zu einer vollständigen Fraktur führte, ohne Defektzone gesetzt wurde.

Der zweite Unterschied besteht darin, dass bei Chen et al. lyophilisiertes bovines Typ-I Kollagen, welches in der Klinik für die Applikation des Knochenwachstumsfaktors rhBMP-7 (OP-1<sup>®</sup>, Stryker Biotech, Hopkinton, Massachusetts) verwendet wird (Friedlaender et al., 2001), implantiert wurde. Chen et al. nutzten das Typ-I Kollagen als Bakterienträger und zur Auffüllung des 6 mm großen ossären Defektes.

Dieselben Autoren untersuchten in einer weiteren Studie auf der Grundlage dieses Tiermodells die Effekte des Wachstumsfaktors rhBMP-7 auf die Frakturheilung bei infizierten Knochensubstanzdefekten (Chen et al., 2006).

Bei diesem Tiermodell wurden die Bakterien nach Osteotomie mittels eines BHI/20% glycerol Gemisches in den Frakturspalt inokuliert ohne zusätzliche Trägermaterialien.

Die Verwendung von bovinem Typ-I Kollagen schränkt die Vergleichbarkeit zur klinischen Situation stark ein, da bovines Typ-I Kollagen nicht routinemäßig bei der klinischen Frakturheilung eingesetzt wird.

Der dritte wesentliche Unterschied zeigt darin, dass bei dem Modell von Chen et al. eine Plattenosteosynthese zur Stabilisierung des 6 mm großen Knochendefektes verwendet wird. Wohingegen bei dem in dieser Studie präsentierten Tiermodell eine intramedulläre Stabilisierung durchgeführt wird.

Zusammengefasst reflektiert das Rattenmodell von Chen et al. das klinische Bild einer infizierten Defekt-pseudarthrose mit deutlichem Substanzverlust, der durch eine bakterielle Kontamination eines knöchernen Substanzdefektes mit Stabilisation durch Plattenosteosynthese herbeigeführt wird.

Daher kann dieses Tiermodell die wesentlich häufiger auftretende klinische Situation der infizierten Pseudarthrose, die sich auf dem Boden einer infizierten offenen Tibiafraktur mit intramedullärer Stabilisierung entwickelt und nicht mit einem schweren Knochensubstanzverlust einhergeht, nicht widerspiegeln.

Bonnarens und Einhorn (1993) beschrieben ein Tiermodell einer standardisierten geschlossenen Unterschenkelfraktur. Bei diesem Tiermodell wird zwar mit einer intramedullären Stabilisierung gearbeitet, allerdings dient sie dazu den Weichteilschaden bei der Frakturherstellung minimal zu halten und somit ist auch die Übertragbarkeit auf das klinische Bild einer offenen Fraktur nicht gegeben. Dieses Modell war nicht auf eine Infektion ausgelegt und hat somit keine infizierte Pseudarthrose zur Folge.

Andriole et al. (1974) führten in ihrem Tiermodell eine Osteitis herbei, indem sie eine im oberen Drittel des Tibiaschaftes gesetzte Fraktur kontaminierten. Bei einer Beobachtungszeit von 18 Monaten wurden die Effekte der bakteriellen Infektion auf die Knochenbruchheilung analysiert. Bei sämtlichen Frakturen wurde eine komplikationslose Knochenheilung beobachtet. Da bei diesem

Tiermodell - trotz bakterieller Kontamination - keine Infektion entstand, entfällt die Verwendbarkeit eines solchen Tiermodells für die Erzeugung einer infizierten Pseudarthrose.

### **4.3. Verwendetes Tiermodell**

Das in dieser Arbeit präsentierte Modell ist das erste, das zu Implantat-assoziierten infizierten Pseudarthrosen des Tibiaschafts nach intramedullären Fixierung und bakterieller Kontamination der Fraktur führt.

Mit der Verwendung einer intramedullären Stabilisierung des Tibiaschafts und *Staphylococcus aureus* für die bakterielle Kontamination des Frakturspalts mit begleitender systemischer Antibiose, ist mit diesem Tiermodell eine sehr gute Annäherung an die klinisch relevante Situation gegeben. Demzufolge gelingt eine äußerst praxisnahe Simulation der klinischen Situation bei offener Unterschenkelfraktur mit intramedullärer Stabilisierung mittels Marknagel und Kontamination des betroffenen Knochenareals mit einem *Staphylococcus aureus* Stamm.

*Staphylococcus aureus* Stämme sind bei Implantat-assoziierten Infektionen die am häufigsten nachgewiesenen Keime in der Unfallchirurgie (Wright und Nair, 2010; Schnettler et al., 2007, Atkins et al., 1998).

Dieses Tiermodell lässt eine flexible Anwendung anderer Bakterienstämme, wie z.B. Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) zu. Ebenso hat man die Möglichkeit neue Antibiotika wie Linezolid für die Prophylaxe und Therapie infizierten Pseudarthrosen zu testen.

Theoretisch hätte die osteosynthetische Stabilisierung der der Osteotomie auch per Plattenosteosynthese erfolgen können. Es existieren derzeit keine wissenschaftlichen Studien, die die Infektionsraten beider Verfahren aufzeigen und vergleichen können. Demzufolge kann die Frage, ob die Verwendung der

Plattenosteosynthese bezüglich Infektionsraten der der intramedullären Stabilisationstechnik überlegen ist, nicht endgültig beantwortet werden. Die Plattenosteosynthese ist ebenfalls ein körperfremdes Metallimplantat auf der sich eine Infektion mit Biofilmbildung etablieren kann. Dementsprechend kann die Wahrscheinlichkeit einer Ausbildung einer chronischen Osteitis in Form einer infizierten Pseudarthrose als ähnlich angesehen werden.

Bei diesem neuen Tiermodell wurde die intramedulläre osteosynthetische Versorgung der offenen Schienbeinschaftfraktur gewählt. Auf eine Plattenosteosynthese wurde gänzlich verzichtet, da in der aktuellen klinischen Praxis die Methode der intramedullären Nagelung die bevorzugte Behandlungsoption darstellt.

