

# **Mikrobiell-metagenomische Analysen explantierter Osteosynthesematerialien mittels PCR/DHPLC und Kultur**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Judith Johanna Schrewe**

aus Schwetzingen

Gießen 2012

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Direktor: Prof. Dr. Trinad Chakraborty

**Gutachter:** Prof. Dr. Eugen Domann

**Gutachter:** Prof. Dr. Dr. R. Schnettler

**Tag der Disputation:** 28. Juni 2012



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Historische Entwicklung der Osteosynthese	1
1.2	Osteosynthesen und damit assoziierte Infektionen	2
1.3	Diagnostik Implantat-assoziiertes Infektionen	4
1.4	Probleme der Diagnostik Implantat-assoziiertes Infektionen	5
1.5	Neue Ansätze in der <i>in-vitro</i> -Diagnostik Implantat-assoziiertes Infektionen	6
1.6	Zielsetzung	7
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1	Patienten und Probanden	9
2.2	Chemikalien und Geräte	9
2.2.1	Chemikalien und Materialien	9
2.2.2	Geräte	10
2.3	Kulturmedien	11
2.4	Hard- und Software	13
2.5	Methoden	14
2.5.1	Probengewinnung	15
2.5.2	Verarbeitung nach Probeneingang	15
2.5.2.1	Bürstenmethode	15
2.5.2.2	Ultraschallbad	17
2.5.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	18
2.5.3.1	Thermocycler	19
2.5.3.2	Piko® Thermal Cycler	20
2.5.4	Weiterverarbeitung bei positiver Kultur	20
2.5.5	Unterscheidung verschiedener Staphylokokkenspezies	21
2.5.6	Antibiotika-Resistenztestung	21
2.5.7	Biofilm-Assay	22
2.5.8	Biofilm-Assay auf metallenen Oberflächen	23
2.5.9	Untersuchung auf Mischinfektionen mittels PCR/DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)	23
2.5.10	Ermittlung der Standardkurve für Piko® PCR / DHPLC	24

2.5.11	DNA-Sequenzierung	25
2.5.12	Bioinformatische Analyse	25
2.5.13	Bestimmung der Entzündungsparameter	26
2.5.13.1	CRP	26
2.5.13.2	Leukozyten	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Patienten</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Untersuchtes Osteosynthesematerial</b>	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Mikrobiota der Implantate</b>	<b>29</b>
3.3.1	Mikrobiologische Kultur	29
3.3.1.1	Keimspektrum der mikrobiologischen Kultur	30
3.3.1.2	Antibiotika-Suszeptibilität	31
3.3.2	PCR/DHPLC	34
3.3.2.1	Keimspektrum aus PCR/DHPLC	39
<b>3.4</b>	<b>Biofilme</b>	<b>40</b>
3.4.1	Ergebnisse Biofilm Formation Assay	40
3.4.2	Biofilmbildung auf metallenen Oberflächen	44
3.4.3	Vergleich Biofilm auf Plastik versus Metall	45
<b>3.5</b>	<b>Metagenom-Ergebnisse aus kulturellem und molekularem Nachweis</b>	<b>45</b>
<b>3.6</b>	<b>Korrelation der Ergebnisse mit den klinischen Daten der Patienten</b>	<b>48</b>
3.6.1	Geschlecht der Patienten	48
3.6.2	Alter der Patienten	48
3.6.3	Frakturlokalisierung	49
3.6.4	Entzündungsparameter	51
3.6.4.1	CRP	51
3.6.4.2	Leukozyten	52
3.6.5	Verweildauer der Implantate	52
3.6.6	Verwendete Osteosynthesearten	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>

<b>7 Anhang</b>	<b>81</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>83</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>84</b>
<b>Danksagung</b>	<b>85</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
°C	Grad Celsius
CNS	<i>Coagulase-negative staphylococcus</i> (Koagulase-negative Staphylokokken)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CV	<i>Chrystal violet</i> (Kristallviolett)
DHPLC	<i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i> (Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
g	Gramm
HCl	Chlorwasserstoffsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (intern transkribierter Spacer)
KCl	Kaliumchlorid
K-Draht	Kirschner-Draht
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter

m	Männlich
M	Molar
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
n.b.	nicht bekannt
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical and Laboratory Standards</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	<i>Pondus Hydrogenii</i>
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
Rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SA	Staphylokokkus aureus
SD	<i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> (Trypton Soja Bouillon )
UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
w	Weiblich

# 1 Einleitung

## 1.1 Historische Entwicklung der Osteosynthese

Die ersten Techniken der operativen Frakturversorgung werden im 19. Jahrhundert entwickelt (Broos und Sermon, 2004). Dabei gehen die Anfänge der Osteosynthese auf den Hamburger Chirurgen Carl Hansmann zurück. Dieser versucht 1886 erstmals mit subkutanen Platten und perkutan eingedrehten Schrauben Frakturen zu stabilisieren. Der Amerikaner William S. Halsted erwirbt bei einem Besuch in Deutschland einige von Hansmanns Platten und verwendet sie ab 1893 neben subkutanen Schrauben ebenfalls. Allerdings sind die Komplikationsraten, besonders die der Osteomyelitis, zu hoch und das Prinzip setzt sich zunächst nicht durch. Als grundlegend für die hohe Infektionsrate ist, neben der noch mangelhaften Hygiene bei der Operation, das verwendete korrosionsanfällige Metall anzusehen (Luhr, 2000). Dabei kann es im Bereich der Schraubenlöcher zu Reibung und galvanischen Prozessen kommen, was zur Freisetzung löslicher Produkte und dadurch zu Beeinflussung des chemischen Milieus führt (Arens und Hansis, 1998). Es kann sich beispielsweise der pH-Wert verändern und somit eine Infektion begünstigt werden. Neben den Infektionen treten nach diesen Eingriffen auch muskuläre Atrophien und Gelenkversteifungen auf (Broos und Sermon, 2004). Anfang des 19. Jahrhunderts ist die Erkenntnis neu und nicht weitläufig akzeptiert, dass mit Fremdkörpern eingebrachte Erreger zu schweren Infektionen führen können.

Erst 1949 kommt es durch Weiterentwicklungen der verwendeten Materialien zu einem Durchbruch in der Osteosynthese-Forschung. In den 1960er Jahren wird in der Schweiz die Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen gegründet und die klinischen Verfahren werden zur Reife gebracht (Luhr, 2000). Die Arbeitsgemeinschaft beschäftigt sich mit der Evaluierung neuer Techniken und Materialien der Osteosynthese und expandiert 1972 durch eine internationale Ausweitung (Matter, 1998). Seit Beginn der 1960er Jahre hat die offene Reposition von Knochenfrakturen mit interner Fixierung die konventionelle Gipsbehandlung und Extension bei vielen Frakturtypen abgelöst (Arens und Hansis, 1998). Zum Beispiel stellen Frakturen mit mehreren Fragmenten oder mit Gelenkbeteiligungen eine Indikation zur Osteosynthese dar.

Bis vor zehn Jahren wurde noch vornehmlich Edelstahl verwendet, heute wird in Deutschland überwiegend Titan eingesetzt. Bei etwas geringerer mechanischer Festigkeit der Titanimplantate liegen die Vorteile in einer besseren Verträglichkeit und einer geringeren Infektrate (Scharf, 2008). Es wird seit einigen Jahren intensiv an verschiedenen Beschichtungen der Implantate geforscht, die zum Ziel haben, die bakterielle Besiedlung zu verhindern. Verwendet werden als antimikrobielle Agenzien beispielsweise Antibiotika (Schmidmaier et al., 2006) und nanopartikuläres Silber (Alt et al., 2004).

## 1.2 Osteosynthesen und damit assoziierte Infektionen

Die Osteosynthese ist eine evidenzbasierte Methode, die eine schnellere Belastung des gebrochenen Knochens und damit eine frühere Mobilisation des Patienten ermöglicht. Sie stellt somit einen Goldstandard in der Frakturversorgung dar. Für das Ergebnis von Heilung und Funktionalität sind neben fester Fixierung und früher Rehabilitation auch Alter und Geschlecht des Patienten entscheidend (Ozdemir et al., 2002).

Die postoperative Infektion eines Implantats ist wegen ihrer Häufigkeit eine der bedeutendsten Komplikationen. Der Einsatz perioperativer antibiotischer Prophylaxen und Operationsräume mit laminarem Luftabzug senken die Anzahl der Implantat-assoziierten Infektionen (Trampuz und Zimmerli, 2005). Für geschlossene Frakturen ist eine Infektionsrate von ein bis fünf Prozent anzunehmen, diese steigt bei komplizierteren Frakturen oder komplexen Weichteilschäden sogar bis auf 29 Prozent (Arens und Hansis, 1998). Dabei liegt die Herkunft der Bakterien zumeist in der eigenen bakteriellen Kolonisation des Menschen. Insgesamt ist der Mensch mit ca.  $10^{14}$  Bakterien besiedelt, bei ungefähr  $10^{13}$  eigenen, menschlichen Zellen (Mullard, 2008). Diese Bakterien leben besonders im Gastrointestinaltrakt wobei im Magen nur wenige Bakterien die saure Umgebung aushalten können, ab dem Dünndarm andere und nach aboral gehend mehr und mehr verschiedene Bakterienspezies dazukommen und unsere physiologische Darmmikrobiota bilden. Diese Bakterien sind nicht nur apathogen, sondern zum Großteil sogar für eine normale Darmtätigkeit unerlässlich. Weiterhin sind auf der Haut viele Bakterienspezies beheimatet und unterstützen die natürliche Barrierefunktion der Haut. Bei Änderungen der Umgebungsbedingungen, wie es sie zum Beispiel bei Einnahme von Antibiotika oder Abweichung des pH-Wertes gibt, kann es zu einem Missverhältnis der eigentlich

physiologischen Mikrobiota kommen. Einzelne Erreger können sich überproportional vermehren und sich von dort aus im ganzen Körper verbreiten und somit Schaden anrichten.

Implantat-assoziierte Infektionen können perioperativ durch bakterielle Kontamination im Operationssaal während oder sofort nach dem Eingriff, durch hämatogene Streuung von entfernten Infektionsorten, durch lymphogene Streuung von einer angrenzenden Infektion oder direkt bei einer penetrierenden Verletzung erfolgen (Trampuz und Widmer, 2006).

Die klinischen Zeichen einer Implantatinfektion sind häufig sehr unspezifische Indikatoren wie zum Beispiel Schmerzen, erhöhte Temperatur und beschleunigte Blutsenkungsgeschwindigkeit (Law und Stein, 1993). Gerade in einem frühen Stadium bei noch lokal begrenzter Infektion sind klinisch klar zuzuordnende Symptome selten. Selbst bei erfolgreicher Diagnosestellung wird die Behandlung solcher Implantat-assoziierten Infektionen durch den chronischen Charakter und das Nichtansprechen auf eine Antibiotikabehandlung erschwert. Diese Problematik kann durch die Existenz eines Biofilms erklärt werden (Stoodley et al., 2005).

Die Entstehung einer Fremdkörper-assoziierten Infektion beginnt mit der Kolonisation des fremden Materials und geht über *Quorum sensing* der Mikroorganismen in eine Biofilmformation über (Bassler, 2002; Camilli und Bassler, 2006). Die bei oder nach der Operation eingebrachten beweglichen planktonischen Bakterien können in eine sesshafte, sogenannte sessile, Form übergehen und am eingebrachten Metall einen Biofilm bilden. Die sessile Form der Bakterien hat einen wesentlich geringeren Stoffwechsel und eine reduzierte Reproduktion gegenüber der planktonischen Form. Antibiotika setzen mit ihrer Wirkung typischerweise an der Reproduktion oder dem Stoffwechsel der Erreger an, somit ist ihre Wirkung bei den sessilen Formen herabgesetzt. Das Bakterium schützt sich so in seiner sessilen Form einerseits vor der wirtseigenen Immunabwehr, andererseits vor der Abtötung durch Antibiotika, ist dabei aber in der Lage wieder in eine planktonische Form überzugehen (Costerton, 2005; Vinh und Embil, 2005). Klassischerweise machen Bakterien bei einer Verschlechterung der humoralen Immunabwehr des Wirtsorganismus von dieser Fähigkeit Gebrauch und führen dann durch Vermehrung zu systemischen Infektionen. Klinisch können transiente Fieberschübe ein Hinweis auf Biofilme sein.

Bei Versuchen Biofilmformationen zu visualisieren wurde festgestellt, dass diese sesshaften Bakteriengemeinschaften durch Wasserkanäle unterteilt sind und eine Zellkommunikation

über chemische Signale stattfindet (Costerton, 2004). Es handelt sich also um ein höchst organisiertes Zusammenleben von Mikroorganismen.

Unterschiedliche Studien kommen bei der Frage nach typischen Erregern, die als ursächlich für die Entzündung der Implantate anzusehen sind, zu übereinstimmenden Ergebnissen. Es handelt sich fast ausschließlich um ubiquitär vorkommende Keime von der Haut, dem Gastrointestinaltrakt und aus der Umwelt. Dabei rangieren Staphylokokken fast ausnahmslos an erster Stelle (Carrega et al., 2008; Trampuz und Zimmerli, 2005). In vielen Studien sind die Koagulase-negativen Staphylokokken, die häufigsten Erreger, in anderen *Staphylokokkus aureus* (Atkins et al., 1998; Trampuz et al., 2007). Weiterhin werden zum Beispiel verschiedene Spezies von Pseudomonaden, Propionibakterien und *Bacillus* nachgewiesen (Sampedro et al., 2009).

### **1.3 Diagnostik Implantat-assoziiertes Infektionen**

Im deutschen Gesundheitswesen ist man bestrebt interdisziplinäre evidenzbasierte Leitlinien für Diagnostik und Therapie zu erarbeiten, um so eine optimale und einheitliche Versorgung der Patienten zu ermöglichen. Die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) veröffentlicht neue und überprüft aus der Vergangenheit stammende Leitlinien, um für den Patienten eine möglichst standardisierte Behandlung zu gewährleisten. Eine solche Leitlinie fehlt für Implantat-assoziierte Infektionen und somit auch eine standardisierte Diagnostik. Die existierende Leitlinie zur unfallchirurgischen Implantatentfernung sieht als obligate vorausgehende Diagnostik nur die klinische Untersuchung des Patienten und eine Bildgebung der betroffenen Region durch eine konventionelle Röntgenaufnahme vor. Des Weiteren sollen bei Infektionen des Implantats erweiterte Laboruntersuchungen stattfinden, dabei werden allerdings weder ein diagnostischer Algorithmus zur Infektionsfeststellung noch die dann abzunehmenden Laborparameter näher ausgeführt. Daraus resultieren in verschiedenen Kliniken und Laboratorien sehr unterschiedliche diagnostische Standards. Eine gängige Methode ist die Untersuchung von Laborparametern wie dem C-reaktiven Protein (CRP), der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) und der Leukozytenanzahl.

Im Falle einer chirurgischen Revision sind kulturelle und histologische Untersuchungen von intraoperativ genommenen Abstrichen, Gewebeproben oder aspirierter Synovia üblich (Bernard et al., 2004; Ochs et al., 2005; Sanderson, 1991).

Histologisch zeigen diese Gewebeproben aus der Implantatumgebung massive Infiltrationen von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten. Diese werden als Antwort auf die Infektion aktiviert und können die Gewebeerstörung durch Abgabe von Zytotoxinen, die bei der hohen Zahl von aktiven Zellen in großen Mengen gebildet werden, verschlimmern (Wagner et al., 2006). Zur mikrobiologischen Untersuchung von Abstrichen, Gewebe und Synovia werden diese Originalmaterialien wiederum unterschiedlich bearbeitet. Im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM), Standort Gießen, werden Nähragarplatten ausgestrichen und Flüssignährmedien beimpft. Nach Bebrütung in aeroben und CO<sub>2</sub>-angereicherten Brutschränken erfolgt eine Keimbestimmung mit Antibiogramm. Molekularbiologische Methoden kommen vor allem bei spezifischer Anforderung oder zur molekularen Identifizierung zum Einsatz. Es ist davon auszugehen, dass mit diesen in der Routine eingesetzten Kultivierungsmethoden nur ein kleiner Teil des Bakterienspektrums nachgewiesen werden kann (Fux et al., 2003). Die Entwicklung molekularbiologischer Methoden wie der PCR hat den Nachweis schwer oder nicht kultivierbarer Erreger stark vorangebracht. Besonders die Amplifizierungen der 16S rDNA (Clarridge, 2004; Domann et al., 2003) werden auch in Routinelaboratorien erfolgreich zum Einsatz gebracht.

#### **1.4 Probleme der Diagnostik Implantat-assoziiertes Infektionen**

Problematisch ist der eindeutige Nachweis einer Implantatinfektion. Dabei fehlt es in der *in-vivo*-Diagnostik an spezifischen Laborparametern oder Untersuchungstechniken. Bernard et al. bezeichnen den CRP-Wert als nützlichsten Laborparameter beim Verdacht auf eine Implantat-Infektion (Bernard et al., 2004). Allerdings ist das CRP ein nicht sehr spezifischer Parameter, da er bei Entzündungen jeder Genese und generell nach allen chirurgischen Eingriffen erhöht und somit nur im Verlauf zu beurteilen ist.

Ein anderer Ansatz ist die Beurteilung des CRP-Wertes in Kombination mit der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) (Austin et al., 2008). Auf der Suche nach einem spezifischeren Serummarker wurde in einer prospektiven Studie mit 58 Patienten eine

Korrelation der Höhe des Interleukin-6-Spiegels und der Protheseninfektion beobachtet (Trampuz und Widmer, 2006). Die Interleukin-Bestimmung ist sehr teuer und auch hier ist die spezifische Bedeutung für Implantat-Infektionen keinesfalls gegeben.

Eine hohe Spezifität konnte für Procalcitonin und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  nachgewiesen werden, allerdings bei geringer Sensitivität (Bottner et al., 2007). Auch anhand eines konventionellen Röntgenbildes kann nicht sicher zwischen Infektion und Lockerung eines Implantats unterschieden werden (Sanderson, 1991).

Selbst bei notwendiger chirurgischer Revision aufgrund von fehlender Konsolidierung fällt es mit den gängigen mikrobiologischen und histologischen *in-vitro*-Untersuchungsmethoden oft schwer, eine Infektion als Ursache sicher zu diagnostizieren oder auszuschließen. Somit ist es durchaus möglich, dass die Infektionsraten noch unterschätzt werden (Dempsey et al., 2007; Tunney et al., 1999) und neue diagnostische *in-vivo*- und *in-vitro*-Ansätze notwendig sind, um diese diagnostische Lücke zu beseitigen.

## 1.5 Neue Ansätze in der *in-vitro*-Diagnostik Implantat-assoziiertes Infektionen

Aufgrund fehlender Diagnostikstandards beschäftigen sich weltweit verschiedene Forschungsgruppen mit Neu- und Fortentwicklungen geeigneter Methoden, um eine höhere Aufklärungsrate an Implantat-assoziierten Infektionen zu erreichen.