#### 4.4. Korrelation der Untersuchungsergebnisse

Bei den Tieren bei denen der Osteotomiespalt bakteriell kontaminiert wurde, waren in 11 von 12 Fällen klare Zeichen einer Knochen- und Weichteilinfektion, die für die Entwicklung einer infizierten Pseudarthrose sprechen zu erkennen. Bei diesen Tieren konnte man auch eindeutige radiologische Ergebnisse, die zu 100% mit den klinischen Befunden korrelieren feststellen.

Bildgebend zeigten sich ein persistierender Frakturspalt mit fehlender knöcherner Durchbauung, kortikale Osteolysen und Knochensequesterbildung als klare Anzeichen einer chronischen infizierten Pseudarthrose.

Die mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse konnten die exakte Korrelation der klinischen und radiologischen Befunde bestätigen.

Bei den Tieren, die klinisch und radiologisch Hinweise auf eine infizierte Pseudarthrose zeigten, kam es zu einem positiven Keimnachweis.

Sowohl bei den explantierten Implantaten, beim „Roll-Out-Test“, als auch bei den Anzüchtungen der Knochenproben war ein bakterielles Wachstum zu beobachten.

Somit korrelierten die mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse zu 100% mit den klinischen und röntgenologischen Resultaten.

Mit der Technik der Pulsfeld Gelelektrophorese ließ sich in allen Fällen, bei denen ein bakterielles Wachstum auf den Agarplatten zu beobachten war, den bei der Kontamination verwendeten *Staphylococcus aureus* Stamm EDCC 5055 nach 42 tägiger Beobachtungszeit nachweisen und somit eine sekundäre Kontamination der Implantate bzw. Knochenproben mit anderen Bakterienstämmen ausgeschlossen werden.

Wie bei der Auswertung der mikrobiologischen Untersuchungen, zeigte die Auswertung der histologischen Befunde eindeutige Zeichen, die für die Entwicklung einer infizierten Pseudarthrose sprechen. Bei den 10 Tieren der Kontaminationsgruppe konnte man die typischen Zeichen einer Infektpseudarthrose, wie fehlende knöcherne Durchbauung, bindegewebige Ausfüllung des Osteotomiespalts, massive kortikale Osteolyse und

Knochensequesterbildung nachweisen und auch hier die genaue Korrelation mit den bereits genannten Untersuchungsmethoden herausstellen.

Die Ergebnisse der Micro-CT-Untersuchung und der Elektronenmikroskopie unterstreichen ebenfalls die eindeutige Korrelation.

Die Elektronenmikroskopie bestätigte das Auftreten von Biofilmstrukturen und großflächig verteilten Bakterienkolonien auf den Implantatoberflächen. Das Micro-CT zeigte charakteristische knöcherne Veränderungen im Sinne einer chronischen Knocheninfektion in Form einer infizierten Pseudarthrose.

Bei den 5 Tieren bei denen man keine klinischen Hinweise auf Infektzeichen bzw. das Vorliegen einer infizierten Pseudarthrose aufzeigen konnte, gelang kein Nachweis von bakteriellem Kulturwachstum oder Implantat-assoziiierter Biofilmbildung. Auch mittels Röntgenaufnahmen bestätigte sich die komplikationslose knöcherne Heilung der Fraktur, ohne Hinweis auf Infektionszeichen. Alle weiteren Untersuchungsmethoden bestätigten die Abwesenheit jeglicher entzündlicher Prozesse und die stabile Durchbauung der Fraktur.

Die entstehende Infektion betraf den Unterschenkel des Tieres und führt zu keinen systemischen Komplikationen.

Insgesamt lässt sich mit diesem Tiermodell zuverlässig die Ausbildung einer Infekt-pseudarthrose der Tibia induzieren.

Die exakte Korrelation der durchgeführten Untersuchungsmethoden zeigt, dass diesem neu erprobten Tiermodell eine hohe Reliabilität bezüglich der Erzeugung der chronischen Osteitis attestiert werden kann, die sowohl die Infektetablierung, als auch die ungestörte Frakturheilung bei Infektfreiheit betrifft und unterstreichen dessen Eignung und Nutzen für weiterführende Studien.

Folglich empfiehlt sich dieses Tiermodell für das Testen von antibiotikabeschichteten Implantaten, Wachstumsfaktoren, neuen Antibiotika und alternativen Therapieoptionen im Rahmen der Prophylaxe von offenen Frakturen bzw. infizierten Pseudarthrosen.

#### 4.5. Diskussion der FISH-Technik

Im Rahmen der durchgeführten Studie wurde aufgezeigt, dass die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Detektion von Bakterien bei Implantat-assoziierten Osteitis geeignet ist und zur Verbesserung der Diagnosefindung bei Knocheninfektionen beitragen kann.

Bisher wurde diese Untersuchungsmethode hauptsächlich zum Nachweis von Bakterien im Weichteilgewebe der Mundhöhle, der Keimflora des Gastrointestinaltraktes und des Respirationstraktes erprobt.

Krimmer et al. zeigten (1999) in einer Studie, dass der Nachweis von *Staphylococcus epidermidis* Kolonien im Weichteilgewebe von Patienten, bei denen der Verdacht auf eine Hüftprotheseninfektion bestand, möglich ist.

Aktuell ist in der Literatur keine Studie, die die Anwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung für den Nachweis von Bakterien im Knochengewebe, im Rahmen von Implantat-assoziierten ossären Infektionen, beschreibt.

Diese Technik bringt den Vorteil, dass hiermit eine wertvolle weitere diagnostische Methode die bereits bestehenden Untersuchungstechniken zur besseren Diagnosefindung der chronischen Osteitis ergänzen kann. Mit der FISH-Technik können Bakterienkulturen, die entweder eine sehr lange Kultivierungszeit brauchen, bzw. die sich nur auf anspruchsvollen Nährmedien kultivieren lassen bis sie identifiziert werden können, oder bei denen eine Anzüchtung nicht möglich ist, detektiert werden.

Im Rahmen der Diagnose von Knocheninfektionen spielen diese Keime eine erhebliche Rolle. Zu einem erheblichen Prozentsatz der Fälle sind diese Bakterienkulturen der Grund weshalb trotz eindeutiger klinischer Infektzeichen kein Keimnachweis gelingt (Moter und Gobel, 2000).

Darüber hinaus gelingt mittels FISH-Technik die Visualisierung von intrazellulär persistierenden Bakterien. Es ist bekannt, dass kleine Kolonien von *Staphylococcus aureus* dazu befähigt sind, sich innerhalb von Endothelzellen festsetzen und so ihr Überleben und ihre Vermehrung sichern. *Staphylococcus aureus* ist ebenfalls in der Lage in Osteoblasten einzudringen. Auch *Staphylococcus epidermidis* Kolonien sind in der Lage in Osteoblasten zu

persistieren und sich sogar darin zu vermehren (Wright und Nair, 2010). Diese Keime stellen einen wichtigen Auslöser für die Aufrechterhaltung des Infektionsgeschehens innerhalb des Knochens dar und sind mit den gängigen Methoden zur Diagnosefindung nur schwer nachzuweisen.

Durch die Darstellung dieser intrazellulären Keime könnte die FISH-Technik für die Diagnosefindung der chronischen Osteitis einen wichtigen Beitrag leisten.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines neuen Tier-Infektionsmodells zur Induktion einer Implantat-assoziierten chronischen Osteitis in Form einer infizierten Pseudarthrose. Dies beinhaltete die Beantwortung der Frage, ob in Kombination einer Osteotomie mit einer bakteriellen Kontamination mit *Staphylococcus aureus* eine infizierte Pseudarthrose an der Rattentibia zuverlässig erzeugt werden kann und ob im Falle einer Knocheninfektion die Bakterien mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Knochen nachgewiesen werden können.

Bei diesem neuen Tiermodell wurde an der Rattentibia mit einer oszillierenden Säge eine Osteotomie auf Höhe des mittleren Schaftes durchgeführt. Die Fraktur wurde bakteriell kontaminiert und mit einem intramedullären Implantat osteosynthetisch versorgt.

Dabei wurde im Rahmen einer Pilotstudie eine Keimmenge von  $10^4$  KBE des *Staphylococcus aureus*-Stammes EDCC 5055 als Inokulationsdosis für die Hauptstudie gewählt.

In der Hauptstudie zeigten sich bei den Tieren der Kontaminationsgruppe nach einer Beobachtungsdauer von 6 Wochen eindeutige klinische, radiologische und histologische Zeichen einer infizierten Pseudarthrose ohne systemische Komplikationen. Dabei zeigte sich der Nachweis von Bakterien sowohl bei den Knochenbiopsien als auch auf dem intramedullären Implantat. Durch Rasterelektronenmikroskopie konnte bei den Tieren mit Infektion bakterieller Biofilm auf den Implantaten nachgewiesen werden. Mittels Durchführung einer Pulsfeld-Gelelektrophorese konnte in allen Fällen bei Infektion den initial inokulierten *Staphylococcus aureus* EDCC 5055 Stamm als Infekt-auslösender Keim nachgewiesen und somit eine Kontamination ausgeschlossen werden. Durch beide FISH-Sonden konnte bei den Tieren mit ausbleibender Frakturheilung Bakterien direkt in den Knochentrabekeln als Hinweis auf eine Osteitis detektiert werden.

Bei den Tieren der Kontrollgruppe kam es zu einer vollständigen, komplikationslosen Knochenbruchheilung, ohne Hinweise auf eine Infektion.

Es fand sich eine ausgezeichnete Korrelation der Ergebnisse der klinischen, radiologischen und histologischen Untersuchungen verglichen mit den mikrobiologischen Resultaten. Diese exakte Korrelation wurde durch die Resultate der FISH-Technik, Elektronenmikroskopie und Micro-CT ebenfalls bestätigt.

Dieses Modell kann zukünftig bei der Testung von antimikrobiell beschichteten Implantaten oder lokaler bzw. systemischer Antibiotika verwendet werden. Die FISH-Methodik stellt eine neue Methodik bei der Diagnostik von Knochen- bzw. Implantat-assoziierten Infektionen dar, die zukünftig auch klinisch genutzt werden kann.

## 6. Summary

There is no adequate animal model to mimic the difficult clinical situation of infected nonunion of the tibia after intramedullary stabilization. The purpose was to establish an animal model of implant-related infected non-unions of the tibia in rats. Furthermore, it was evaluated if detection of bacteria by fluorescent in situ hybridization (FISH) technique is possible in bone infection.

17 rats were used in which osteotomy of the midshaft tibia was performed and stabilized with an intramedullary device. Two groups were tested: group 1: contamination of the osteotomy site with  $10^4$  colony forming units (CFUs) of *Staphylococcus aureus* (11 animals), group 2: no bacterial contamination (6 animals).

The animals were sacrificed after 42 days and bone healing and infection were assessed clinically, by X-ray, micro-CT, and microbiological methods including FISH technique using *EUB* and *STAPHY* probes. Histology and scanning electron microscopy (SEM) for biofilm formation were performed.

All animals of the control group showed uneventful bone healing after 6 weeks without any signs of local infections. 10 of 11 (90.9%) animals of group 1 with bacterial contamination exhibited infected non-union formation with positive clinical, radiological and microbiological infection signs of the tibia but without any systemic infection signs. FISH technique was able to identify bacteria in the infected bone. All intramedullary implants from the infected animals showed positive biofilm formation in SEM.