Ein neuer Ansatz besteht in der Verwendung von hochfrequenten Ultraschallwellen. Immer häufiger wird dieser dafür verwendet, in Biofilmen lebende Bakterien von Oberflächen wie Osteosynthesen abzulösen. Die Mechanismen, die bei der Ablösung adhärenter Materialien durch Ultraschall zusammenspielen, sind einerseits die Kavitation der Flüssigkeit des Ultraschallbads und andererseits die Scherkräfte an der Oberfläche (Pitt und Ross, 2003). Dabei wird das explantierte Material in sterile Behältnisse überführt und mit Ringerlösung oder Flüssigkulturmedien umgeben. Dann wird dieser Behälter in ein mit destilliertem Wasser gefülltes Ultraschallgerät in einen Schwimmer eingesetzt und bei unterschiedlichen Temperaturen und Intensitäten den Ultraschallwellen ausgesetzt (Bjerkkan et al., 2009; Piper et al., 2009; Trampuz et al., 2007). In einer modifizierten Untersuchung an 331 Patienten von Trampuz et al. wurden die Probenbehälter vor dem Ultraschallbad 30 Sekunden geschüttelt, da Experimente zeigten, dass so die Kavitation verstärkt wird. Die Studie belegt, dass die kulturelle Anzucht von den so gewonnenen Bakterien sensitiver ist als die einer Gewebekultur

bei erhaltener Spezifität (Trampuz et al., 2007). Ferner werden in einzelnen Studien mikrobiologische Besiedlungen auf entfernten Implantaten mittels Rasterelektronenmikroskopie nachgewiesen (Makarem et al., 2008; Mohanty et al., 2003; Neut et al., 2003).

Weitere Ansätze arbeiten mit Immunofluoreszenzmikroskopie, dabei wird ein Teil der Erreger-DNA nachgewiesen, indem er mit einem spezifischen Antikörper oder einer Sonde markiert wird (Kathju et al., 2009; Malic et al., 2009). So kann allerdings das Vorliegen polymikrobieller Infektionen nicht ausreichend untersucht werden (Tunney et al., 1999). Bisher gibt es nur einen Ansatz, in dem versucht wird, den Biofilm von der Implantatoberfläche manuell abzulösen. Dieser bedient sich der Anschabung der Metalloberfläche mittels Skalpell mit darauf folgender kultureller Anzucht des abgelösten Materials. Die Gruppe um Neut kam 2003 mit dieser Methode zur Erregeranzucht in 86% der untersuchten klinisch infizierten Prothesen. Eine *in-vitro*-Versuchsreihe in Norwegen konnte diesen Erfolg jedoch nicht reproduzieren (Bjerkkan et al., 2009).

## 1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die metagenomische Untersuchung regulär explantierter Osteosynthesematerialien auf eine mikrobielle Besiedlung unter Anwendung von kulturellen Anzuchtmethoden, 16S rDNA PCR und denaturierender Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC).

In Ermangelung einer Leitlinie und somit eines diagnostischen Goldstandards zur Feststellung einer bakterieller Besiedlung von Metallimplantaten sollte eine vollkommen neue Methodik der Implantat-Aufbereitung entwickelt und erprobt werden. Dabei sollte ein manuelles, systematisches Abbürsten den intakten Biofilm zerstören und so die Bakterien aus ihrer Organisationsstruktur lösen um sie damit den Nachweismethoden zugänglich zu machen. Die Ergebnisse dieses neuen methodischen Ansatzes sollten direkt mit denen des Ultraschallbades verglichen werden, indem ein Teil der Originalmaterialien den zwei verschiedenen Aufbereitungsmethodiken zugeführt wurde.

Bei dieser Studie sollte festgestellt werden, ob die Osteosynthesen besiedelt sind und, wenn ja, aus welchen Keimen sich die Mikrobiota zusammensetzt. Dabei sollte auch die wahrscheinliche Herkunft der Bakterien näher beleuchtet werden, um mögliche Rückschlüsse auf die Ätiopathogenese zu ziehen.

Von den kulturell nachzuweisenden Bakterien sollten Isolate gewonnen, die Antibiotikaempfindlichkeit bestimmt und die Fähigkeit zur Biofilmbildung *in vitro* untersucht werden.

Bei nachweislich besiedelten Implantaten sollten die klinischen Daten der betroffenen Patienten mit denen der Patienten ohne Besiedlung verglichen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Probanden

Das untersuchte Osteosynthesematerial stammt von Patienten der unfallchirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Gießen und Marburg GmbH (UKGM), Standort Gießen. Die für die Studie rekrutierten Patienten wurden über die Forschungsvorhaben an den explantierten Osteosynthesen aufgeklärt. Die teilnehmenden Patienten haben der Zuführung des explantierten Materials zu Forschungszwecken und der Auswertung ihrer archivierten klinischen Daten zugestimmt. Die Ethikkommission wurde zu der Versuchsplanung befragt und es erfolgte ein positives Votum (Aktenzeichen 68/07). Alle zur Studie verwendeten Implantate wurden im Zeitraum vom 01.01.2007 bis 31.12.2007 entnommen. Grundsätzlich wurde bei Implantation eine perioperative Antibiotikaprophylaxe von 2 g Cefazolin intravenös verabreicht. Cefazolin ist ein Cefalosporin der ersten Generation und entspricht damit der empfohlenen perioperativen Prophylaxe (Trampuz und Zimmerli, 2006). Die Operationen wurden unter sterilen Bedingungen bei laminarem Luftabzug durchgeführt.

### 2.2 Chemikalien und Geräte

#### 2.2.1 Chemikalien und Materialien

- Agarose: Invitrogen
- Antibiotika Stempel und Blättchen: SD
- Aqua ad injectabilia: Braun
- DHPLC-Puffer: Transgenomic
- PCR-Puffer: Tris / HCl 1M (10 ml), MgCl<sub>2</sub> 1 M (1 ml), KCl 1 M (12,5 ml), 10 % Tween 20 (2,5 ml), Gelatine (5 ml), destilliertes H<sub>2</sub>O (19 ml)
- Ficoll: Ficoll<sup>TM</sup> 400 Amersham Pharmacia Biotech AB
- Ficoll-Auftragspuffer: 1,25 g Ficoll in 7,5 ml Destilliertem H<sub>2</sub>O über Nacht lösen plus Spatelspitze Bromphenolblau
- Invitek Tissue Kit

- Lysis-Solution: Destilliertes H<sub>2</sub>O (445 ml), KOH 5 M (40 ml), EDTA 0,5 M (10 ml), DTT 1 M (5 ml)
- NaCl 0,9 %: Fresenius, Braun
- Neutralisationspuffer: 40 % 1 M HCl, 60 % M Tris / HCl
- Objektträger: R. Langenbrick
- Parafilm: Pechiney Plastic Packaging
- Phusion™ Flash PCR Master Mix: Finnzymes
- Pipetten: Eppendorf Research und Biohit
- Pipettenspitzen mit Filter: Nerbe plus
- Primer: Metabion
- Prokaryonten Mastermix (Rezept für 50 • 95 µl): PCR-Puffer (500 µl), d’NTP- Mix (200 µl), Primer 933 F (10 µl), Primer 1407 R (10 µl), Taq- Polymerase (15 µl), Destilliertes H<sub>2</sub>O (4750 µl)
- Röhrchen 10 ml, 50 ml: Greiner bio-one
- TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer): TRIS 89 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 89mM, Borsäure 2mM, destilliertes H<sub>2</sub>O
- Tween 20: Merck
- UTW 8 Tube Stripes: Finnzymes

### 2.2.2 Geräte

- Abstrichbürste, steril: Cytobrush
- Abzug: Heraeus, LaminAir HB2448
- Autoklav: Getinge, euro-clinic
- Brutschrank: Heraeus
- DHPLC: Transgenomic 3500 HT Wave® DHPLC System inkl. Fragment Collector
- Elektrophoresekammer: Pharmacia Biotech EPS 600
- Digitale Gel-Dokumentation: Biorad Universal Hood II
- Heizblock: West 6100

- Kühlschrank +2°C: Bosch
- Thermocycler: Hybaid PCR Express
- Sequenziergerät: ABI 3730 XL und 3130XL, AME Bioscience
- Photometer Mikrotiterplatten: Diagnostics Pasteur LP 400
- Piko® Thermal Cycler: Finnzymes
- Reaktionsgefäße: Eppendorf
- Spiegelreflexkamera: Canon EOS 300D
- Thermomixer comfort 2 ml: Eppendorf
- Tiefkühltruhe -25°C: Sanyo
- Ultraschallbad: Bandelin Sonorex Super 10 P Digital
- Vortexer: Janke&Kunkel
- Zentrifuge: Heraeus Biofuge pico 13000

### 2.3 Kulturmedien

- **BHI + 20 % Glucose – Einfriermedium:** Zur Konservierung in 1,5 ml Einfrier-Röhrchen bei – 80°C (Glycerin 252 g, Brain-Heart-Infusion (Difco) 37 g, H<sub>2</sub>O destilliert 800 µl)
- **Blut-Agar:** Zur Isolierung verschiedener anspruchsvoller Mikroorganismen und Beurteilung der Hämolyseformen (Hefeextrakt und Peptone 20 g, Natriumchlorid 5 g, Agar 15 g, H<sub>2</sub>O destilliert 1000 ml + 5 % Schafsblut bei 50°C) pH 6,8 ± 0,2
- **DNase-Agar (OXOID):** Zum Nachweis des Enzyms Desoxyribonuklease, besonders bei Staphylokokken (Tryptose 20 g, Desoxyribonukleinsäure 2 g, Natriumchlorid 5 g, Agar 12 g, H<sub>2</sub>O destilliert 1000 ml) pH 7,3 ± 0,2

- **Kochblut-Agar:** Zur Isolierung verschiedener anspruchsvoller Mikroorganismen (Hefeextrakt und Peptone 20 g, Natriumchlorid 5 g, Agar 15 g, H<sub>2</sub>O destilliert 1000 ml + 8 % Schafsblut bei 80°C) pH  $6,8 \pm 0,2$
- **MacCONKEY Agar:** Selektivagar zur Isolierung von gramnegativen Bakterien (Pepton aus Casein 17 g, Pepton aus Fleisch 3 g, Natriumchlorid 5 g, Laktose 10 g, Gallesalzmischung 1,5 g, Neutralrot 0,03 g, Kristallviolett 0,001 g, Agar 13,5 g, H<sub>2</sub>O destilliert 1000 ml) pH  $7,1 \pm 0,2$
- **Müller-Hinton-Nährboden (OXOID):** Zur Antibiotika- Empfindlichkeitsprüfung (Rindfleisch, getrocknet 2 g, Caseinhydrolysat 17,5 g, Stärke 1,5 g, Agar 17,0 g, H<sub>2</sub>O destilliert 1000 ml) pH  $7,4 \pm 0,2$
- **Sabouraud-4 %-Glucose Agar:** Zur Isolierung von Sprosspilzen (Peptone 20 g, Glucose 40 g, Agar 15 g, H<sub>2</sub>O destilliert 1000 ml) pH  $5,6 \pm 0,2$
- **Schaedler-Agar:** Basismedium zur Kultivierung von Anaerobiern (Pankreatisch abgebautes Casein 8,2 g, Peptisch abgebautes Tiergewebe 2,5 g, papainisch abgebautes Sojamehl 1,0 g, Glucose 5,8 g, Hefeextrakt 5,0 g, Natriumchlorid 1,7 g, Dikaliumhydrogenphosphat 0,8 g, L-Cystin 0,4 g, Hämin 0,01 g, Tris(hydroxymethyl)aminomethan 3,0 g, Agar 13,5 g, H<sub>2</sub>O destilliert 1000 ml) pH  $7,6 \pm 0,2$
- **Thioglycolat-Bouillon:** Zur Züchtung obligat und fakultativ anaerober und mikroaerophiler Keime (Pepton aus Casein 15 g, Hefeextrakt 5 g, Glukose 5,5 g, L-Cystein 0,5 g, Natriumchlorid 2,5 g, Natriumthioglykolat 0,5 g, H<sub>2</sub>O destilliert 1000 ml) pH  $7,1 \pm 0,2$
- **Tryptic Soy Agar (Tryptone Soya Agarioglycolat-Bouillon, TSB):** Hemmstoff- und Indikatorfreier Universalnährboden (Pepton aus Casein 17 g, Pepton aus Sojamehl 3 g, Glucose 2,5 g, Natriumchlorid 5 g, di- Kaliumhydrogenphosphat 2,5 g, H<sub>2</sub>O destilliert 1000 ml) pH  $7,3 \pm 0,2$

## 2.4 Hard- und Software

- Endnote, Thomson
- Office XP, Microsoft
- Navigator™ Software, Transgenomic
- NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Quantity One Version 4.6.3, Bio-Rad Laboratories
- Sepsi Test (<http://www.sepsitest-blast.de/de/index.html>)
- SEQ Man, Lasergene, DNA-Star
- Sigma Blot, Systat Software Inc.

## 2.5 Methoden

Im folgenden Schema ist die Reihenfolge der Bearbeitung dargestellt.

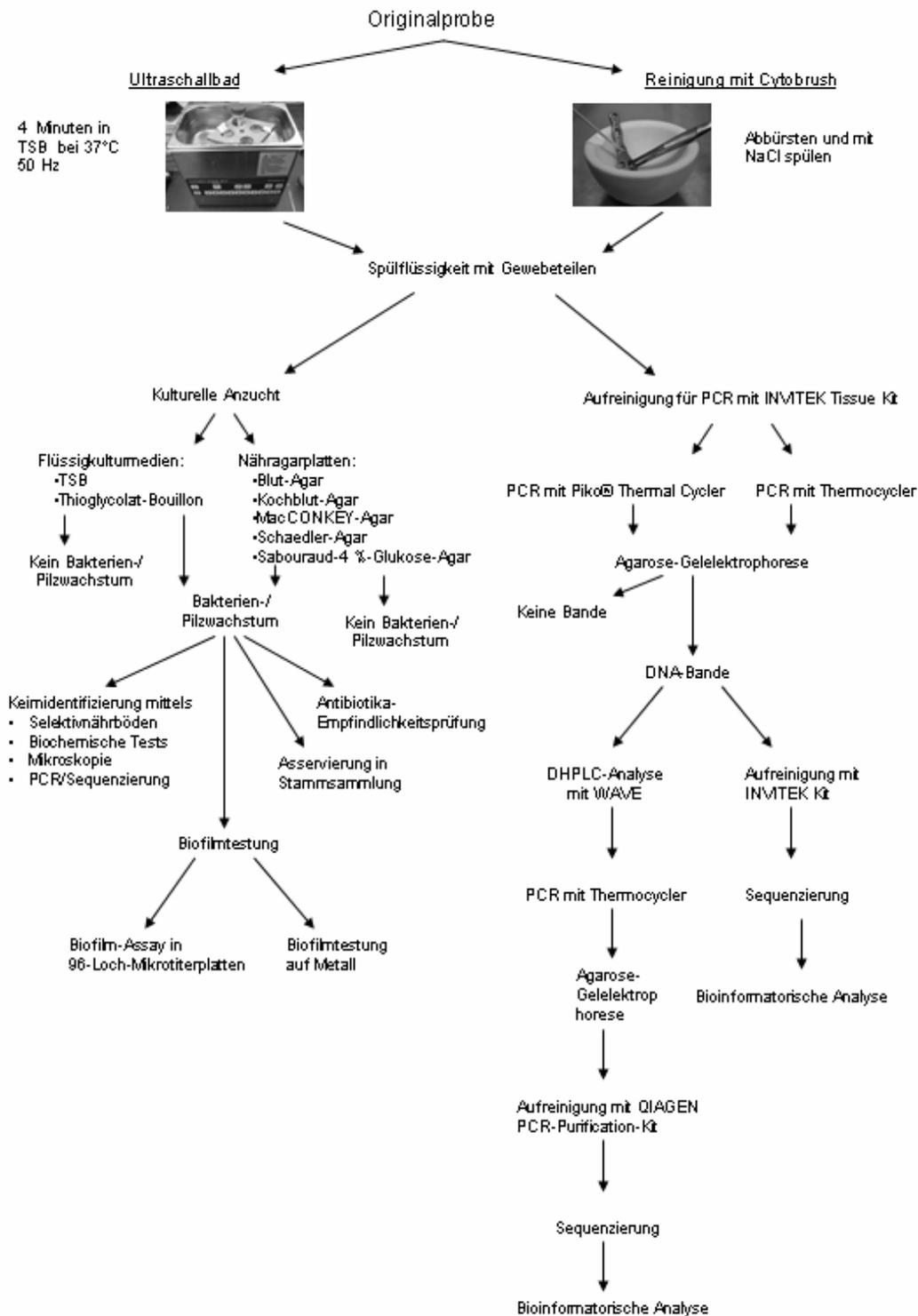


Abbildung 1: Fließschema zur Veranschaulichung des Bearbeitungsvorgangs der Originalmaterialien. Alle hier dargestellten Schritte werden im Folgenden beschrieben.

### 2.5.1 Probengewinnung

Das ausgebaute Material wurde im Operationssaal unter laminarem Luftabzug direkt nach der Entnahme unter aseptischen Bedingungen in eine sterile Transporttüte überführt und in die Mikrobiologie transportiert. Bei dem Material handelte es sich meist um Schrauben oder eine Platte mit Schrauben, seltener um Marknägel oder Kirschner-Drähte. Es waren alles interne, also vollständig unter der Haut befindliche, Osteosynthesen. Die weitere Verarbeitung fand an einer sterilen Werkbank mit laminarer Luftströmung und ausschließlich unter Verwendung steriler Werkzeuge und Hilfsmittel statt.

### 2.5.2 Verarbeitung nach Probeneingang

Das explantierte Metall wurde mittels einer sterilen Pinzette aus der Transporttüte in eine autoklavierte Reibschale überführt. Bei 30 der 80 Proben wurde ein Teil, zumeist eine einzelne Schraube, zur Ultraschallbadreinigung verwendet, das restliche Material der manuellen Reinigung mit der Abstrichbürste unterzogen. Beide Verfahren werden im Folgenden näher erklärt und beschrieben.

#### 2.5.2.1 Bürstenmethode

##### 2.5.2.1.1 Manuelle Reinigung

Das explantierte Material in der Reibschale wurde mit einigen Tropfen 0,9 % Kochsalzlösung angefeuchtet. Dann wurde jedes einzelne Teil mit einer sterilen Abstrichbürste (Abbildung 1 rechts), die ursprünglich für den Cervix-Abstrich entwickelt wurde, systematisch abgebürstet und das Implantat mehrfach mit Kochsalzlösung abgespült. Die Bakterien sollten so aus der



festen Biofilmformation herausgelöst und in der Spülflüssigkeit in der Reibschale aufgefangen werden.