This work presents the first animal model for the induction of intramedullary device-related infected non-union in the tibia and detection of bacteria by FISH technique in infected bone.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adler CP. Knochenkrankheiten Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts. Thieme, Stuttgart, New York, S. 101-127, 1983.
2. Alt V, Bitschnau A, Osterling J, Sewing A, Meyer C, Kraus R, Meissner SA, Wenisch S, Domann E, Schnettler R. The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials* 2006b; 27: 4627-4634.
3. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* 1999; 22: 434-444.
4. An YH, Kang QK, Arciola CR. Animal models of osteomyelitis. *Int J Artif Organs* 2006; 29: 407-420.
5. Andriole VT, Nagel DA, Southwick WO. A paradigm for human chronic osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am* 1973; 55: 1511-1515.
6. Andriole VT, Nagel DA, Southwick WO. Chronic staphylococcal osteomyelitis: an experimental model. *Yale J Biol Med* 1974; 47: 33-39.
7. Atkins B, Athanasou N, Deeks J, Crook D, Simpson H, Peto T, McLardySmith P, Berendt A, the Osiris Collaborative Study Group. Prospective Evaluation of Criteria for Microbiological Diagnosis of Prosthetic-Joint Infection at Revision Arthroplasty. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36: 2932-2939.
8. Becker K. Diagnostik von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämmen Teil 1. *Mikrobiologie* 2004; 14: 7-18.
9. Bentley RW, Harland NM, Leigh JA, Collins MD. A *Staphylococcus aureus*-specific oligonucleotide probe derived from 16S rRNA gene sequences. *Lett Appl Microbiol* 1993; 16: 203-206.

10. Berendt AR, McLardy-Smith P. Prosthetic Joint Infection. *Curr Infect Dis Rep* 1999; 1: 267-272.
11. Bhandari M, Guyatt GH, Tond D, Alili A, Shaugnessy SG. Reamed versus nonreamed intramedullary nailing of lower extremity long bone fractures: A systematic overview and meta-analysis. *J Orthop Trauma* 2000; 14: 2-9.
12. Böhm E, Könn G. Zur Morphologie der posttraumatischen Osteomyelitis. *Unfallheilkunde* 1976; 79: 127-132.
13. Böhm E. Chronische posttraumatische Osteomyelitis. Morphologie und Pathogenese. *Hefte Unfallheilkunde* 1986; 176: 1-109.
14. Bohndorf KH, Imhof H, Fischer W. Knochen- und Weichteilentzündungen. In: *Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke*. Thieme, Stuttgart. S.144-158, 2006.
15. Bonatus T, Olson SA, Lee S, Chapman MW. Nonreamed locking intramedullary nailing for open fractures of the tibia. *Clin Orthop* 1997; 339: 58-64.
16. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 1984; 2: 97-101.
17. Breithaupt H. Orale und parenterale Antibiotikatherapie. In: *Schnettler R, Steinau U. Septische Knochenchirurgie*. Thieme, Stuttgart. S. 76-81, 2004.
18. Brighton C, Pollack S. Treatment of nonunion tibia with capacitively coupled electrical field. *J Trauma* 1984; 24:153-155.
19. British Orthopaedic Association and British Association of Plastic Surgeons. The management of open tibial fractures. *Br J Plast Surg* 1997; 50: 570-583.
20. Carsenti-Etesse H, Doyon F, Desplaces N, Gagey O, tancrede C, Pradier C, Dunais B, Bellamonica P. Epidemiology of bacterial infection during management of open leg fractures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 312-323.

21. Caudle RJ, Stern PJ. Severe open fractures of the tibia. *J Bone Joint Surg Am* 1987; 69: 801-807.
22. Chen X, Schmidt AH, Tsukayama DT, Bourgeault CA, Lew WD. Recombinant human osteogenic protein-1 induces bone formation in a chronically infected, internally stabilized segmental defect in the rat femur. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88: 1510-1523.
23. Chen X, Tsukayama DT, Kidder LS, Bourgeault CA, Schmidt AH, Lew WD. Characterization of a chronic infection in an internally-stabilized segmental defect in the rat femur. *J Orthop Res* 2005; 23: 816-823.
24. Ciampolini J, Harding KG. Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? *Postgrad Med J* 2000; 76: 479-483.
25. Cierny G, III, Mader JT, Pennick J. A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Contemp. Orthop* 1985; 10: 17-37.
26. Claes L, Maurer-Klein N, Henke T, Gerngross H, Melnyk M, Augat P. Moderate soft tissue damage delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J Orthop Res* 2006; 24: 1178-1185.
27. Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of devicerelated orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res* 2005; 437: 7–11.
28. Costerton JW, Stewart PS, Grennberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
29. Court-Brown CM, Christie J, McQueen MM. Closed intramedullary tibial nailing. Its use in closed and type I open fractures. *J Bone Joint Surg Br* 1990; 72: 605-611.
30. Court-Brown CM, McQueen MM, Quaba AA, Christie J. Locked intramedullary nailing of open tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 1991; 73: 959-964.
31. Court-Brown CM. Reamed intramedullary tibial nailing: an overview and analysis of 1.106 cases. *J Orthop Trauma* 2004; 18: 96-101.
32. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 2004; 350: 1422–1429.

33. Dewhirst FE. N-Acetyl muramyl dipeptide stimulation of bone resorption in tissue culture. *Infect Immunol* 1982; 35: 133-137.
34. Diefenbeck M, Hofmann GO. Durch Mark und Bein: Diagnostik und Therapie der chronischen Osteitis. *Orthop Rheuma* 2003; 6: 20-22.
35. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982; 11: 318-326.
36. Donlan, RM. Biofilms. microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2000; 8: 881-890.
37. Edwards CC, Simmons SC, Browner BD, Weigel MC. Severe open tibial fractures. Results treating 202 injuries with external fixation. *Clin Orthop* 1988; 230: 98–115.
38. Ekkernkamp A, Muhr G., Joten Ch. Die infizierte Pseudarthrose. *Unfallchirurg* 1996; 99: 914-924.
39. Elek SD, Conen PE. The virulence of *Staphylococcus pyogenes* for man. A study of the problems of wound infection. *Br J Exp Pathol* 1957; 38: 573-586.
40. Emslie KR, Nade S. Acute hematogenous staphylococcal osteomyelitis: A description of the natural history in an avian model. *Am. J. Physiol* 1983; 110: 333-345.
41. Fischer B, Vaudaux P, Magnin M. Novel animal model for studying the molecular mechanisms of bacterial adhesion to bone-implanted metallic devices: Role of fibronectin in *Staphylococcus aureus* adhesion. *J Orthop. Res* 1996; 14: 914-920.
42. Forsberg JA, Potter BK, Cierny G, III, Webb L. Diagnosis and management of chronic infection. *J Am Acad Orthop Surg* 2011; 19: 8-19.
43. Friedlaender G.E. Osteogenic protein-1 in treatment of tibial non-unions. Current status. *Surg Technol Int* 2004; 13: 249-252.
44. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S. Osteogenic protein-1 (bone

- morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial non-unions. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A: 151-158.
45. Fuchs BM, Wallner G, Beisker W, Schwippl I, Ludwig W, Amann R. Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4973-4982.
46. Gold RH, Hawkins RA, Katz RD. Bacterial osteomyelitis: Findings on plain radiography, CT, MRI, and scintigraphy. *AJR Am J Roentgenol* 1991; 157: 365-370.
47. Goulet JA, Bray TJ. Complex acetabular fractures. *Clin Orthop Relat Res* 1989; 240: 9-20.
48. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, by the BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) Study Group. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures. A prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surgery Am* 2002; 84-A: 2123-2134.
49. Gristina AG, Naylor PT, Webb LX. Molecular mechanisms in musculoskeletal sepsis: The race for surface. *Instructional Course Lecture* 1990; 39: 471-482.
50. Gristina AG. Biomaterial-centered infection; microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987; 237: 1588-1595.
51. Gustilo RB, Anderson JT. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones. *J Bone Joint Surg* 1976; 58-A: 453-458.
52. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the Management of typ III (severe) open fractures: A new classification of typ III open fractures. *J Trauma* 1984; 24: 742-746.
53. Gustilo RB, Merkow RL, Templeman D. The management of open fractures. *J Bone Joint Surg Am* 1990; 72: 299-304.

54. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF. Acceleration of Tibial Fracture Healing by Non-invasive, Low-intensity Pulsed Ultrasound. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 26-34.
55. Heppenstall RB, Brighton CT, Esterhai JL, Muller G. Prognostic factors in non-union of the tibia: an evaluation of 185 cases treated with constant direct current. *J Trauma* 1984; 24:790–795.
56. Heppert V, Wagner C, Glatzel U, Wentzensen A. Prinzipien der operativ-chirurgischen Therapie der Osteitis. *Trauma und Berufskrankheit* 2002; 4: 321-328.
57. Hofmann GO, Bär T, Bühren V. Osteosyntheseimplantat und früher postoperativer Infekt: Sanierung mit oder ohne Materialentfernung? 1997; *Chirurg* 68: 1175-1180.
58. Hofmann GO. Akute postoperative Osteitis. In: Gunther O. Hofmann. *Infektionen der Knochen und Gelenke in Traumatologie und Orthopädie*. Urban&Fischer, München/Jena. S. 45-58, 2004a.
59. Hofmann GO. Chronische Osteitis. In: Gunther O. Hofmann. *Infektionen der Knochen und Gelenke in Traumatologie und Orthopädie*. Urban&Fischer, München/Jena. S 59-83, 2004b.
60. Hofmann GO. Pathophysiologische Grundlagen. In: Gunther O. Hofmann. *Infektionen der Knochen und Gelenke in Traumatologie und Orthopädie*. Urban&Fischer, München/Jena. S. 9-22, 2004c.
61. Holtom P, Smith AM. Introduction to Adult Posttraumatic Osteomyelitis of the Tibia. *Clin Orthop* 1999; 360: 6-13.
62. Hudson JW. Osteomyelitis of the jaws: A 50-year perspective. *J Oral Maxillofac Surg* 1993; 51: 1294-1301.
63. Ishimi YC, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J. Immunol* 1990; 145: 3297-3303.

64. Khouri RK, Shaw WW. Reconstruction of the lower extremity with microvascular free flaps: A 10 year experience with 304 consecutive cases. *J Trauma* 1989; 29: 1086-1094.
65. Kinzl L, Suger G. Infizierte Pseudarthrose. *Der Orthopäde* 1996; 25: 478-483.
66. Klemm K. Antibiotic bead chains. *Clin. Orthop* 1993; 295: 63-76.
67. Klemm K. Gentamicin-PMMA-beads in treating bone and soft tissue infections. *Zentralbl Chir* 1979; 104: 934-942.
68. Klemm K, Schnettler R. The use of gentamicin-PMMA-chains in the treatment of infected tibial nonunion. *Acta Orthop Belg* 1992; 58: 222-226.
69. Klosterhalfen B, Peters KM, Töns C, Hauptmann S, Klein CL, Kirkpatrick CJ. Local and Systemic Inflammatory Mediator Release in Patients with acute and chronic posttraumatic Osteomyelitis. *J Trauma* 1996; 40: 372-378.
70. Krettek C. Fraktur und Weichteilschaden. *Chirurg* 1998; 69: 684-700.
71. Krimmer V, Merkert H, von Eiff C, Frosch M, Eulert J, Lohr JF, Hacker J, Ziebuhr W. Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2667-2673.
72. Krötz M, Linsenmeier U, Reiser M. Diagnostik der Osteitis. In: Schnettler R, Steinau U. *Septische Knochenchirurgie*. Thieme, Stuttgart. S. 15-74, 2004.
73. Lazzarini L, Mader JT, Calhoun JH. Osteomyelitis in Long Bones. *Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 2004; 86: 2305-2318.
74. Lew DP, Waldvogel FA. Current Concepts: Osteomyelitis. *N Engl J Med* 1997; 336: 999-1007.
75. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004; 364: 369-379.
76. Linhardt F, Ziebuhr W, Meyer P, Witte W, Hacker J. Pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments as a tool for the

- epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. FEMS Microbiol Lett 1992; 74: 181-185.
77. Lipsky BA, Berendt AR. XVI Osteomyelitis. American College of Physicians Medicine Inf Dis 2010; 7: 1-20.
78. Littenberg B, Weinstein LP, Mc Carren M, Mead T, Swiontkowski MF, Rudicel SA, Heck D. Closed fractures of the tibial shaft. A meta-analysis of three methods of treatment. J Bone Joint Surg Am 1998; 80: 174-183.
79. Lortat-Jacob A, Sutour JM, Beaufile P. Infection following centro-medullary nailing of diaphyseal femoral and tibial fractures. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot 1986; 72: 485-494.
80. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP, Raschke M. A new model of implant-related osteomyelitis in rats. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2003; 67: 593-602.
81. Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Schiller R, Stemberger A, Raschke M, Haas MP, Schmidmaier G. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. Bone 2005; 36: 770-778.
82. Mader JT, Shirtliff M, Calhoun JH. Staging and staging application in osteomyelitis. Clin Infect Dis 1997; 25: 1303-1309.
83. Malik MH, Harwood P, Diggle P, Khan SA. Factors affecting rates of infection and nonunion in intramedullary nailing. J Bone Joint Surg Br 2004; 86-B: 556-560.
84. Kirschner MH, Diefenbeck M, Leichtenschlag A, Schwietz M. Operatives Management in der septischen Chirurgie. In: Gunther O. Hofmann. Infektionen der Knochen und Gelenke in Traumatologie und Orthopädie. Urban&Fischer, München/Jena. S. 191-203, 2004.
85. Melcher GA, Metzendorf A, Schlegel U, Ziegler WJ, Perren SM, Printzen G. Influence of reaming versus nonreaming in intramedullary nailing on local infection rate: experimental investigation in rabbits. J Trauma 1995; 39: 1123-1128.

86. Moter A, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 2000; 41: 85-112.
87. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanism and misconceptions. *Infect Immun* 1996; 64: 2371-2380.
88. Norden CW, Kennedy E. Experimental osteomyelitis. A description of the model *J Infect Dis* 1970; 122: 410-418.
89. Notzli HP, Swiontkowski MF, Thaxter ST. Laser doppler flowmetry for bone blood flow measurements: helium neon laser light attenuation and depth of perfusion assessment. *J orthop Res* 1989; 7: 413-424.
90. O'Gara JP, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol* 2001; 50: 582-587.
91. O'May GA, Brady RA, Prabhakara R, Leid JG, Calhoun JH, Shirtliff ME. Osteomyelitis. *Biofilm Infections* 2011; S. 111-137.
92. Ostermann PA, Henry SL, Seligson D. *Langenbecks Arch Chir* 1993; 378: 32-36.
93. Ostermann PA, Seligson D, Henry SL. Local antibiotic therapy for severe open fractures. A review of 1085 consecutive cases. *J Bone-Joint-Surg* 1995; 77: 93-97.
94. Peters G, Locci G. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 1982; 146: 479-482.
95. Peters KM, Adam G, Biedermann M, Zilkens KW, Gunther R. Osteomyelitis heute - bildgebende Diagnostik und Therapie. *Zentralbl Chir* 1993; 118: 637-645.
96. Riemer BL, DiChristina DG, Cooper A, Sagiv S, Butterfield SL, Burke CJ, III, Lucke JF, Schlosser JD. Nonreamed nailing of tibial diaphyseal fractures in blunt polytrauma patients. *J Orthop Trauma* 1995; 9: 66-75.
97. Rommens PM, Broos PL. The significance of soft tissue trauma for fracture healing. A prospective study on 70 tibial shaft fractures

- following primary treatment with the Monofixateur. Unfallchirurg 1992; 95: 133-41.
98. Rompe JD, Eysel P, Hopf C, Vogel J, Küllmer K. Extrakorporale Stoßwellenapplikation bei gestörter Knochenheilung – eine kritische Bestandsaufnahme. Unfallchirurg 1997; 100: 845-849.
99. Rüedi T, Gumpfenberg S, Werber KD. Unfallheilkunde. In: Siewert Chirurgie. Springer, München. S. 872, 1997.
100. Sanders R, Jersinovich I, Anglen J, DiPasquale T, Herscovici D Jr. The treatment of open tibial shaft fractures using an interlocked intramedullary nail without reaming. J Orthop Trauma 1994; 8: 504-510.
101. Scheuringer M, Wildner M, Götte S, Dreinhöfer KE. Stationäre Inanspruchnahme bei muskuloskelettalen Erkrankungen und Verletzungen: Vorausberechnung für Deutschland bis zum Jahr 2010. Z Orthop 2005; 143: 509-551.
102. Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. Injury 2006; 37: 105-112.
103. Schmidt HG, Tiemann AH, Braunschweig R, Diefenbeck M, Bühler M, Abitzsch D, Haustedt N, Walter G, Schoop R, Heppert V, Hofmann GO, Glombitza M, Grimme C, Gerlach UJ, Flesch I. Arbeitsgemeinschaft septische Chirurgie der DGOUC10. Definition of the Diagnosis Osteomyelitis-Osteomyelitis Diagnosis Score (ODS). Z Orthop Unfall. 2011; 149: 449-460.
104. Schnettler R, Alt V. Pathophysiologie und Klassifikation der Osteitis. In: Schnettler R, Steinau U. Septische Knochenchirurgie. Thieme, Stuttgart, S. 5-14, 2004.
105. Schnettler R, Lieser H, Klemm K. Chirurgische Behandlung der posttraumatischen und chronischen Osteomyelitis. Aktuelle Chirurgie 1997; 32: 18-22.