Abbildung 2: Die Plattenosteosynthese wird mit der Pinzette gehalten und mit der Abstrichbürste bearbeitet.

### 2.5.2.1.2 Kulturelle Anzucht

Die Originalproben wurden nach dem Abspülen in TSB über mindestens zehn Tage bei 37°C inkubiert und täglich auf Wachstum kontrolliert.

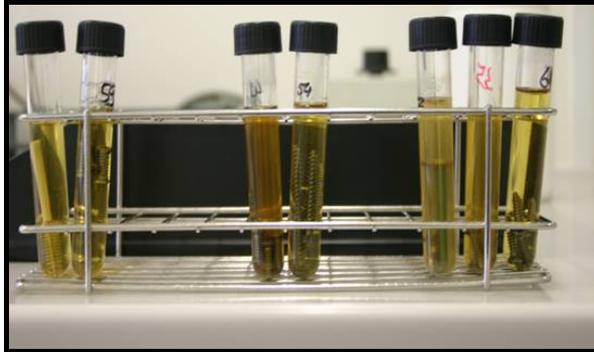


Abbildung 3: Proben in der Flüssigkultur

Als Inkubationsgefäß wurden sterile 10 ml Röhrchen beziehungsweise bei größeren Implantaten 50 ml Röhrchen verwendet. Marknägel wurden aufgrund ihrer Größe von der Inkubation ausgeschlossen. Des Weiteren wurde die Abstrichbürste selbst in einem 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 400 µl Lysis-Buffer (Invitek-Tissue-Kit) ausgespült und dann in einem weiteren TSB-Röhrchen für zehn Tage inkubiert.

Die in der Reibschale angesammelte Kochsalzlösung und die darin enthaltenen Gewebestücke von der manuellen Bürstenreinigung wurden auf Flüssigkulturmedien, Nähragarplatten und das Reaktionsgefäß, in dem bereits die Bürste ausgewaschen wurde, aliquotiert. An Flüssigkulturmedien wurden je ein Reagenzglas mit TSB, ein Hemmstoff- und Indikatorfreier Universalnährboden, und eines mit Thioglycolat-Bouillon, zur Züchtung obligat und fakultativ anaerober und mikroaerophiler Keime, mit je circa 500 µl Spülflüssigkeit beimpft. An Nähragarplatten wurde je eine Blut-Agarplatte, eingesetzt zur Isolierung verschiedener anspruchsvoller Mikroorganismen und Beurteilung der Hämolyseformen, eine Kochblut-Agarplatte, ebenfalls zur Isolierung verschiedener anspruchsvoller Mikroorganismen, eine MacCONKEY-Agar-Platte, Selektiv-Agar zur Isolierung von gramnegativen und coliformen Bakterien, eine Schaedler-Agarplatte, einem Basismedium zur Kultivierung von Anaerobiern, und eine Sabouraud-4 %-Glucose Agarplatte, zur Isolierung von Sprosspilzen, mit 50 µl Spülflüssigkeit beimpft. Alle Kulturmedien wurden für mindestens zehn Tage bei 37°C inkubiert.

### 2.5.2.1.3 DNA-Aufreinigung

Aus dem Material im Reaktionsgefäß wurde unter Anwendung des Invitex Tissue Kits DNA isoliert. Das Gewebe der Abstrichbürste und die Spülflüssigkeit mit dem abgeriebenem Material wurden mit 400 µl Lösungspuffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, dazu kamen 40 µl Proteinase K. Dies ist eine Exo- und Endopeptidase zur Proteolyse freiwerdender störender Proteine beim Lysierungsvorgang mit einer großen Resistenz gegenüber Enzyminhibitoren.

Das Reaktionsgefäß wurde dann bei 52°C und 650 rpm mindestens 30 Minuten im Thermomixer inkubiert bis alle festen Bestandteile aufgelöst waren, sowie im Folgenden bei 13.000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, während das Pellet verworfen wurde. Dazu wurden 200 µl Bindungs-Puffer pipettiert und das Material für 10 Sekunden im Vortexer gemischt. Dann wurde die komplette Lösung auf eine Säule in einem 2 ml Gefäß pipettiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren zwei Minuten Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde die Flüssigkeit, die sich unten im Röhrchen angesammelt hatte, verworfen, die Säule erneut eingesetzt und 550 µl Waschpuffer darauf gegeben. Nach einer weiteren Minute Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde die angesammelte Flüssigkeit wiederum entsorgt und der Waschvorgang noch einmal wiederholt. Zum vollständigen Trockenlegen der Säule wurde diese noch zwei Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Nun wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Röhrchen überführt und darauf 100 µl auf 52°C vorgewärmter Lösungspuffer pipettiert, um eine größere Lösungseffektivität zu erreichen. Nach drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch erneute Zentrifugation für zwei Minuten bei 10.000 rpm die DNA eluiert.

## **2.5.2.2 Ultraschallbad**

### 2.5.2.2.1 Reinigen durch Ultraschallwellen

Ein Bestandteil des Implantats wurde ohne jegliche Bearbeitung steril in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und bis zur Oberkante der Probe mit TSB befüllt. Dann kam das Röhrchen in einem Schwimmer für vier Minuten bei 37°C und 50 Hz in das mit destilliertem Wasser gefüllte Ultraschallbad.

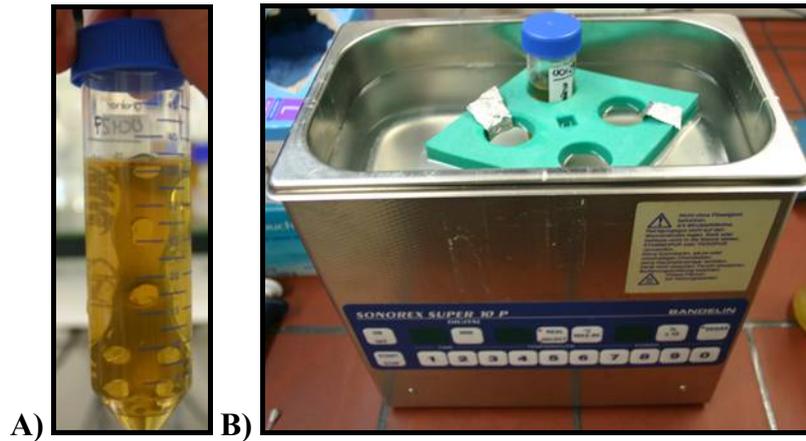


Abbildung 4: A: Plattenosteosynthese im 50ml-Röhrchen mit Medium, B: Röhrchen im Kunststoff-Schwimmer im Ultraschallbad.

#### 2.5.2.2.2 Kultur

Danach wurden aus dem TSB je 50  $\mu$ l Flüssigkeit auf Blut-, Kochblut-, MacConkey- und Pilzplatten ausgestrichen und 500  $\mu$ l in ein Reagenzglas mit Thio-Bouillon überführt, um so das Wachstum anaerober Kulturen zu ermöglichen. Die Kulturen wurden für mindestens zehn Tage bei 37°C inkubiert und täglich auf Wachstum kontrolliert.

#### 2.5.2.2.3 DNA-Aufreinigung

Weiterhin wurden 1.200  $\mu$ l zur DNA-Aufreinigung in einem 1,5 ml Röhrchen zunächst fünf Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen, 50  $\mu$ l destilliertes Wasser und 50  $\mu$ l Lysepuffer hinzugegeben und dann für 15 Minuten bei 95°C im Heizblock inkubiert. Danach erfolgte das Abstoppen der Reaktion mittels 50  $\mu$ l Neutralisations-Puffers sowie eine erneute Zentrifugation bei 13.000 rpm für eine Minute.

### 2.5.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die aufgereinigte DNA sollte nun durch PCR vervielfältigt werden. Dafür wurde ein Universal-Mastermix mit den Primern 933 F (5'-GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G-3') und 1407 R (5'-GAC GGG CGG TGT GTA CAA G-3') verwendet, wobei die Primer an das 16S rRNA-Gen von Prokaryonten binden (Domann et al., 2003).

Die Amplifizierung und Sequenzierung der 16S rDNA ist eine etablierte Standardmethode zur Identifizierung von Bakterienspezies, Gattungen und Familien (Amann et al., 1995). Weiterhin wurden zur Untersuchung auf Pilze die Primer ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') und ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') eingesetzt, die an der ITS-Region (*Internal transcribed spacer*) von Pilzen binden (Caligiorne et al., 1999; Gardes und Bruns, 1993).

### **2.5.3.1 Thermocycler**

Bei der mit dem Thermocycler durchgeführten 16S rDNA PCR wurden 5 µl der vorhandenen DNA mit 95 µl Mastermix zunächst für 2 Minuten auf 94°C erhitzt, danach wurden 25 Zyklen mit zunächst 40 Sekunden bei 94°C zur Denaturierung der DNA und dann 40 Sekunden bei 56°C zur Primerhybridisierung durchgeführt. Nach einer Amplifikationsperiode von fünf Minuten bei 72°C wurde die Probe dann bei 4°C kühl gehalten. Positiv- und Negativkontrolle waren bei jedem Durchlauf beigefügt.

Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurde ein Agarose-Gel hergestellt. Dafür wurden 5,2 g Agarose in 400 ml TBE-Puffer gelöst, vier Minuten in der Mikrowelle erhitzt und dann im Eiswasserbad auf ca. 37°C unter Schwenken abgekühlt. Bei Erreichen dieser Temperatur wurde die Lösung in einen Rahmen mit Kämmen gegossen und 40 Minuten unter dem Abzug getrocknet. Nach Einsetzen des Schlittens in die Elektrophoresekammer wurden vorsichtig die Kämmen aus dem Gel gelöst. In die Geltaschen kam zur Überprüfung des PCR-Ergebnisses eine Mischung aus 6 µl PCR-Produkt und 6 µl Ficoll-Auftragspuffer. Zur Einschätzung der Größe des PCR-Produktes wurde jeweils ein Marker mit auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophoresekammer lief eine Stunde bei 150 V, 189 mA und 28 W. Danach wurde das Ergebnis mittels UV-Fotoapparat dokumentiert. Bei positiver Bande im Agarose-Gel wurde das restliche PCR-Produkt für die Sequenzierung aufgereinigt (Invitak). Der Rest des PCR-Produkts, 94 µl, wurden in 500 µl Bindungs-Puffer pipettiert und durchmischt in ein neues Röhrchen auf eine Säule aufgetragen. Dann wurde das Material bei 12.000 rpm eine Minute zentrifugiert, die angesammelte Lösung verworfen und noch mal bei 12.000 rpm zwei Minuten trocken zentrifugiert. Die Säule wurde in einem neuen Röhrchen mit 30 µl Elutionspuffer benetzt, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und die DNA in einer Minute bei 10.000 rpm aus der Säule gelöst. Dieses PCR-Produkt wurde dann sequenziert und

das Ergebnis in die internetbasierten DNA-Datenbanken von NCBI und Sepsitest eingespeist und ausgewertet.

### **2.5.3.2 Piko® Thermal Cycler**

Der Piko® Thermal Cycler ist ein neu entwickeltes PCR-Gerät, welches aufgrund verschiedener Umstände eine besonders spezifische und schnelle PCR ermöglicht. Im entsprechenden Mastermix ist eine *Pyrococcus*-DNA-Polymerase enthalten, welche der *Thermus aquaticus*-DNA-Polymerase überlegen ist. Durch eine spezielle DNA-Bindungsdomäne ist die Enzym-Prozessivität gesteigert und somit die Voraussetzung für eine kurze Elongationszeit, gesteigerte Ausbeute und eine 2-fach höhere Genauigkeit im Vergleich zur Taq-DNA-Polymerase gegeben. Es werden ultradünne Tubes, mit einer Wandstärke von 150 µm, verwendet, die eine sehr schnelle Temperaturangleichung mit dem Heizblock erlauben und somit die Aufheizungs- und Abkühlungsphasen deutlich reduzieren.

Bei der mit dem Piko® Thermal Cycler durchgeführten 16S-rDNA-PCR wurden 5 µl der vorhandenen DNA mit 25 µl Phusion™ Flash Master Mix, 15 µl destilliertem Wasser und je 2,5 µl Primer 933 F und 1407R in die speziellen dünnwandigen PCR-Tubes pipettiert. Diese wurden bei 98°C für 10 Sekunden erhitzt, danach wurden 35 Zyklen mit zunächst 1 Sekunde bei 98°C zur Denaturierung der DNA, dann 5 Sekunden bei 64°C zur Primerhybridisierung und darauf 10 Sekunden bei 72°C zur Elongation durchgeführt. Nach einer Amplifikationsperiode von einer Minute bei 72°C wurde die Probe dann bei 4°C kühl gehalten. Positiv- und Negativkontrolle waren bei jedem Durchlauf beigefügt. Die Gelkontrolle erfolgte wie oben beschrieben.

### **2.5.4 Weiterverarbeitung bei positiver Kultur**

Bei sichtbarer Trübung der Nährmedien wurden je 50 µl auf Blut-, Kochblut-, MacConkey-, Schaedler- und Müller-Hinton-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % mindestens zehn Tage bebrütet und mit Parafilm vor dem Austrocknen geschützt. Bei Wachstum erfolgte die nähere Bestimmung der Keime mit Hilfe verschiedener Kriterien: Zunächst war anhand des Gedeihens auf den verschiedenen Medien eine grobe Einteilung der Erreger möglich, zum Beispiel hemmen die Gallensalze des MacConkey Nährbodens weitgehend das Wachstum grampositiver Keime. Weiter gab die makroskopische

Betrachtung der Koloniegröße, -form und -farbe Hinweise auf den Erreger. So zeigte zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* auf festen Nährmedien flache, große, graue, schleimig wachsende Kolonien mit metallisch glänzender Oberfläche. Anhand der Lichtmikroskopie war eine Beurteilung der Form möglich und die Gramfärbung erlaubte die Einordnung der Bakterien in gramnegative und grampositive Spezies. Durch verschiedene chemische Tests, die in der bunten Reihe zusammengefasst sind, konnte eine weitere Eingrenzung stattfinden.

Dazu kam die Beurteilung des Hämolyseverhaltens auf der Blutagarplatte als Entscheidungskriterium. Bei der  $\alpha$ -Hämolyse, auch vergrünende Hämolyse genannt, produzieren die Bakterien keine Hämolsine, sie rufen auf Blutagar eine grünliche Zone hervor, die nicht auf eine echte Hämolyse, sondern auf eine Entfärbung und einen Kaliumverlust der roten Blutkörperchen zurückzuführen ist. Die Reduktion des Hämoglobins zu Biliverdin verursacht die grüne Färbung. Die  $\beta$ -Hämolyse, auch als echte Hämolyse bezeichnet, entsteht, weil die Bakterien Hämolsine wie zum Beispiel Streptolysin O oder S produzieren. Sie sind von einer klaren Hämolysezone umgeben, also einer deutlichen Entfärbung des roten Agars im Bereich um die gewachsenen Kolonien. Das Verhalten der Bakterien, die keinerlei Hämolyse zeigen, nennt man  $\gamma$ -Hämolyse.

### **2.5.5 Unterscheidung verschiedener Staphylokokkenspezies**

Wenn sich aus den oben genannten Begutachtungen die Gattung Staphylokokken ergab, erfolgte die weitere Spezifizierung der Art durch Prüfung auf Vorhandensein des Enzyms Desoxyribonuklease. Dazu wurde eine Kolonie (etwa  $10^8$  bis  $10^9$  Bakterien) mit einer Öse abgenommen, strichförmig auf einer DNase Platte verteilt und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Oberfläche mit Salzsäure benetzt.

Um die Bakterien mit dem Enzym entstand ein durchsichtiger Hof, während der Rest der Platte milchig wurde, da die DNA dort noch vorhanden war und durch den Kontakt mit der Salzsäure ausfiel.

### **2.5.6 Antibiotika-Resistenztestung**

Weiterhin wurde von jedem nachgewiesenen Erreger eine Austestung auf vorhandene Antibiotika-Resistenzen im Agardiffusionsverfahren durchgeführt. Der Agardiffusionstest

wurde nach NCCLS Kriterien (National Committee for Clinical and Laboratory Standards, jetzt Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) genannt) für folgende Antibiotika durchgeführt: Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin, Ampicillin/Sulbactam, Cefalexin, Cefazolin, Cefepim, Cefotaxim, Cefpodoxim, Ceftazidim, Ceftriaxon, Cefuroxim, Ciprofloxacin, Clindamycin, Erythromycin, Flucloxacillin, Fosfomycin, Gentamicin, Imipenem, Meropenem, Moxifloxacin, Ofloxacin, Penicillin, Piperacillin/Combactam, Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Tetracyclin, Tobramycin und Vancomycin.

Dazu wurde von der jeweils bewachsenen Platte mit einer sterilen Öse eine Kolonie (etwa  $10^8$  bis  $10^9$  Bakterien) abgenommen, in ein Reagenzglas mit TSB überführt und für 15 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Mit einem sterilen Glasstab wurden dann vier Müller-Hinton-Platten gleichmäßig mit beimpftem TSB-Nährmedium plattiert und die wirkstoffgetränkten Plättchen mittels Stempel aufgebracht. Die Platten wurden bei  $37^\circ\text{C}$  je nach Generationszeit der Mikroorganismen ein bis sieben Tage inkubiert und dann der Durchmesser des Hemmhofes abgelesen und nach NCCLS Kriterien ausgewertet. Bei anspruchsvollen Keimen, zum Beispiel Corynebakterien, wurde dasselbe Prozedere mit Blutplatten und im Brutschrank bei 5 %  $\text{CO}_2$  durchgeführt.

### **2.5.7 Biofilm-Assay**

Jeder gefundene Keim wurde zum Nachweis der Biofilmbildung einem Test nach dem Protokoll für Biofilm-Formationen von O'Toole et al. (1999) unterzogen. Dabei musste zunächst jeweils eine Kolonie in 10 ml TSB in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben über mindestens zehn Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  auf dem Schüttler mit 180 rpm inkubiert werden.

Die Bakterienkultur wurde 1:100 mit dem Originalmedium TSB verdünnt, je 200  $\mu\text{l}$  in drei Vertiefungen einer 96 Wellplatte pipettiert und nach Abdeckung mit Parafilm bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Inhalt des ersten Wells verworfen, mit Puffer gespült und danach mit Kristallviolett angefärbt. Nach 15 Minuten erfolgte eine weitere Spülung mit Puffer. Bei Biofilmbildung war eine bläuliche Färbung der entsprechenden Vertiefung zu sehen.

Nach 72 und 144 Stunden wurden bei gleichem Vorgehen die zweite und dritte Vertiefung bearbeitet. Danach war die Ausbildung des Biofilms einerseits qualitativ nach dem Ausmaß der Blaufärbung und andererseits quantitativ auszuwerten. Die quantitative Messung der

optischen Dichte fand nach Lösung der Farbe mittels Alkohol statt (O'Toole et al., 1999). Dabei wurde die Extinktion bei 450 nm ermittelt.

### **2.5.8 Biofilm-Assay auf metallenen Oberflächen**

Um den Verhältnissen bei einer *in vivo* stattfindenden Implantatsbesiedlung näher zu kommen wurde der Test in Anlehnung an ähnliche Untersuchungen (Bjerkkan et al., 2009) auf metallenen Oberflächen durchgeführt. Zur Testung der Erreger auf Biofilmbildung auf Metall-Oberflächen wurde der oben beschriebene Versuchsaufbau modifiziert. Im ersten Schritt wurde eine Kolonie des zu untersuchenden Bakteriums in 10 ml TSB in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben über mindestens zehn Stunden auf dem Schüttler mit 180 rpm bei 37°C inkubiert. 50 µl dieser Flüssigkultur wurden mit 4950 µl TSB in einem 50 ml Greiner-Röhrchen verdünnt und anschließend mit Hilfe einer sterilen Pinzette ein Metallwürfel von einem Kubikzentimeter Größe in die Flüssigkeit überführt. Diese Metallproben wurden extra zu diesem Zweck hergestellt und nach Verpackung vom Hersteller (Stryker, Duisburg) autoklaviert. Die Röhrchen wurden alle 24 Stunden makroskopisch auf Wachstum überprüft.

### **2.5.9 Untersuchung auf Mischinfektionen mittels PCR/DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)**

Die PCR/DHPLC wurde ursprünglich zum Detektieren von Mutationsanalysen entwickelt (Liu et al., 1998; van Den Bosch et al., 2000). Mittels PCR/DHPLC (WAVE®) ist es aber auch möglich Bakteriengemische aufzutrennen (Domann et al., 2003; Hurtle et al., 2002; Imirzalioglu et al., 2008). Ausgangsmaterial für die Anwendung von DHPLC ist ein 16S rDNA PCR-Amplifikat. Von dem aufgereinigten PCR-Produkt wurden jeweils 15 µl in eine 96-well-Platte pipettiert und der geplante Durchlauf im angeschlossenen Computer einprogrammiert. Dann wurde das Gerät gestartet und nach der Equilibrierungsphase die aufgereinigte DNA auf eine Chromatographiesäule injiziert und danach über 20 Minuten eluiert. Diese DNA wurde aufgrund ihrer Basensequenz im Zusammenspiel mit den Pufferkonzentrationen und der Temperatur unterschiedlich gut und lange an die Säule gebunden. Somit wurden DNA-Proben von unterschiedlichen Sequenzen und verschiedenem GC-Gehalt, aber bei gleicher Länge, zu unterschiedlichen Zeitpunkten von der Säule eluiert.

Durch die Messung der UV-Absorption der Eluate wurden typische Signale, Peaks genannt, generiert, die in einem gemeinsamen Chromatogramm als entsprechendes Profil resultierten. Hierbei repräsentierte jeder Peak ein bestimmtes Amplikon, das sich in der Sequenz von den anderen unterscheidet. Dabei war am Anfang des Profils ein hoher breiter Elutionspeak, der in der ersten Phase der Auswaschung der Chromatographiesäule entstand, zu sehen (Domann et al., 2003). Um nun dem einzelnen Peak den entsprechenden Erreger, durch Amplifizierung und Sequenzierung, zuzuordnen, musste ein zweiter Durchlauf derselben Probe erfolgen. In diesem zweiten Lauf, der auch als Sammellauf bezeichnet wird, wurde die von der Säule eluierte DNA in einer 96-well Platte gesammelt. Dabei wurde alle 30 Sekunden in einer neuen Vertiefung einer 96-well-Platte gesammelt. Zuvor wurde anhand des Chromatogramms der Computer so programmiert, dass ein Peak genau in eine Vertiefung pipettiert wurde.

Aus diesen gesammelten Eluaten wurde die DNA erneut amplifiziert und anschließend sequenziert. Die danach durchgeführten bioinformatischen Analysen ermöglichten in der Regel eine Zuordnung des Bakteriums zu einer Gattung und einer Spezies.



Abbildung 5: WAVE/DHPLC mit angeschlossenem Computer (Transgenomic, Omaha, USA).

### 2.5.10 Ermittlung der Standardkurve für Piko® PCR / DHPLC

Wegen der erstmaligen Kombination der Piko® PCR mit der DHPLC wurde das Verhältnis der Keimzahl vor der Piko® PCR und der Amplitudenhöhe nach der Piko® PCR/DHPLC ermittelt. Der Versuch wurde mit einem *Staphylococcus aureus* durchgeführt.

Aus einer Übernachtskultur des Erregers in TSB wurden 100 µl in 10 ml frisches Medium überführt und auf dem Schüttler mit 180 rpm bei 38°C bebrütet. Nach zwei Stunden war eine optische Dichte von 1,0 erreicht und es wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten bis zur Verdünnung  $10^{-9}$  angelegt. Aus den Verdünnungen erfolgte eine Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer. Danach wurde analog zum Originalmaterial eine DNA-Aufreinigung (Invitak) durchgeführt. Nach der Piko® PCR wurden eine Gelkontrolle und ein Profillauf mittels DHPLC angefertigt. Die ermittelte Standardkurve ist unter 3.3.2 abgebildet.

### 2.5.11 DNA-Sequenzierung

Erfolgreich amplifizierte DNA wurde mittels QIAGEN QIAquick PCR *Purification Kit Protocol* aufgereinigt. Dazu wurden die 44 µl PCR-Produkt mit 220 µl Bindungspuffer gemischt, auf eine Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen aufgetragen und zur DNA-Bindung eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 750 µl Waschpuffer aufgetragen. Nach einer Minute Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der gesammelte Waschpuffer verworfen und erneut eine Minute zentrifugiert. Danach wird die Säule in ein steriles 1,5 ml Röhrchen eingesetzt, mit 30 µl Wasser benetzt und für 5 Minuten inkubiert. Zur Lösung der DNA von der Säule wurde wiederum für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und so die aufgereinigte DNA aufgefangen. Die Sequenzierungen wurden von einem externen Dienstleister (Agowa, Berlin) durchgeführt. Dabei wurde mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger gearbeitet (Dettmer, 2005).

### 2.5.12 Bioinformatische Analyse

Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden in die Internet-Datenbanken des NCBI und Sepsitest eingegeben. Das darauf folgende Suchergebnis zeigte an, ob die eingespeisten Sequenzen auf in der Datenbank hinterlegte Sequenzen passten. Die Suchergebnisse gaben jeweils an wie hoch der Verwandtschaftsgrad der eingespeisten Sequenz zu dem jeweiligen Referenzstamm war. Dabei wurde bei einer Übereinstimmung über 99 % der Sequenzabfolge die Spezies des Erregers und bei einer Übereinstimmung über 95 % die Gattung angegeben. Wenn der in der Ergebnisliste aufgeführte Referenzstamm sich an zweiter Stelle um weniger als 0,5 % von dem erst Genannten unterschied, wurde ebenfalls nur die Gattung genannt.

## **2.5.13 Bestimmung der Entzündungsparameter**

### **2.5.13.1 CRP**

Die Bestimmung des CRP fand aus Serum der Patienten im Zentrallabor der Abteilung für klinische Chemie und Biochemie des UKGM Standort Gießen statt. Zur Anwendung kam die Turbidimetrie, dabei wurde die Trübung im Photometer anhand der Lichtschwächung (Extinktion) eines durch die Suspension direkt durchgehenden Strahls gemessen. Die Intensität des Streulichts im Turbidimeter ist vom CRP-Gehalt der Serumprobe abhängig, so dass durch Vergleich mit Standards bekannter Konzentration der CRP-Gehalt der Probe ermittelt werden kann. Die Bestimmung des CRP wurde von Mitarbeitern des Zentrallabors der Abteilung für klinische Chemie durchgeführt.

### **2.5.13.2 Leukozyten**

Die Bestimmung der Leukozyten fand ebenfalls im Zentrallabor des UKGM Standort Gießen durch dessen Mitarbeiter statt. Die Leukozyten wurden mittels Widerstandsmessprinzip aus EDTA-Blut bestimmt. Dabei wurden zunächst die Erythrozyten durch Lyse zerstört und daraufhin die Leukozyten in einer Suspension verdünnt. Weiter wurde eine Spannung angelegt, aufgrund derer die Leukozyten von einem Pol angezogen wurden. Zwischen der Leukozytensuspension und diesem Pol ist eine nur an einer Kapillaröffnung durchgängige Trennwand und die Leukozyten wurden bei Durchtritt durch diese Kapillaröffnung maschinell gezählt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patienten

Als Studienpopulation wurden 80 Patienten der unfallchirurgischen Klinik der UKGM Standort Gießen mit durch Osteosynthesen versorgten Frakturen zusammengefasst. Der Untersuchungszeitraum umfasste zwölf Monate. Das Geschlechterverhältnis belief sich bei 45 Männern und 35 Frauen auf 1,3:1.

Tabelle 1: Verteilung der Probanden nach Geschlecht

	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit
Weiblich	35	43,8
Männlich	45	56,2
Gesamt	80	100

Das Durchschnittsalter der in die Studie aufgenommenen Patienten betrug zum Untersuchungszeitpunkt 44,2 Jahre. Das Minimalalter lag bei fünf Jahren und das Maximalalter bei 80 Jahren.

Tabelle 2: Verteilung der Probanden nach Alter in Jahren

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
Alter	80	5	80	44,2	43,5

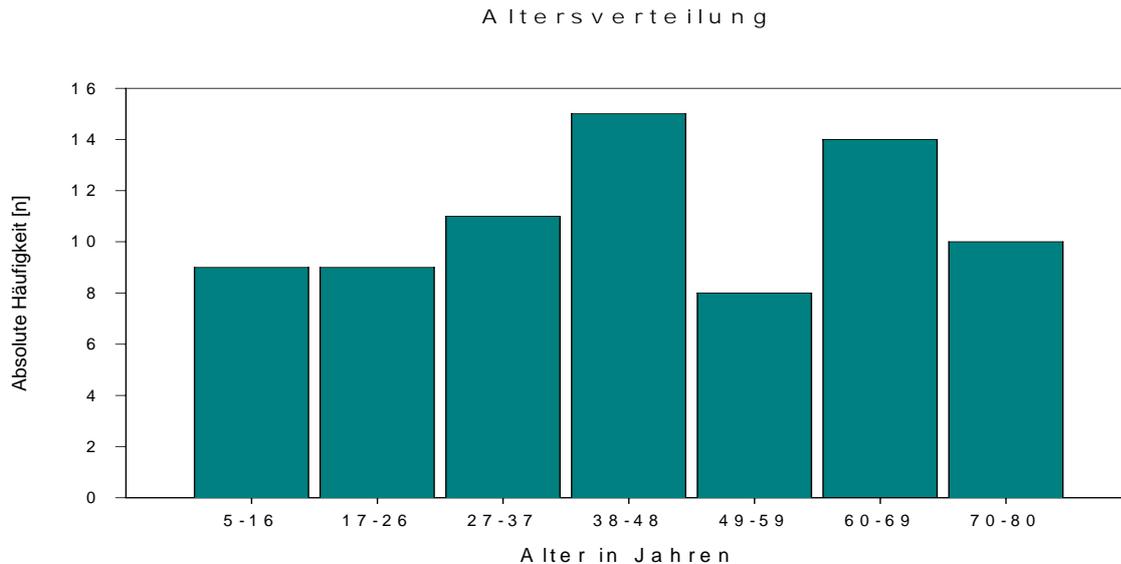


Abbildung 6: Altersverteilung der Patienten.

In jeder Altersklasse befanden sich mindestens acht und maximal 15 Probanden, im Durchschnitt jeweils elf. Unter Abschnitt 3.6.1 wird auf den jeweiligen Anteil besiedelter Implantate der Patienten der verschiedenen Altersklassen eingegangen.

### 3.2 Untersuchtes Osteosynthesematerial

Die 80 Osteosynthesen wurden alle im Rahmen geplanter Operationen explantiert. Die Mehrheit der Fälle, 73 von 80, waren komplikationslose, geplante Metallentfernungen. Bei 6 Patienten mussten Pseudarthrosen revidiert werden und einmal war ein Materialversagen die Ursache der Explantation. Drei Proben wurden von der Studie ausgeschlossen, eine davon wegen offensichtlicher Kontamination bei durchstoßener Transporttüte. Bei den beiden anderen Patienten wurden nur die Gentamycinketten ausgebaut, die aufgrund der Restwirkung des Antibiotikums für die weitere Untersuchung ungeeignet waren.

Bei den untersuchten Materialien handelte es sich um 54 Plattenosteosynthesen vielfältiger Art mit den entsprechenden Schrauben, 16 Schraubenosteosynthesen, acht Verriegelungsmarknägel mit Verriegelungsschrauben und zwei Kirschner-Drähte. Bei 88 % der Osteosynthesen handelte es sich bei dem verarbeiteten Material um Titan, die restlichen 12 % waren Edelstahllegierungen.

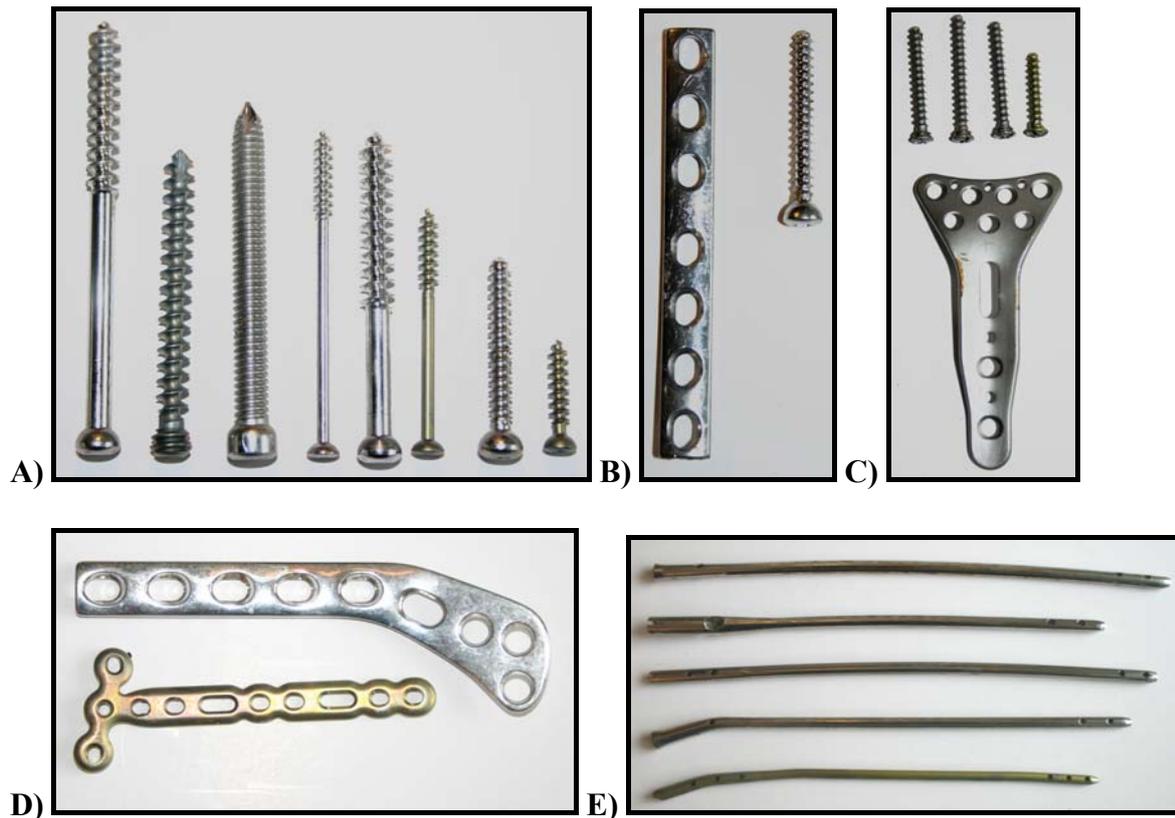


Abbildung 7: Originalmaterialien: A): verschiedene Schraubentypen B): und C): Platten- und Schraubenosteosynthesen D): zwei Plattenosteosynthesen E): unterschiedliche Marknägel

### 3.3 Mikrobiota der Implantate

Zur Erfassung eines möglichst vollständigen Spektrums wurden die Untersuchungsmethoden der Kultivierung und der PCR eingesetzt. Die Kultivierung diente auch der Gewinnung von Isolaten, um die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und die Fähigkeit zur Biofilmbildung zu bestimmen.

#### 3.3.1 Mikrobiologische Kultur

Bei 26 von den 80 (32%) untersuchten Osteosynthesen war makroskopisch eine Trübung der Flüssigkulturen nach 24 bis 48 Stunden zu beobachten, diese war sowohl in dem Röhrchen mit den abgebürsteten Metallteilen in TSB als auch in den TSB- und Thioglykolat-Röhrchen mit der beim Abbürsten angesammelten Kochsalzsuspension zu sehen. Die übrigen 54 Proben wurden kontinuierlich bei 37°C über mindestens drei Wochen bebrütet und regelmäßig kontrolliert. Die Flüssigkultur-Anreicherungen der Abstrichbürsten fielen bei allen Proben

steril aus. Der durchgeführte Test auf Inhibition erbrachte keine Beeinflussung von bakteriellem Wachstum durch die Abstrichbürste. Bei den durchgeführten Ultraschallbad-Reinigungen konnte nur in einem Fall eine bewachsene Flüssigkultur festgestellt werden. In diesem einen Fall erbrachte die Flüssigkulturanreicherung nach Abbürstung dasselbe Ergebnis. In den anderen Fällen blieben die Anreicherungen nach Ultraschallbadreinigung negativ. Aus diesem Grund wird auf die Ultraschallbadreinigung im Folgenden nicht näher eingegangen. Die Nähragarplatten blieben in allen Fällen unbewachsen.



Abbildung 8: Links trübe, rechts ungetrübte Flüssigkultur.

### 3.3.1.1 Keimspektrum der mikrobiologischen Kultur

Von den 26 gefundenen Erregern bildeten die Koagulase-negative Staphylokokken die Mehrheit (53,8 %), am zweithäufigsten waren die *Staphylococcus aureus*-Isolate mit 23,1 % vertreten. Sechs weitere Keime konnten bei je einem Implantat (je 3,8 %) identifiziert werden. Es wurden keine Pilze nachgewiesen.