106. Schnettler R. Chirurgische Behandlung der Osteitis. In: Schnettler R, Steinau U. Septische Knochenchirurgie. Thieme, Stuttgart. S. 95-127, 2004.
107. Schoellner C, Rompe JD, Decking J, Heine J. Die hochenergetische extra-korporale Stoßwellentherapie (ESWT) bei Pseudarthrose. Orthopäde 2002; 31: 658-662.
108. Schultheis KH, Ecke H. Osteomyelitis. Ätiologie, Diagnostik, Therapie. In: Schultheis KH, Rehm KE, Ecke H: Chirurgische Infektionen von Knochen, Gelenken und Weichteilen. De Gruyter, Berlin, New York. S. 15-28, 1991.
109. Schwameis E, Abdlvahab F, Wurnig C. Osteomyelitis. Clinical aspects, diagnosis and therapy. Radiologe 1996; 36: 823-833.
110. Schwarzkopf A, Cuny C, Witte W. Bestimmung der Fragmentmuster der genomischen DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese bei *Staphylococcus aureus*. Bundesgesundheitsblatt 1995; 6: 215-219.
111. Seligson D, Klemm K. Adult posttraumatic osteomyelitis of the tibial diaphysis of the tibial shaft. Clin Orthop 1999; 360: 30-36.
112. Seybold D, Schildhauer TA. Schildhauer Knocheninfekte. In: Ruchholtz S, Wirtz DC. Orthopädie und Unfallchirurgie. Thieme, Stuttgart. S. 94, 2010.
113. Smektala R, Wenning M, Ekkernkamp A. Schenkelhalsfraktur: Analyse der Ergebnisse externer Qualitätssicherung. Ein Bericht über 22556 Patienten. Chirurg 1999; 70: 1330-1339.
114. Southwood RT, Rice JL, McDonald PJ, Hakendorf PH, Rozenblids MA. Infection in experimental hip arthroplasties. J. Joint Surg 1985; 67-B: 671-677.
115. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM. Synergistic interactions between interleukin-1, tumor necrosis factor and lymphotoxin in bone resorption. J Immunol 1987; 138: 1464-1468.

116. Strauß A. Lokaler Antibiotikumträger aus Kalziumsulfat-Verträglichkeit im Gewebe und Pharmakokinetik der angewendeten Antibiotika nach Implantation in Kaninchen. Köhler, Gießen, S. 22-23 und S. 90, 1999.
117. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select an interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. *Infection Control and hospital epidemiology* 1997; 18: 426-439.
118. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greenleaf JF, Patel R. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 2007; 357: 654-663.
119. Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury* 2006; 37: 59–66.
120. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly* 2005; 135: 243–251.
121. Tscherne H, Oestern HJ. Die Klassifizierung des Weichteilschadens bei offenen und geschlossenen Frakturen. *Unfallheilkunde* 1982; 85: 111-115.
122. Tsukayama DT. Pathophysiology of posttraumatic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 1999; 360: 22-29.
123. Tucker KA, Reilly SS, Leslie CS, Hudson MC. Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 186: 151-156.
124. Tunney MM, Patrick S, Curran MD, Ramage G, Hanna D, Nixon JR, Gorman SP, Davis RI, Anderson N. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3281-3290.
125. van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J, Goering R, Tenover F, Steward C, O'Brian F, Grubb W, Tassios P, Legakis N, Morvan A, Solh N, de Ryck R, Struelens M,

- Salmenlinna S, Vuopio-Vakila J, Kooistra M, Talens A, Witte W, Verbrugh H. Assessment of Resolution and Intercenter Reproducibility of Results of Genotyping *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Small Macrorestriction Fragments: A Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36: 1653-1659.
126. Walter G, Kemmerer M, Kappler C, Hoffmann R. Treatment algorithms for chronic osteomyelitis. *Deutsches Ärzteblatt* 2012; 109: 257–264.
127. Wheat J. Diagnostic Strategies in Osteomyelitis. *The American Journal of Medicine* 1985; 78: 218-224.
128. Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 193-204.
129. Wunsch PH, Woltmann A. Knocheninfektion. Pathologische Abläufe. In: Schultheis K.H., Rehm K.E., Ecke H. *Chirurgische Infektionen von Knochen, Gelenken und Weichteilen*. De Gruyter, Berlin, New York. S. 1-7, 1991.
130. Zimmerli W, Fluckiger U. Verlaufsformen und Mikrobiologie der bakteriellen Osteomyelitis. *Orthopäde* 2004; 33: 267–272.

## **8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis**

### **8.1. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verteilung offener Schienbeinfrakturen in Deutschland pro Jahr	5
Tabelle 2: Pilotstudiendesign und Anzahl der Tiere für die Pilotstudie	42
Tabelle 3: Hauptstudiendesign und Anzahl der Tiere für die Hauptstudie	43
Tabelle 4: Ergebnisse der Pilotstudie	65
Tabelle 5: Klinische Ergebnisse der Hauptstudie	67

---

## 8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Offene Tibiafraktur Grad I	3
Abbildung 2: Offene Tibiafraktur Grad II	3
Abbildung 3: Offene Tibiafraktur Grad IIIA	3
Abbildung 4: Offene Tibiafraktur Grad IIIB	4
Abbildung 5: Offene Tibiafraktur Grad IIIC	4
Abbildung 6: Intraoperative Materialgewinnung	16
Abbildung 7: Histologie der chronischen Osteitis	25
Abbildung 8: Histologie eines Knochensequesters mit bakterieller Besiedlung	25
Abbildung 9: Histologie eines bakteriellen Biofilms	25
Abbildung 10: Spiral Bacterial Plater	45
Abbildung 11: Ratte nach Narkoseeinleitung und Desinfektion	47
Abbildung 12: Schaffung steriler Bedingungen präoperativ	47
Abbildung 13: Darstellung der freigelegten Tibia nach Hautinzision	48
Abbildung 14: Schaffung eines Zugangs zum Markskanal	48
Abbildung 15: Einbringen des Implantats	49
Abbildung 16: Durchführung der Osteotomie	49
Abbildung 17: Inokulation der Bakterien	50
Abbildung 18: Postoperative Wundstabilisierung mittels Hautklammern	51
Abbildung 19: Postoperative Röntgenkontrolle nach K-Draht Implantation	52
Abbildung 20: Röntgenuntersuchung vor Explantation der Tibia	55
Abbildung 21: Explantation der Tibia	56
Abbildung 22: Gespaltene Tibia nach Entfernung des K-Drahtes	57
Abbildung 23: Technik zum Bakteriennachweis in den Knochenproben	59