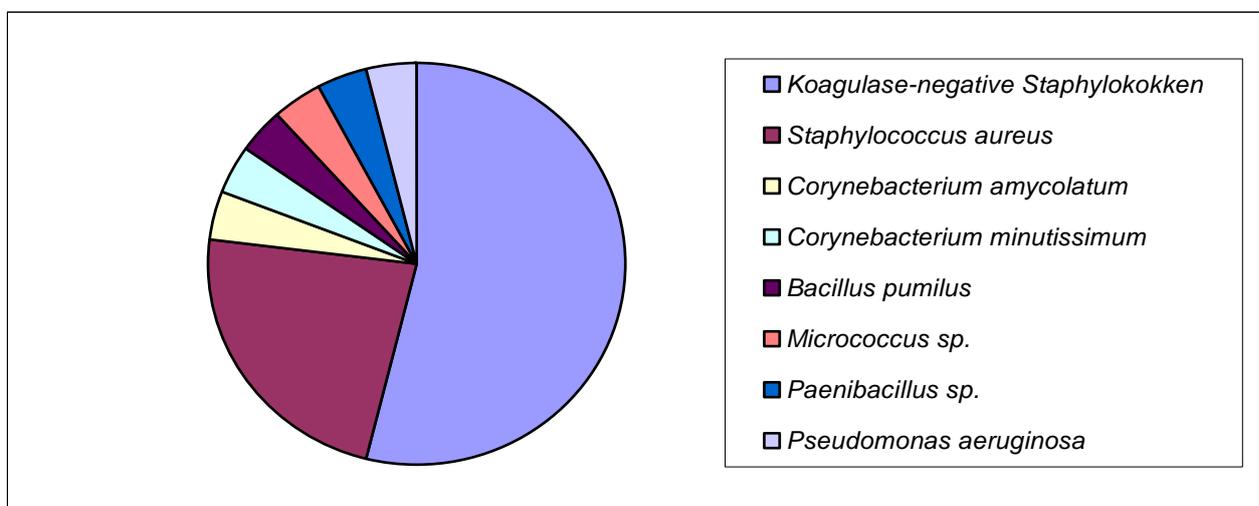


Abbildung 9: Keimspektrum der Flüssigkultur.

Die nachgewiesenen Bakterien gehören zu den Aerobiern. Alle waren grampositive Keime, bis auf den *Pseudomonas aeruginosa*, ein gramnegatives Bakterium. Die Ergebnisse der Kultivierung zeigten, dass immer nur sehr wenige Bakterien vorhanden waren, da sie nur in der Flüssigkultur, in der eine biologische Amplifikation durch Anreicherung stattfindet, wuchsen.

### 3.3.1.2 Antibiotika-Suszeptibilität

Die Untersuchung der 26 gefundenen Erreger auf die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika mittels Agardiffusionsverfahren ließ keine Multiresistenzen erkennen. Die ausgetesteten Antibiotika stammten aus der Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Makrolide, Lincosamide und Glykopeptid-Antibiotika.

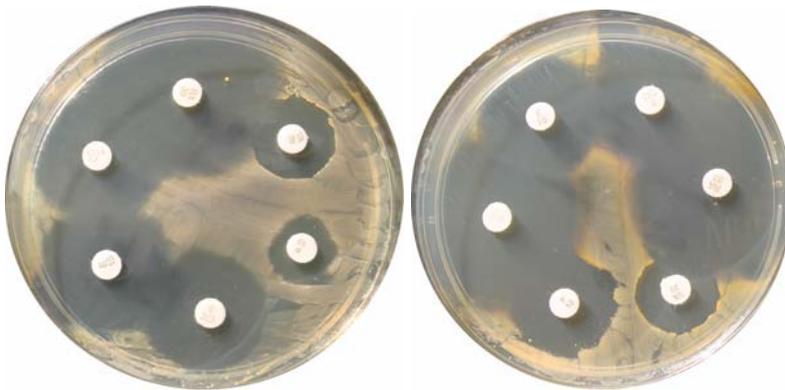


Abbildung 10: Im Agardiffusionsverfahren sind unterschiedlich große Hemmhöfe um die Antibiotikaplättchen zu erkennen. Diese repräsentieren ein sensibles, intermediär-sensibles und resistentes Verhalten gegenüber Antibiotika.

Bei der Auswertung der Sensibilitätstestung wurde die NCCLS-Methode (<http://www.clsi.org/>) (Schwaber et al., 2004) angewandt. Dabei ist die Größe des Hofes um das Antibiotikaplättchen auf den bewachsenen Müller-Hinton-Platten ausschlaggebend.

In der folgenden Abbildung ist dargestellt, wie häufig gegen das auf der Abszisse aufgetragene Antibiotikum unter allen Erregern eine Resistenz vorhanden war.

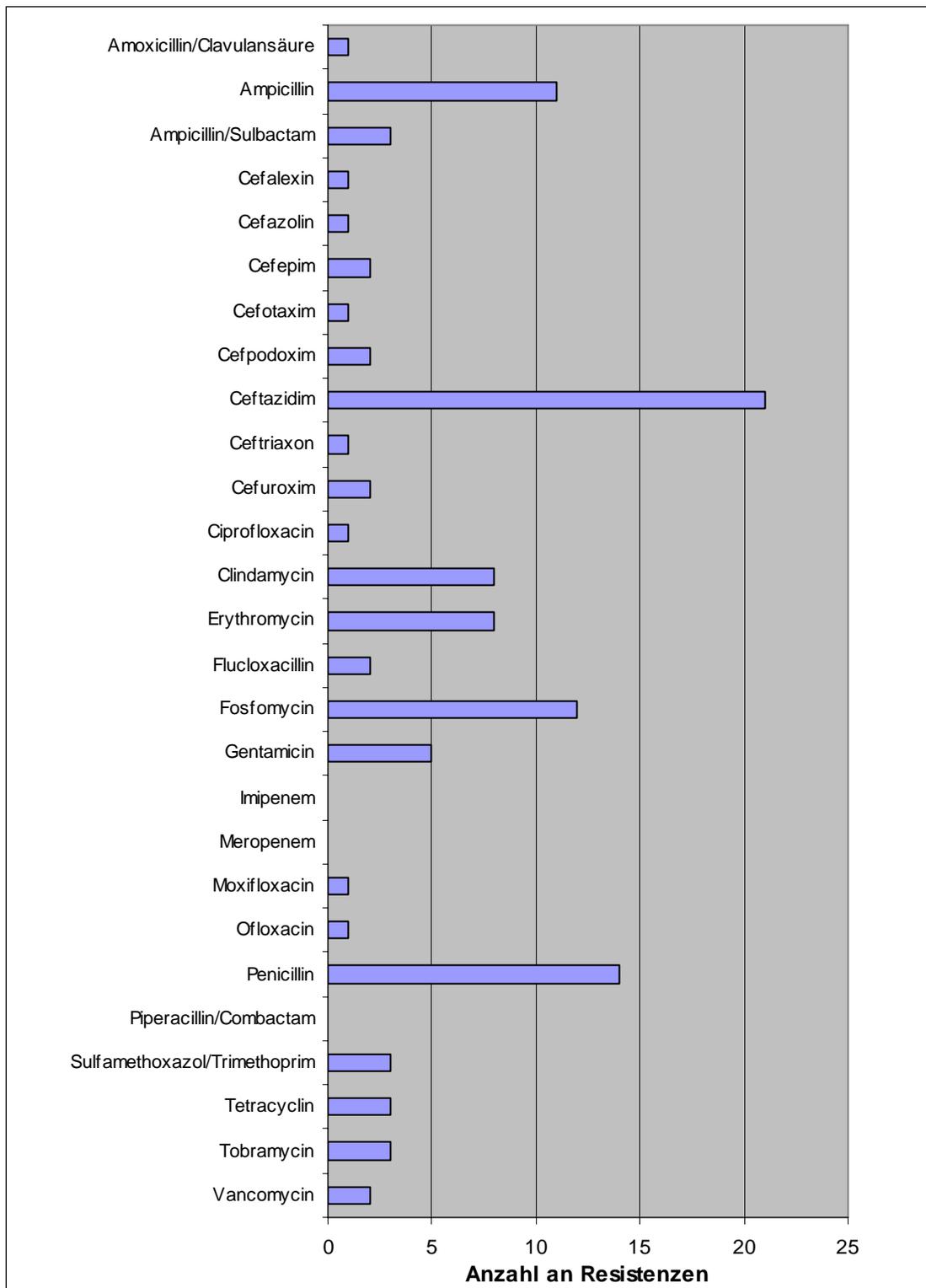


Abbildung 11: Zusammenfassung der vorgefundenen Resistenzen.

Die geringste Wirkwahrscheinlichkeit zeigten Ceftazidim, Penicillin, Fosfomycin und Ampicillin, dicht gefolgt von Erythromycin und Clindamycin. Indessen waren gegen Piperacillin mit Combactam, Imipenem und Meropenem alle Bakterien empfindlich.

Gegen das zur perioperativen Prophylaxe bei Implantation verwendete Cefazolin bestand lediglich bei einem nachgewiesenen Erreger eine Resistenz. Allerdings waren gegen Clindamycin, das aufgrund seiner guten Gewebegängigkeit häufig bei Knocheninfektionen eingesetzt wird, 8 der 26 Erreger resistent (Aktories, 2009).

Die zwei nun folgenden Tabellen geben einen Überblick über das Resistenzprofil der einzelnen Erreger.

Tabelle 3: Resistenzprofil bei Koagulase-negativen Staphylokokken (CNS) und *Staphylococcus aureus* (SA): 0 - resistent, 1 - intermediär sensibel, 2 - sensibel

Probe	3	6	8	10	22	23	29	30	36	45	55	56	72	19	39	40	44	63	68
Antibiotikum / Erreger	Koagulase-negativen Staphylokokken													Staphylococcus aureus					
Amoxicillin/Clavulansäure	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ampicillin	2	2	0	0	2	2	0	0	0	2	2	2	0	2	0	2	0	2	2
Ampicillin/Sulbactam	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2
Cefalexin	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cefazolin	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cefepim	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cefotaxim	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cefpodoxim	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ceftazidim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceftriaxon	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Cefuroxim	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ciprofloxacin	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Clindamycin	2	2	2	2	2	0	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	0	2
Erythromycin	2	2	2	2	2	0	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	0	2
Flucloxacillin	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fosfomycin	0	2	2	0	0	0	2	2	0	2	2	2	2	0	2	0	2	0	2
Gentamicin	0	2	2	0	2	0	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2
Imipenem	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Meropenem	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Moxifloxacin	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ofloxacin	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Penicillin	2	2	0	0	2	2	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
Piperacillin/Combactam	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sulfamethoxazol/Trimethoprim	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tetracyclin	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tobramycin	0	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2
Vancomycin	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Tabelle 4: Resistenzprofil der übrigen Erreger

Probe	24	1, 28	49	75	32
Antibiotikum / Erreger	Bacillus	Corynebacterium	Micrococcus	Paenibacillus	Pseudomonas
Amoxicillin/Clavulansäure	2	2	1	1	0
Ampicillin	0	1	1	0	0
Ampicillin/Sulbactam	2	2	1	0	0
Cefalexin	1	2	1	2	0
Cefazolin	1	2	1	2	0
Cefepim	0	0	1	1	2
Cefotaxim	0	1	1	1	1
Cefpodoxim	0	1	1	1	0
Ceftazidim	0	0	1	1	2
Ceftriaxon	0	1	1	1	1
Cefuroxim	0	1	1	1	0
Ciprofloxacin	2	1	1	1	2
Clindamycin	0	0	0	0	0
Erythromycin	0	0	0	0	0
Flucloxacillin	0	2	1	1	0
Fosfomycin	0	0	1	0	0
Gentamicin	2	0	1	2	2
Imipenem	2	2	2	2	2
Meropenem	2	2	2	2	2
Moxifloxacin	2	2	1	1	2
Ofloxacin	2	1	1	2	2
Penicillin	0	1	1	2	0
Piperacillin/Combactam	1	2	1	1	2
Sulfamethoxazol/Trimethoprim	2	0	1	0	0
Tetracyclin	2	0	1	2	0
Tobramycin	2	1	1	1	2
Vancomycin	0	2	1	2	0

Die Ergebnisse zeigen, dass alle *Staphylococcus aureus* Stämme gegen Flucloxacillin, dem Nachfolgepräparat von Methicillin, empfindlich sind. Das heißt, es konnte kein Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) gefunden werden.

### 3.3.2 PCR/DHPLC

Die Untersuchung des Materials mit einer 2-Schritt-PCR unter Verwendung der *Thermus aquaticus*-DNA-Polymerase in einem herkömmlichen Thermocycler fiel in allen Fällen negativ aus. Da bei einem Teil dieser negativ ausgefallenen PCR-Ergebnisse in der kulturellen Anzucht ein Keimnachweis gelungen war, wurde ein sensitiveres PCR-Verfahren mit einer anderen Polymerase getestet. Dabei wurden zur Austestung Proben aus der mikrobiologischen

Routinediagnostik verwendet. Einschlusskriterium war, dass das Untersuchungsmaterial in der Flüssigkultur zu einer Trübung führte, während die Nähragarplatten steril geblieben waren und der Erregernachweis mittels herkömmlicher PCR nicht gelang.

Die Untersuchung der Proben mit dem Piko® Thermal Cycler erbrachte eine deutliche Bande in der Gelelektrophorese. Dagegen fiel die PCR im herkömmlichen Thermocycler negativ aus. Zur näheren Begutachtung dieser unterschiedlichen Ergebnisse wurde mit beiden PCR-Produkten eine DHPLC-Untersuchung durchgeführt. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

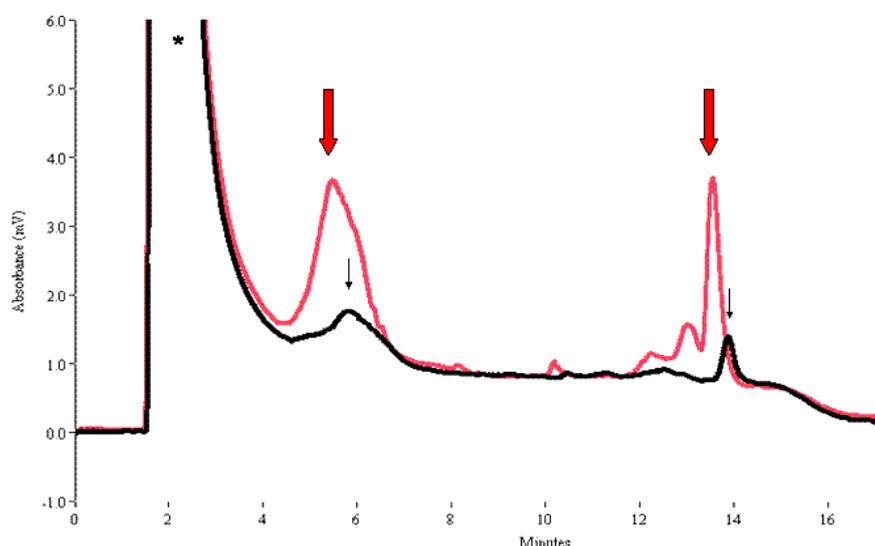


Abbildung 12: DHPLC-Analyse des PCR-Produkts des Piko® Thermal Cycler  und des PCR-Produkts eines herkömmlichen Thermocyclers  bei gleichem Ausgangsmaterial. \* Elutionspeak (Domann et al., 2003).

Die PCR/DHPLC-Untersuchung aus dem herkömmlichen und aus dem Piko® Thermal Cycler ist in Abbildung 12 dargestellt. Das Ergebnis des Piko® PCR Produkts, welches der roten Kurve entspricht, lässt zwei hohe Peaks erkennen mit Amplituden von je 3,8 mV. Auch im Profillauf des PCR-Produkts des herkömmlichen Thermocyclers, schwarze Kurve, sind zwei Peaks zu erkennen, aber mit einer deutlich niedrigeren Amplitude von 1,8 und 1,5 mV. Eine Amplifizierung solch niedriger Peaks erbrachte aufgrund der niedrigen DNA-Menge schlechte oder keine Ergebnisse nach Sequenzierung.

Um das Verhältnis von Keimanzahl vor Piko® PCR und Amplitudenhöhe nach PCR/DHPLC zu bestimmen wurde eine Standardkurve angefertigt und ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Der Versuch ist im Abschnitt 2.5.10 beschrieben.

Tabelle 5: Gemittelte Messergebnisse zur Erstellung der Standardkurve.

	S.aureus/ml	Absorption (mV)		S.aureus/ml	Absorption (mV)
<b>1. Verdünnung</b>	7488000	27,4	<b>5. Verdünnung</b>	0,35	2,3
<b>2. Verdünnung</b>	23100	17,8	<b>6. Verdünnung</b>	0	2
<b>3. Verdünnung</b>	125	7,6	<b>7. Verdünnung</b>	0,001	0
<b>4. Verdünnung</b>	13,5	3,3	<b>8. Verdünnung</b>	0	0

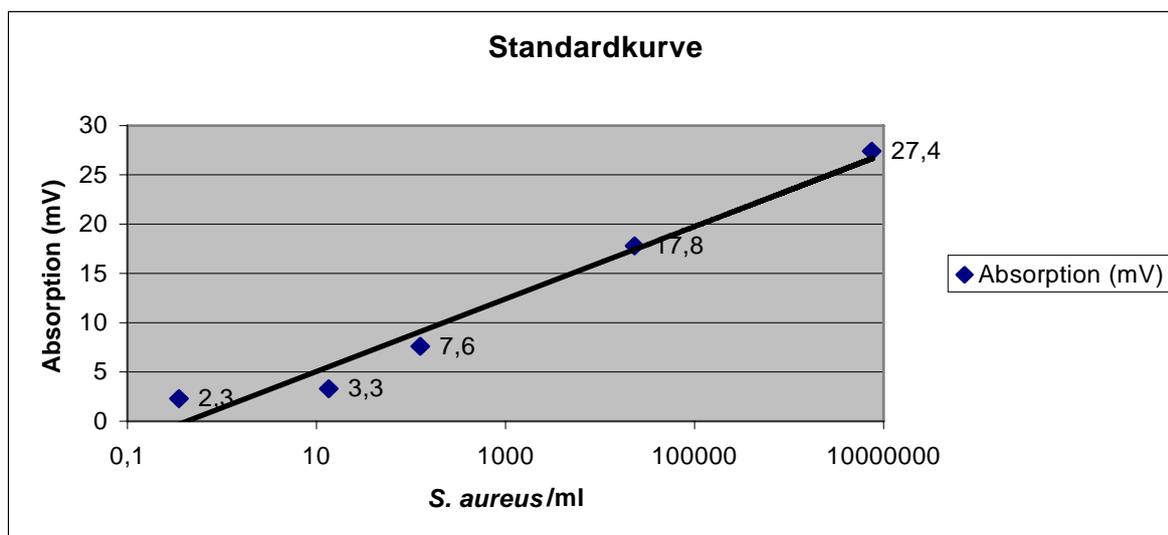


Abbildung 13: Standardkurve zur Kalkulation der Bakterienzahl nach der Amplitudenhöhe, hier *Staphylococcus aureus*. Logarithmische Darstellung mit Regressionsgerade.

Die Untersuchung zur Aufstellung der Standardkurve ergab für den untersuchten *Staphylococcus aureus*, dass bereits bei 13 Erregern pro Milliliter aufgereinigtem Originalmaterial im Chromatogramm der DHPLC eine Amplitude von 3,3 mV ausschlägt. Bei 125 *Staphylococcus aureus* pro Milliliter war die Amplitude bereits bei 7,6 mV. Bei 125 Erregern pro Milliliter befinden sich rechnerisch in den 5 µl aufgereinigtem Originalmaterial 0,625 Zellen.

Daraufhin wurde dasselbe DNA-Extrakt mit dem Piko® Thermal Cycler, einer PCR mit einer neuen DNA Polymerase aus *Pyrococcus*, amplifiziert. Mit diesem Verfahren konnte in 52 von 80 Fällen erfolgreich DNA nachgewiesen werden. Diese PCR-Produkte wurden mittels DHPLC (WAVE®) auf Bakteriengemische untersucht. Die Ergebnisse der DHPLC wurden in Form von Amplituden ausgegeben. Zur Verdeutlichung werden drei beispielhafte Kurvenverläufe und die durch erneute Amplifizierung und Sequenzierung zugeordneten Erreger-Bezeichnungen dargestellt.

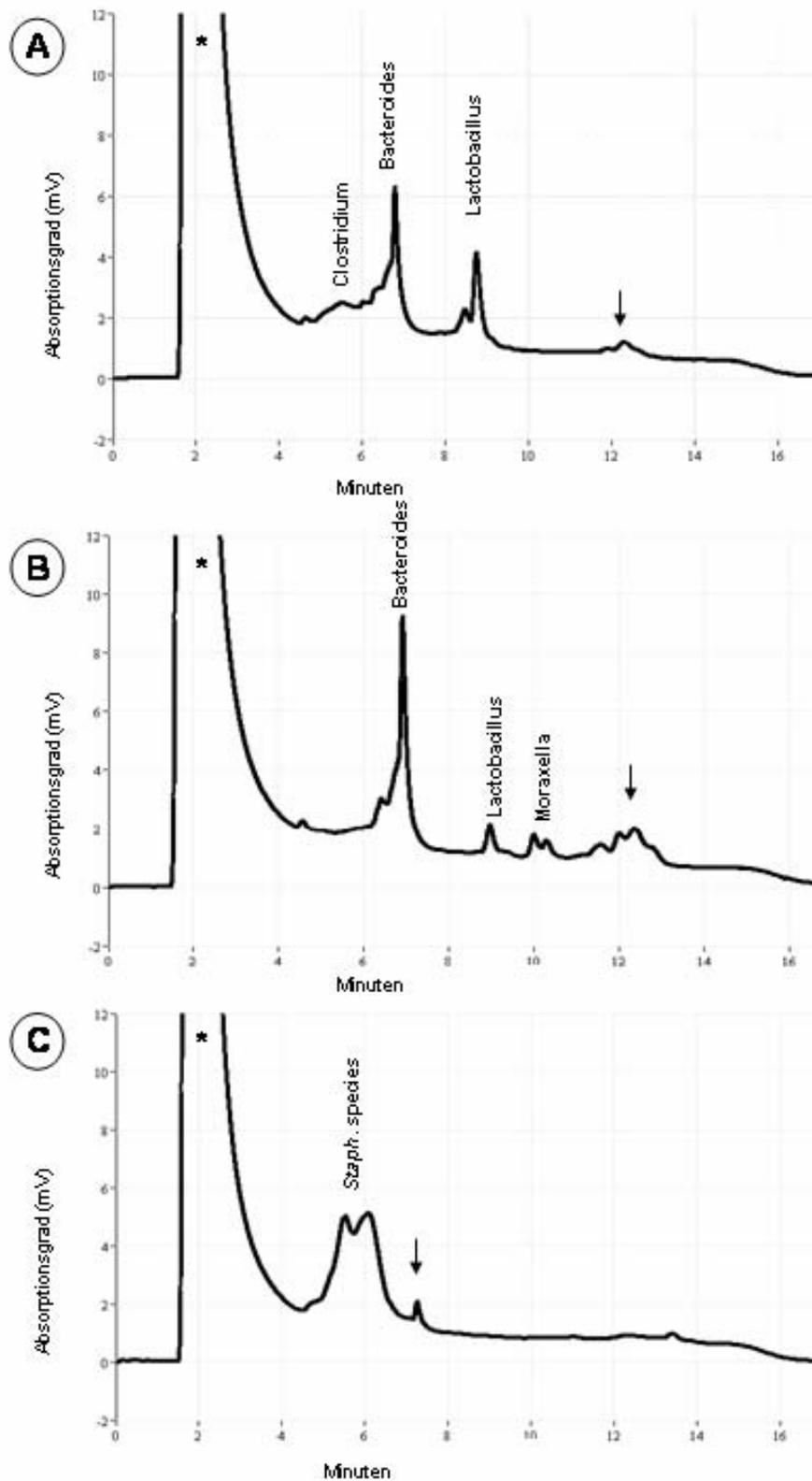


Abbildung 14: Charakteristische Auswahl dreier DHPLC-Analysen mit zugeordneten Sequenzierergebnissen. Bei A handelt es sich um Probe 43, bei B um Probe 49 und bei C um Probe 9. Die Sequenzierung der mit ↓ gekennzeichneten Peaks erbrachte kein Ergebnis. (\*) Elutionspeak.

### 3.3.2.1 Keimspektrum aus PCR/DHPLC

Das Spektrum der mit Hilfe der PCR/DHPLC nachgewiesenen Erreger ist im folgenden Kreisdiagramm dargestellt. Es konnte keine Pilz-DNA nachgewiesen werden. Wie bereits in der kulturellen Anzucht konnten auch hier die Staphylokokken am zahlreichsten nachgewiesen werden.

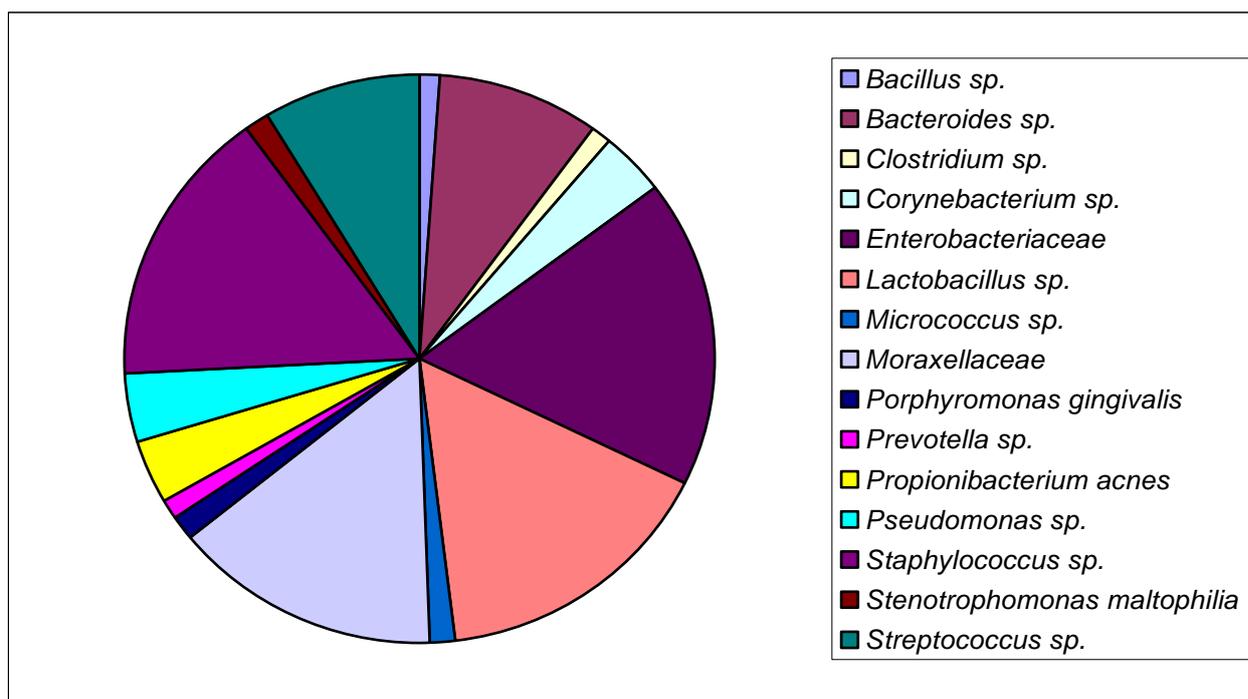


Abbildung 15: Keimspektrum der PCR/DHPLC-Analyse.

Von allen nachgewiesenen Bakterien waren *Bacteroides sp.*, *Clostridium sp.*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella sp.* und *Propionibacterium acnes* den Anaerobiern zuzuordnen. An aeroben und mikroaerophilen Bakterien wurden *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Streptococcus sp.* nachgewiesen.

Der amplifizierte Abschnitt der 16S rDNA machte bei vielen Bakterien keine genaue Zuordnung der Erreger zu einer Spezies möglich. Das lag daran, dass sich die Spezies einer Gattung innerhalb dieses amplifizierten Stückes häufig zu wenig unterscheiden, um sie sicher voneinander abzugrenzen. Diese Problematik bei Bakterienspeziesidentifizierungen anhand der 16S rDNA ist in verschiedenen Studien bereits untersucht worden.

Eine unzureichende Trennung der Spezies fällt besonders bei den Streptokokken (Chen et al., 2004; Kawamura et al., 1995), den Enterokokken (Patel et al., 1998) und den Corynebakterien (Bosshard et al., 2003) auf.

Auch wenn eine genaue Speziesbestimmung somit nicht möglich war, sind einzelne Spezies in der bioinformatischen Sequenzanalyse besonders häufig vorgekommen. Bei den Staphylokokken waren neben *Staphylococcus aureus* auch Koagulase-negative Staphylokokken-Spezies *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* und *Staphylococcus simiae* oft als Analyseergebnis zu finden. Aus der Familie der Enterobacteriaceae waren häufig vertretene Gattungen *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* und *Klebsiella*. Bei den Streptokokken gehörten *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus pyogenes* zu den oft in der Sequenzanalyse vertretenen Spezies. Aus der Familie der Lactobacillaceae waren zwei Spezies vertreten, *Lactobacillus paracasei* und *Lactobacillus rhamnosus*. Bei der Familie der Moraxellaceae fanden sich meistens die Gattungen *Acinetobacter*, *Moraxella* und *Psychrobacter*.

### 3.4 Biofilme

Alle 26 Erreger wurden auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung untersucht. Dabei wurde zunächst der standardisierte Biofilm Formation Assay (O'Toole et al., 1999) durchgeführt. Des Weiteren wurde daraus ein Versuchsansatz moduliert, der den Bakterien anstatt der Plastikoberfläche eine Metalloberfläche aus Implantatmaterial bietet. So sollte den *in vivo* gegebenen Verhältnissen möglichst genau entsprochen werden.

#### 3.4.1 Ergebnisse Biofilm Formation Assay

Gemäß dem Studienprotokoll wurde mit den isolierten Erregern ein Biofilm-Assay auf Kunststoffoberfläche durchgeführt. Hierbei fand sich bei 16 der 26 Erreger eine Biofilmbildung nach 1 bis 6 Tagen Inkubation. Es handelt sich hierbei um 14 Koagulase-negative Staphylokokken, 6 *Staphylococcus aureus*, einen *Micrococcus* sp. und einen *Paenibacillus* sp.

In der folgenden Tabelle sind Beispielbilder für verschiedene Biofilmausprägungen dargestellt und die zugeordneten qualitativen Zahlenwerte aufgeführt. In der rechten Spalte sind außerdem die zugehörigen arithmetischen Mittelwerte der quantitativen Dichtemessung nachzulesen. Die Werte entsprechen der Extinktion bei 450 nm.

Tabelle 6: Die qualitative Beurteilung der Biofilme erfolgte nach Anfärbung mit dem Farbstoff *crystal violet* (CV). Bei der Auswertung wurden ansteigende Zahlenwerte bei zunehmender Biofilmbildung verwendet. Für die quantitative Messung der relativen Dichte wurde der Biofilm mit Ethanol gelöst. Diese Tabelle fungiert als Legende zur Abbildung 16 und 17.

Qualitative Beurteilung der Biofilme		Beispielbilder nach Färbung mit CV, vor Lösung in Ethanol	Quantitative Messung der Biofilme: Mittelwerte der relativen Dichte $\pm$ SD
Optische Ausprägung	Entsprechender Zahlenwert		
<b>Kein Biofilm</b>	0		$0,027 \pm 0,014$
<b>Schwacher Biofilm</b>	1		$0,056 \pm 0,021$
<b>Deutlicher Biofilm</b>	2		$0,074 \pm 0,018$
<b>Starker Biofilm</b>	3		$0,096 \pm 0,031$

Eine genauere Auswertung des Zusammenspiels des qualitativen und quantitativen Ausmaßes erlaubt die folgende Abbildung.

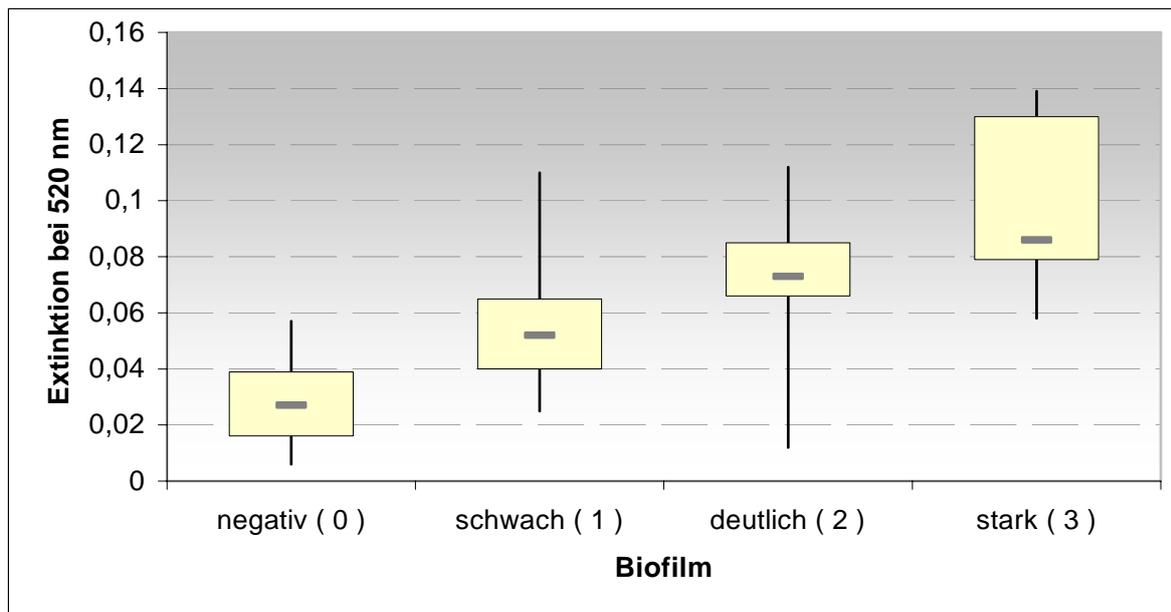


Abbildung 16: Boxplot-Diagramm mit Verteilung der quantitativ gemessenen relativen Dichte bezogen auf die qualitative Zuordnung zu keinem, schwachem, deutlichem und starkem Biofilm.

Dargestellt sind die quantitativ gemessenen Extinktionen auf der Ordinate und die qualitativ ausgewerteten Ausprägungen der Biofilme in vier Kategorien auf der Abszisse. Zu jeder Kategorie gibt es eine Kastengrafik, bei der die Box den Interquartilsabstand darstellt und der darin liegende Querstrich für den Median steht. Die Längsstriche stellen den Bereich dar, in dem sich alle Werte streuen. Die quantitative Messung der Dichte korreliert gut mit der qualitativen Beurteilung der optisch sichtbaren Biofilme. Median und Interquartilsabstand steigen deutlich in jeder Gruppe an.

In den drei folgenden Stabdiagrammen ist die Ausprägung der Biofilme der einzelnen Bakterien dargestellt. Im ersten Diagramm für alle Koagulase-negativen Staphylokokken, im zweiten für *Staphylococcus aureus* und im dritten für die weiteren Erreger. Dabei bezieht sich die Skalierung der Ordinate auf die qualitative Bewertung des gebildeten Biofilms.

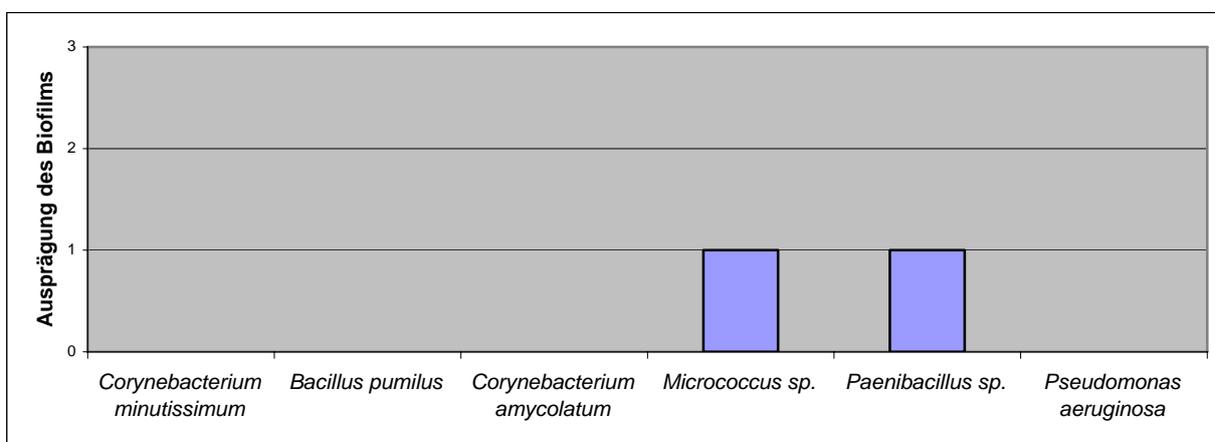
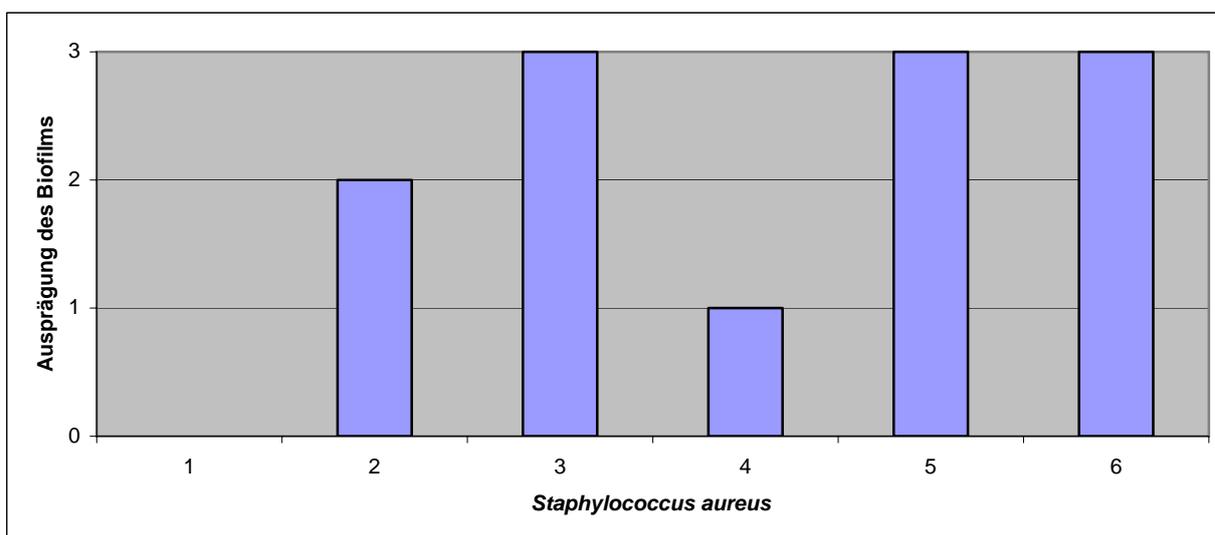
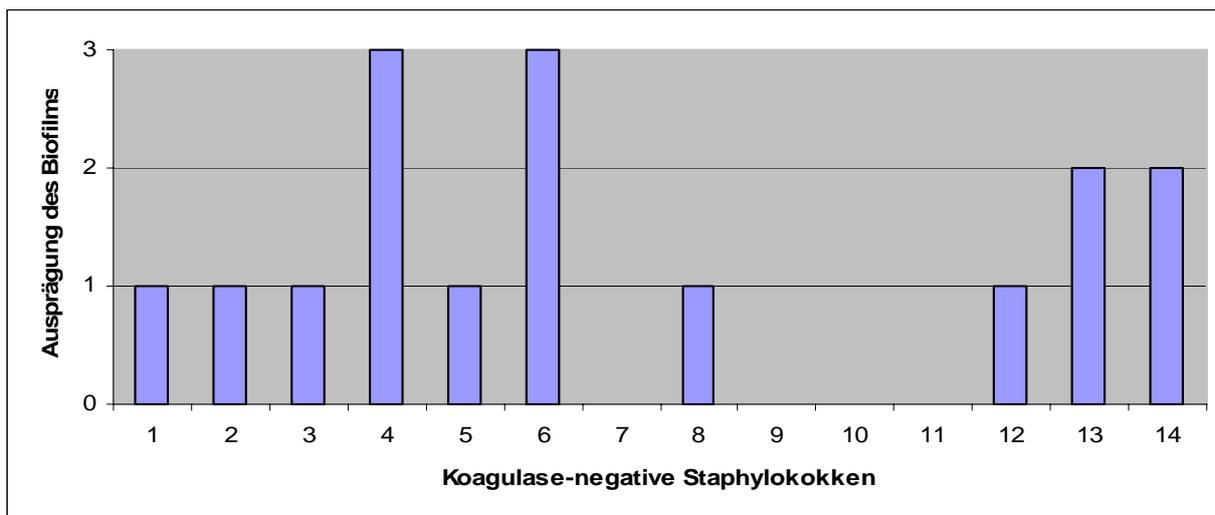


Abbildung 17: Biofilmbildung bei den verschiedenen Erregern. Legende zur Veranschaulichung der Ausprägung der Biofilme siehe Tabelle 6.

Im Überblick der drei verschiedenen Diagramme zeigt sich *Staphylococcus aureus* als häufigster (83 %) und am ausgeprägtesten biofilmbildende Keim.

Bei den Koagulase-negativen Staphylokokken zeigten 71% der Keime ein positives Ergebnis. Von den anderen sechs einzelnen Erregern zeigten nur der *Micrococcus* und der *Paenibacillus* eine schwache Biofilmbildung.

### 3.4.2 Biofilmbildung auf metallenen Oberflächen

Nach dem erstellten Protokoll wurde mit den isolierten Erregern ein Biofilm-Assay auf Metalloberfläche durchgeführt. Hierbei fand sich bei 15 der 26 Erreger eine Biofilmbildung nach einem Tag Inkubation. Eine Quantifizierung der Ausprägung ist nicht vorgenommen worden. Die Testung wurde jeweils sowohl auf einem Würfel aus Edelstahl als auch einem aus Titan durchgeführt. Das Material hatte in unserer Untersuchung keinen Einfluss auf die Ausbildung eines Biofilms, weswegen in der Auswertung der Ergebnisse nicht näher darauf eingegangen wird. Bei der Betrachtung der untersuchten Bakterien ergeben sich folgende Erkenntnisse:

- Die Hälfte der 16 untersuchten Koagulase-negativen Staphylokokken bildet auf Metall einen Biofilm.
- Fünf der sechs *S. aureus* besiedeln die Oberfläche des Metallwürfels.
- Von den anderen Erregern zeigt der *Paenibacillus* ein den Staphylokokken verwandtes flächiges Wachstumsmuster, während die Besiedlungsform des *Pseudomonas* an einen Schweif erinnert.

Auf den folgenden Aufnahmen sind die unterschiedlichen Biofilme makroskopisch gut zu erkennen.

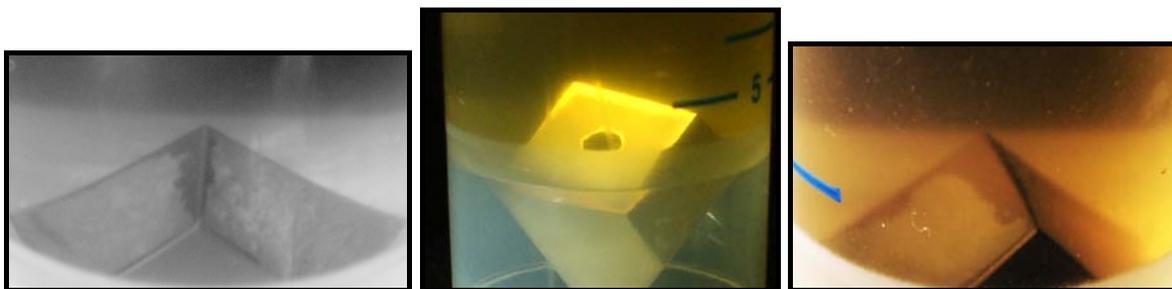


Abbildung 18: Flächiger Biofilm auf Metallwürfel, hier *Staphylococcus aureus*.



Abbildung 19: Schweifartiges Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* auf Metallwürfel.

### 3.4.3 Vergleich Biofilm auf Plastik versus Metall

Bei 72 % der untersuchten Erreger sind die Ergebnisse des herkömmlichen Biofilm Formation Assays und des modulierten Tests auf metallenen Oberflächen übereinstimmend. Zwei der untersuchten Bakterien bildeten auf metallenen Oberflächen einen Biofilm aus, während sie auf Plastikoberflächen nicht dazu in der Lage waren. Bei beiden handelte es sich um Koagulase-negative Staphylokokken. Einzig auf der Plastikoberfläche zeigten hingegen vier Koagulase-negative Staphylokokken und ein *Micrococcus* eine Biofilmbildung.

### 3.5 Metagenom-Ergebnisse aus kulturellem und molekularem Nachweis

Bei den 80 untersuchten Osteosynthesen waren nach dem Aufbrechen besiedelnder Biofilme durch die neu etablierte Bürsten-Reinigungs-Methode bei 58 der 80 Proben der Nachweis eines oder mehrerer besiedelnder Mikroorganismen möglich. Nach Zusammenfassung der Ergebnisse der kulturellen Anzucht und der angewendeten molekularbiologischen Methoden ergibt sich das in der folgenden Abbildung dargestellte Keimspektrum.

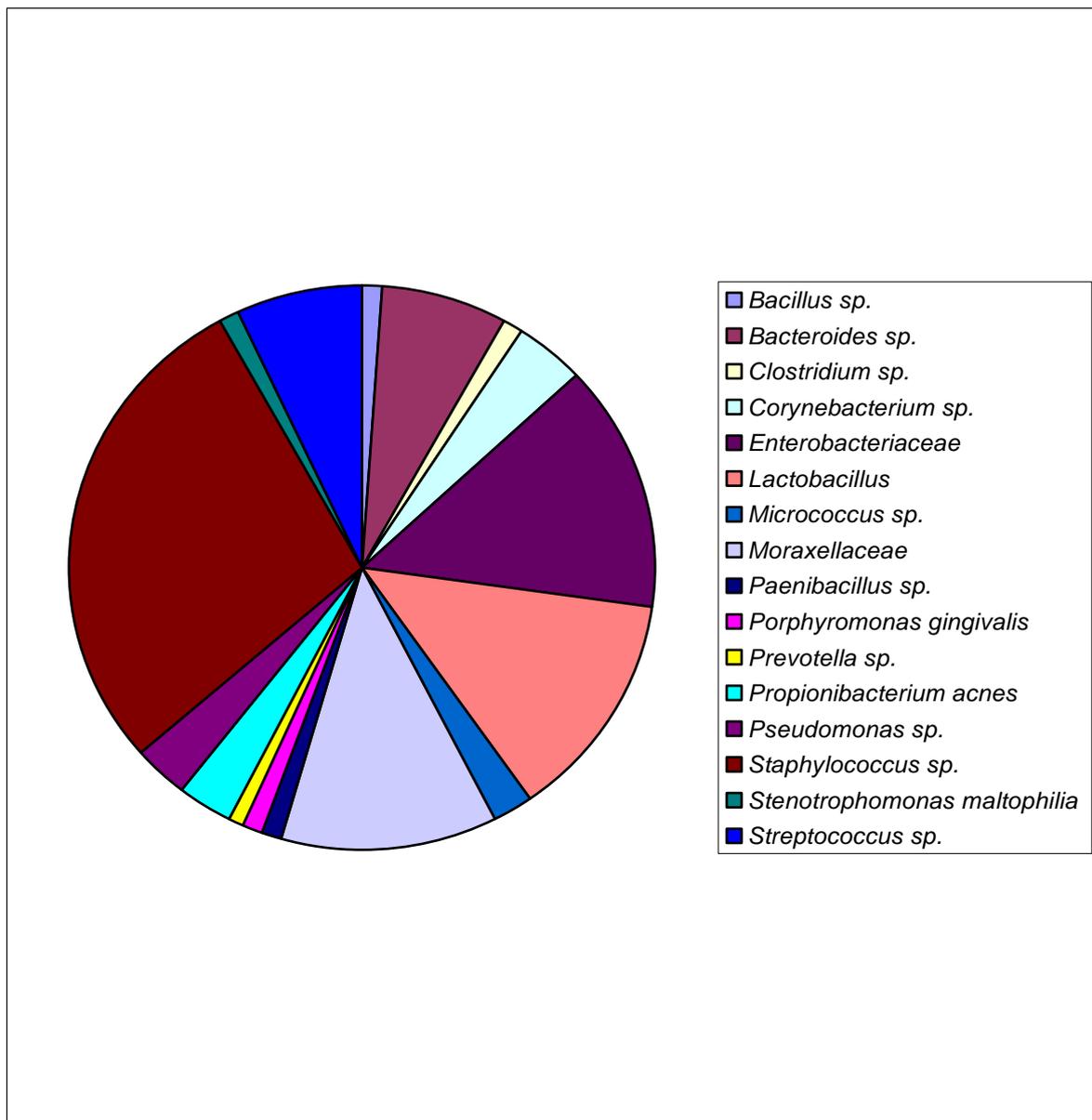


Abbildung 20: Metagenom-Ergebnisse aus Kultur und PCR / DHPLC.

Die Metagenom-Ergebnisse aus den unterschiedlichen Untersuchungsmethodiken erbringen ein deutlich verbreitetes Keimspektrum. Am häufigsten waren mit 28 % Staphylokokken nachzuweisen, in 13 % der Fälle waren Enterobakterien, Lactobazillen und Moraxellen zu finden. Die übrigen Erreger sind namentlich in der Abbildung 21 erwähnt und machen jeweils zwischen einem und sieben Prozent aus.

In der folgenden Tabelle sind ausschließlich die Ergebnisse der besiedelten Proben angegeben.

Tabelle 7: Metagenom-Ergebnisse der Untersuchung: Neben der Probennummer sind das Geschlecht des Patienten und die nachgewiesenen Erreger aufgelistet.

Probe	Geschlecht	Erreger	Probe	Geschlecht	Erreger
1	w	<i>Corynebacterium sp.</i>	43	m	<i>Bacteroidacea</i> <i>Clostridium sp.</i> <i>Lactobacillus sp.</i>
3	m	<i>Staphylococcus sp.</i>	44	m	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Staphylococcus sp.</i>
6	w	<i>Staphylococcus sp.</i>	45	m	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i>
7	m	<i>Streptococcus sp.</i>	46	w	<i>Streptococcus sp.</i>
8	w	<i>Staphylococcus sp.</i>	47	w	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Staphylococcus sp.</i>
9	w	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i>	48	w	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
10	m	<i>Corynebacterium sp.</i> <i>Propionibacterium sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i>	49	m	<i>Bacteroidacea</i> <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Micrococcus sp.</i> <i>Moraxellaceae</i>
18	w	<i>Moraxellaceae</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	50	m	<i>Enterobacteriaceae</i>
19	m	<i>Moraxellaceae</i> <i>Staphylococcus sp.</i>	52	w	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Lactobacillus sp.</i>
20	w	<i>Moraxellaceae</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	55	m	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Staphylococcus sp.</i>
21	m	<i>Moraxellaceae</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	56	m	<i>Staphylococcus sp.</i>
22	w	<i>Staphylococcus sp.</i>	57	w	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Micrococcus sp.</i>
23	w	<i>Moraxellaceae</i> <i>Staphylococcus sp.</i>	58	w	<i>Enterobacteriaceae</i>
24	m	<i>Bacillus sp.</i> <i>Moraxellaceae</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	59	m	<i>Bacteroidacea</i> <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Moraxellaceae</i>
25	m	<i>Prevotella sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i>	60	w	<i>Enterobacteriaceae</i>
27	w	<i>Moraxellaceae</i>	61	m	<i>Staphylococcus sp.</i>
28	w	<i>Corynebacterium sp.</i> <i>Moraxellaceae</i>	62	m	<i>Enterobacteriaceae</i>
29	m	<i>Bacteroidacea</i> <i>Staphylococcus sp.</i>	63	w	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Staphylococcus sp.</i>
30	w	<i>Moraxellaceae</i> <i>Staphylococcus sp.</i>	64	m	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Lactobacillus sp.</i>
31	m	<i>Moraxellaceae</i> <i>Streptococcus sp.</i>	65	m	<i>Staphylococcus sp.</i>
32	m	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66	w	<i>Bacteroidacea</i>
35	m	<i>Staphylococcus sp.</i>	67	m	<i>Pseudomonas sp.</i>
36	m	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i>	68	m	<i>Staphylococcus sp.</i>
37	w	<i>Lactobacillus sp.</i>	70	w	<i>Enterobacteriaceae</i>
38	m	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i>	71	w	<i>Bacteroidacea</i>
39	m	<i>Staphylococcus sp.</i>	72	w	<i>Staphylococcus sp.</i>
40	w	<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i>	73	w	<i>Streptococcus sp.</i>
41	m	<i>Lactobacillus sp.</i>	75	m	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Paenibacillus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i>
42	m	<i>Bacteroidacea</i> <i>Lactobacillus sp.</i>	80	w	<i>Corynebacterium sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i>

Die Tabelle 7 führt alle 58 Proben auf, bei denen ein Keimnachweis gelang. Dabei sind in 59 % mehr als ein besiedelnder Erreger und somit eine polymikrobielle Kolonisation festgestellt worden.

### **3.6 Korrelation der Ergebnisse mit den klinischen Daten der Patienten**

Alle in die Studie aufgenommenen Patienten unterzogen sich einer geplanten Osteosynthese-Explantation, die nicht im Zusammenhang mit einer Implantatinfektion stand. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten bei annähernd drei Viertel der Patienten eine Besiedlung des Implantats. Die nun folgenden Darstellungen sollen mögliche Wechselbeziehungen zwischen der Besiedlung der Implantate und der Klinik der Patienten offen legen.

#### **3.6.1 Geschlecht der Patienten**

Von den 35 Proben weiblicher Patienten wurde bei 76 % eine Besiedlung nachgewiesen. Bei den Osteosynthesen der männlichen Probanden waren 71 % mikrobiell besiedelt.

#### **3.6.2 Alter der Patienten**

Bei den Patienten, von deren Osteosynthesematerial Erreger kultiviert werden konnten, betrug das Alter im Mittel 42,5 Jahre, was auch dem Median entspricht. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Korrelation der Altersklassen der Patienten und die Anzahl der besiedelten Osteosynthesen.

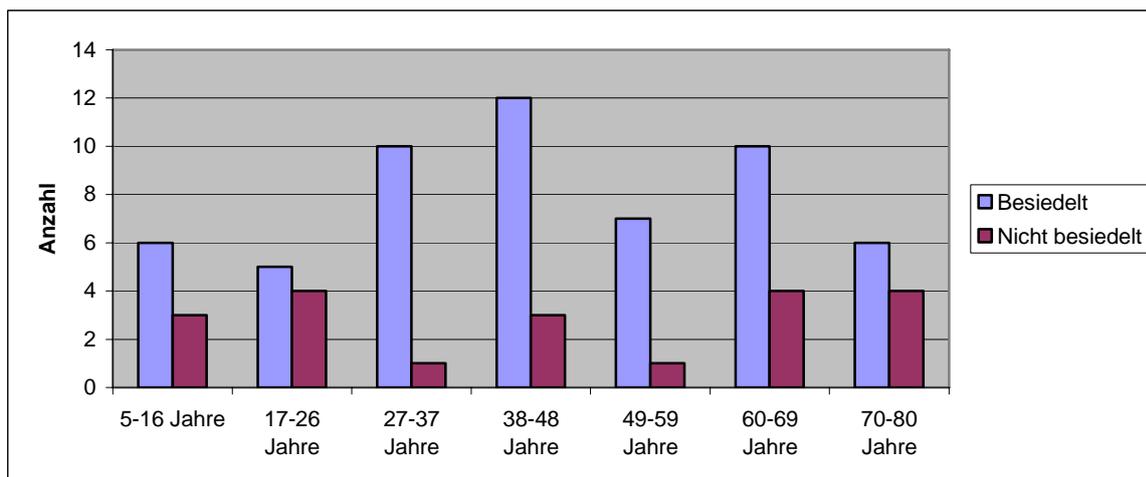


Abbildung 21: Korrelation vom Alter der Patienten und der Kolonisation der Implantate.

Die absolute Häufigkeit der besiedelten Implantate in den sieben Altersklassen ergibt annähernd eine Normalverteilung. In den beiden Randgruppen gibt es je sechs besiedelte Implantate von neun beziehungsweise zehn im Gesamten. Bei den drei Altersgruppen im Mittelfeld, von 27 bis 59 Jahren, sind anteilmäßig die meisten besiedelten Implantate zu finden, sie machen 85 % aller Implantate in den drei Altersgruppen und die Hälfte der Gesamtmenge der besiedelten Osteosynthesen aus.

### 3.6.3 Frakturlokalisation

Das untersuchte Material stammte von Frakturen verschiedener kurzer Knochen wie beispielsweise Wirbelknochen oder Röhrenknochen wie dem Femur. Die untersuchten Implantate wurden zur Frakturversorgung folgender alphabetisch aufgezählter Lokalisationen eingesetzt: *Articulatio talocruralis* (Oberes Sprunggelenk), *Calcaneus* (Fersenbein), *Clavicula* (Schlüsselbein), *Femur* (Oberschenkelknochen), *Humerus* (Oberarmknochen), *Manus* (Hand), *Radius* (Speiche), *Sacrum* (Kreuzbein), *Tibia* (Schienbein), *Ulna* (Elle), *Vertebra lumbalis* (Lendenwirbelknochen). Das folgende Kreisdiagramm veranschaulicht die jeweils relative Häufigkeit des frakturierten Knochens an allen hier untersuchten Patienten.

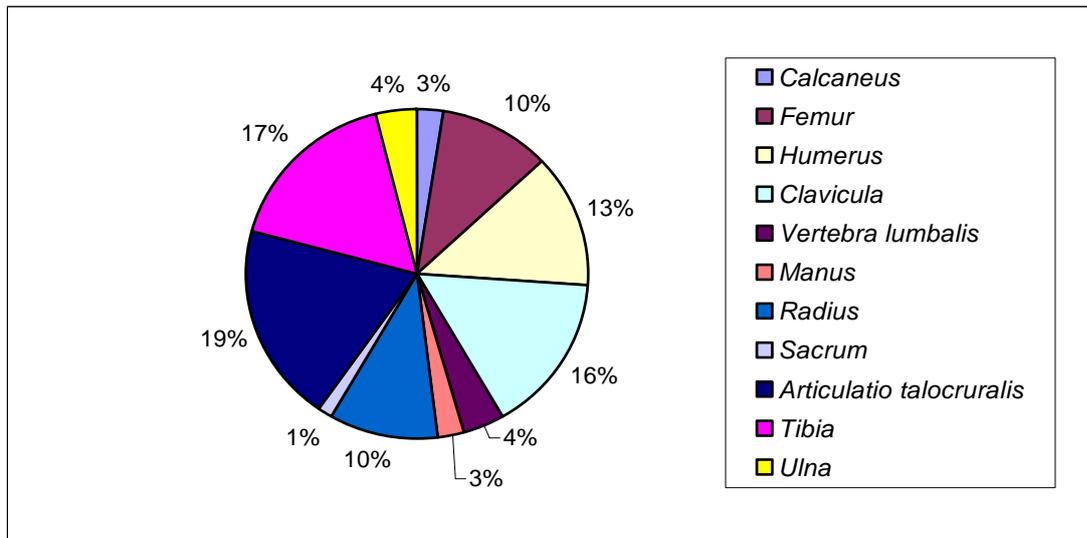


Abbildung 22: Relative Anteile der einzelnen Frakturlokalisationen.

Die Gegenüberstellung der Häufigkeit der Besiedlung und der Lokalisation der behandelten Fraktur ist in der folgenden Tabelle 8 sowie der Abbildung 23 veranschaulicht.

Tabelle 8: Anteil besiedelter Implantate an allen Implantaten einer Lokalisation

Bruchstelle	Calcaneus	Femur	Humerus	Clavicula	Vertebra lumbalis	Manus	Radius	Sacrum	Articulatio talocruralis	Tibia	Ulna
Besiedelt	100%	63%	70%	92%	100%	100%	75%	100%	66%	54%	100%

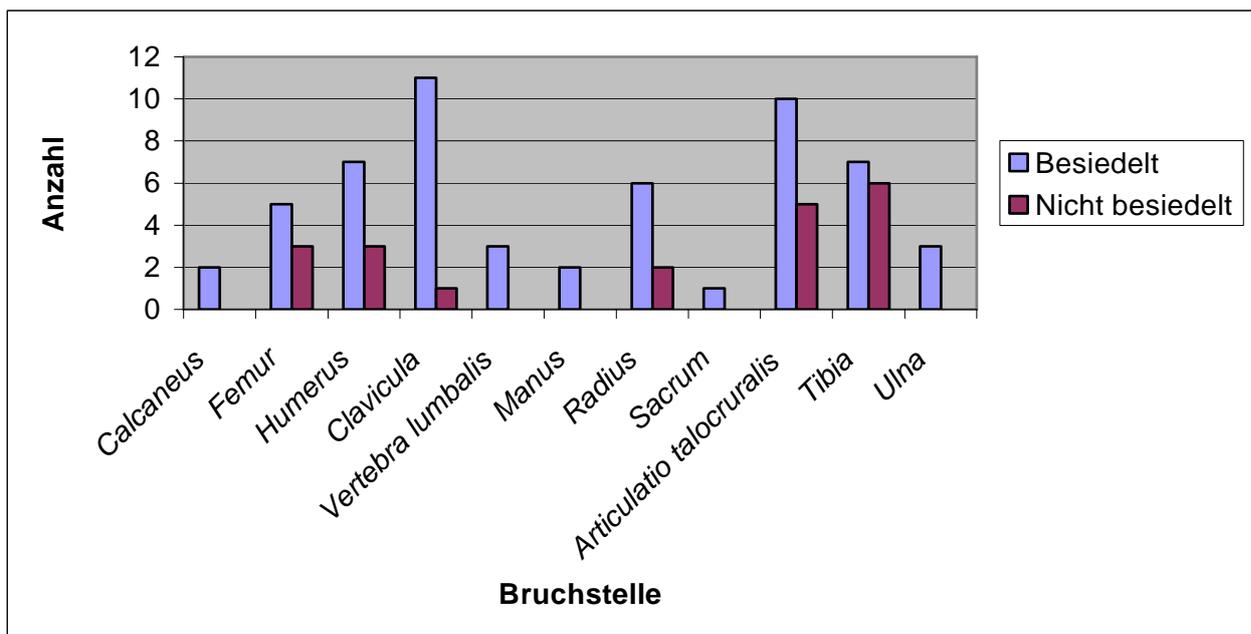


Abbildung 23: Erregernachweis in Abhängigkeit von der Frakturlokalisation.

Aus dem Schaubild lässt sich eine ungleichmäßige Verteilung der kolonisierten Implantate erkennen. Die Osteosynthesen von *Calcaneus*, *Ulna*, *Sacrum*, *Manus* und *Vertebra lumbalis* sind mit je 1-3 Proben am seltensten vertreten und auf allen konnte eine Kolonisation nachgewiesen werden. Der Anteil besiedelter Implantate sinkt bei den häufiger untersuchten Lokalisationen auf Werte von 92 % bei *Clavikula*-Frakturen und 46 % bei *Tibia*-Frakturen.

Es ließ sich keine Regelmäßigkeit in der Zuordnung der Erregerspezies zu den unterschiedlichen Frakturlokalisationen erkennen.

### 3.6.4 Entzündungsparameter

#### 3.6.4.1 CRP

Das C-reaktive Protein wird zu den Akute-Phase-Proteinen gezählt. Diese steigen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen, sowohl infektiöser als auch nicht infektiöser Genese, an. Das C-reaktive Protein wurde aus dem Plasma der Patienten bestimmt und in Milligramm pro Liter (mg/l) angegeben. Dabei wurden Werte unter 1 mg/l als physiologisch gewertet. Ein erhöhter Plasmaspiegel spricht dabei für eine aktivierte Immunantwort. Dabei ist vom Zentrallabor der Abteilung für klinische Chemie und Biochemie des UKGM Stankdorf Gießen der Bereich von 1-3 mg/l als Graubereich angegeben. Das heißt, dass diese Werte auch physiologisch, ohne eine Entzündungsreaktion, auftreten können. Die präoperativ abgenommenen CRP-Werte sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 9: Präoperativ vor Osteosynthese-Implantation bestimmte CRP-Werte

<b>Implantat</b>	<b>CRP &lt; 1 mg/l (Physiologisch)</b>	<b>CRP 1-3 mg/l (Graubereich)</b>	<b>CRP ≥ 3 mg/l (Pathologisch)</b>	<b>Summe</b>
<b>Besiedelt</b>	14	12	24	50
<b>Nicht besiedelt</b>	7	4	10	21
<b>Summe</b>	21	16	34	71

Bei 48 % der Patienten mit besiedelten Implantaten ist vor der Implantation der Osteosynthese eine pathologische Erhöhung des CRP-Wertes festgestellt worden. Dagegen wurde bei 52 % der Patienten mit nicht besiedelten Implantaten ein Wert von maximal 3 mg/l bestimmt. Signifikanz konnte hier aber nicht nachgewiesen werden. Der Mittelwert liegt bei 8,7 mg/l.

### 3.6.4.2 Leukozyten

Auch die Anzahl der Leukozyten ist präoperativ bestimmt worden. Dabei sind Werte zwischen 4 000 und 10 000 Leukozyten pro Mikroliter physiologisch, Werte darüber weisen auf eine Entzündungsreaktion hin. In der Gruppe der Patienten mit den besiedelten Implantaten zeigten 17 % eine erhöhte Zahl der weißen Blutkörperchen, während die Gruppe mit den keimfreien Implantaten in nur 12 % auffällige Werte bot. Das Spektrum der gemessenen Werte erstreckte sich von minimal 3 300/ $\mu$ l bis maximal 12 300/ $\mu$ l. Das arithmetische Mittel beträgt 7 300/ $\mu$ l.

Tabelle 10: Leukozyten-Zahl der Patienten

<b>Implantat</b>	<b>Leukozyten &lt; 10 000/<math>\mu</math>l</b>	<b>Leukozyten <math>\geq</math> 10 000/<math>\mu</math>l</b>	<b>Summe</b>
<b>Besiedelt</b>	46	6	52
<b>Nicht besiedelt</b>	17	4	21
<b>Summe</b>	63	10	73

### 3.6.5 Verweildauer der Implantate

Die mittlere Implantat-Verweildauer betrug 11,4 Monate (minimal 1 bis maximal 38 Monate), der Median lag bei 11,5 Monaten. Dabei war die durchschnittliche Liegezeit der positiv getesteten Proben 10,1 Monate und der übrigen 12,6 Monate.

Bei den Prothesen-assoziierten Infektionen gibt es eine anerkannte Einteilung nach dem Zeitpunkt des Geschehens. Frühe Infektionen treten bis zu drei Monate postoperativ auf, verzögerte Infektionen 3 bis 24 Monate nach der Operation und nach über 24 Monaten spricht

man von späten Infektionen (Trampuz und Widmer, 2006). Wenn man diese Einteilung für die untersuchten unfallchirurgischen Implantate übernimmt, kommt man zu dem in Abbildung 24 dargestellten Ergebnis.

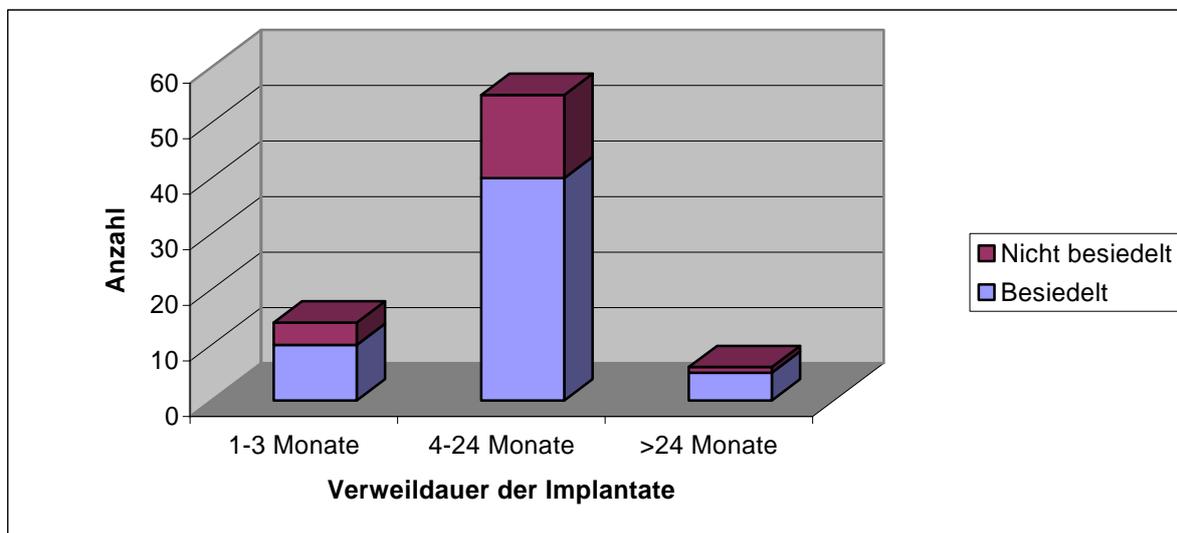


Abbildung 24: Verweildauer der Implantate.

Klassischerweise werden diese drei Infektions-Typen durch unterschiedliche Erreger hervorgerufen. Zu den typischen Auslösern der Frühinfektion zählen pathogene Mikroorganismen wie *Staphylococcus aureus*, während für die Spätinfektion eher weniger pathogene Keime wie Koagulase-negative Staphylokokken verantwortlich sind (Trampuz und Widmer, 2006). Auch dieses Ergebnis lässt sich anhand der aktuellen Untersuchung nachvollziehen, wie Tabelle 11 zeigt. Hier werden ausnahmsweise nur die Ergebnisse aus der kulturellen Anzucht betrachtet, da die Unterscheidung von *Staphylococcus aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken grundlegend wichtig ist und diese Unterscheidung für die molekular nachgewiesenen Erreger, wie in 3.3.2.1 erklärt, nicht getroffen wird.

Tabelle 11: Erreger früher und später Infektionen

Erreger	Verweildauer	1-3 Monate	4-24 Monate
Koagulase-negative Staphylokokken		40 % (2)	61 % (11)
<i>Staphylococcus aureus</i>		60 % (3)	11 % (2)
Andere		0 %	28 % (5)

### 3.6.6 Verwendete Osteosynthesearten

Bei den untersuchten Materialien handelte es sich um 54 Plattenosteosynthesen vielfältiger Art mit den entsprechenden Schrauben, 16 Schraubenosteosynthesen, acht Verriegelungsmarknägel mit Verriegelungsschrauben und zwei Kirschner-Drähte. Die Abbildung 25 zeigt den prozentualen Anteil der besiedelten Implantate an allen Implantaten der jeweils verwendeten Osteosyntheseart.

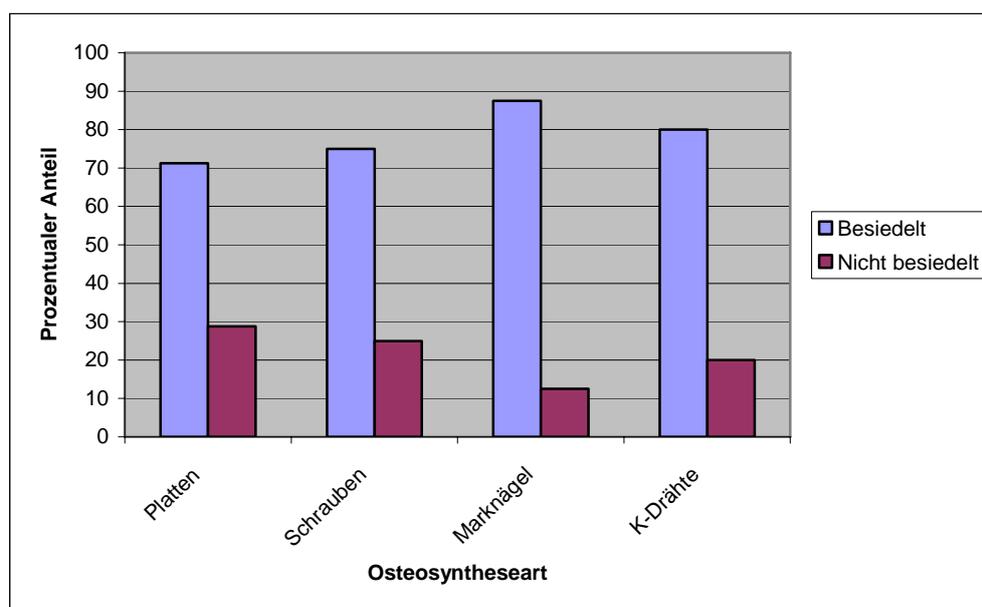


Abbildung 25: Erregernachweis in Abhängigkeit von der Osteosyntheseart.

Wenn man die in der Abbildung dargestellten relativen Häufigkeiten vergleicht, zeigt sich bei allen ein ähnliches Verhältnis besiedelter Implantate zu nicht besiedelten Implantaten. Dabei sind in absoluten Zahlen ausgedrückt 37 der 52 Schraubenosteosynthesen, 12 der 16 Plattenosteosynthesen, sieben der acht Marknägel und vier von fünf Kirschner-Drähten besiedelt.

## 4 Diskussion

Seit Beginn der 60er Jahre hat die offene Reposition von Knochenfrakturen mit interner Fixierung die konventionelle Gipsbehandlung und Extension bei vielen Frakturtypen abgelöst (Arens und Hansis, 1998). Die postoperative Infektion ist dabei als eine der bedeutendsten und folgenschwersten Komplikationen anzusehen. Diese und andere Fremdkörper-assoziierte Infektionen stellen die moderne Medizin in den verschiedensten Fachbereichen vor gravierende Probleme (Dickinson und Bisno, 1989). Neben einer lokalen Infektion des den Fremdkörper umgebenden Gewebes mit entsprechenden lokalen Komplikationen stellen die besiedelnden Bakterien eine Quelle für disseminierte Infektionen von Weichteilentzündungen bis hin zur schweren Sepsis dar (Jenkins et al., 2010; Raz et al., 2009). Bisher gibt es bezüglich der Diagnostik und Therapie solcher Fremdkörper-assoziierten Infektionen keine Leitlinie der AMWF. Ziel ist es, eine interdisziplinäre evidenzbasierte Leitlinie für Diagnostik und Therapie zu erarbeiten, um so eine optimale und einheitliche Versorgung der Patienten zu ermöglichen. Während Fremdkörper wie zum