---

Abbildung 24: Micro-CT Gerät mit PC-Station	63
Abbildung 25: Gewichtsentwicklung in der Hauptstudie	68
Abbildung 26: Klinische Ergebnisse der Hauptstudie	70
Abbildung 27: Fisteleiterung bei einer Ratte der Kontaminationsgruppe	70
Abbildung 28: Infektion des Weichteilmantels bei einem infizierten Tier	71
Abbildung 29: Fehlende knöcherne Konsolidierung als Zeichen der infizierten Pseudarthrose bei einer Ratte der Kontaminationsgruppe	71
Abbildung 30: Stabile knöcherne Durchbauung eines Unterschenkels ohne Infektion	72
Abbildung 31: Röntgenologische Ergebnisse der Hauptstudie	73
Abbildung 32: Agarplatteninkubation und Bandenmuster der Pulsfeld- Gelelektrophorese	75
Abbildung 33: Histologische Ergebnisse der Hauptstudie	76
Abbildung 34: Histologische Ergebnisse der Hauptstudie	77
Abbildung 35a: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Biofilmstrukturen auf der Implantatoberfläche	79
Abbildung 35b: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Bakterienkolonien in einer Biofilmmatrix	80
Abbildung 36: Ergebnisse der FISH-Technik der Hauptstudie	81
Abbildung 37: Ergebnisse der Micro-CT Untersuchung der Hauptstudie	83

## 9. Publikation

Alt V, Lips K, Henkenberens C, Muhrer D, Cavalcanti-Garcia M, Sommer U, Thormann U, Szalay G, Heiss C, Pavlidis T, Domann E, Schnettler R. A new animal model for implant-related infected non-unions after intramedullary fixation of the tibia in rats with fluoresce in situ hybridisation of bacteria in bone infection. *Bone* 2011; 48: 1146-1153

## 10. Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

## 11. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. biol. hom. Volker Alt für die vorbildliche Betreuung sehr herzlich bedanken.

Ich bin ihm außerordentlich dankbar für seine ständige Ansprechbarkeit und Bereitschaft zu wertvollen und motivierenden Gesprächen. Die Hilfestellungen und wissenschaftlichen Denkanstöße, haben in wesentlichem Maße zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen und mein Interesse für wissenschaftliches Arbeiten gefestigt.

Bei Herrn Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. med. Dr. h.c. Dr. med. vet. Reinhard Schnettler bedanke ich mich sehr herzlich für die Überlassung des Themas.

Ich möchte ebenfalls allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie in Gießen für die vielfältige Unterstützung danken. Hierbei bin ich besonders Prof. Dr. rer. nat. Katrin Lips dankbar für die investierte Zeit und Unterstützung.

Weiterhin möchte ich Frau Hild für ihre großzügige Hilfe bei der Bewältigung meiner Laborarbeiten danken.

Es ist mir auch sehr wichtig den Ärzten, Tierpflegern und Helfern der Tierklinik Bad Langensalza, die die Durchführung dieser Studie erst ermöglicht haben ein herzliches Dankeschön auszusprechen.

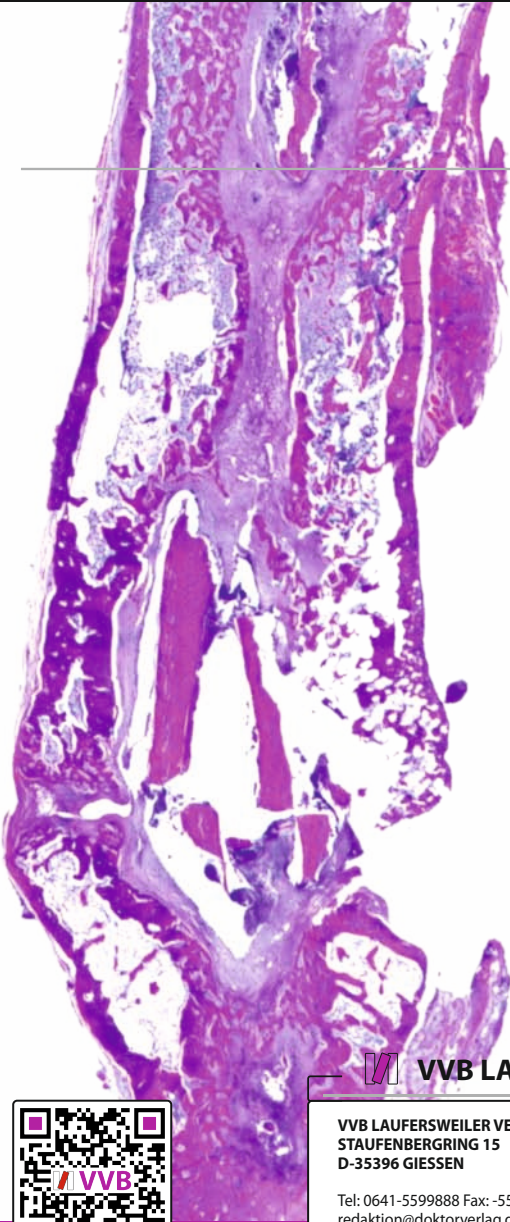
Auf diesem Wege möchte ich meinem Mitdoktoranden Christoph Henkenberens meine Dankbarkeit aussprechen. Seine zuverlässige Mithilfe und Dokumentationsarbeit haben mir den Einstieg in dieses Projekt erleichtert.

Ein besonderer Dank gilt Eugen Ruff, der mir bei sämtlichen Fragen und Problemen bezüglich Formatierung und Textverarbeitung beratend zur Seite stand.

Abschließend ist es mir besonders wichtig meinen Eltern zu danken. Ihre unermüdliche und liebevolle Unterstützung hat mir den erfolgreichen Abschluss des Studiums und der Promotion erst ermöglicht.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6088-6

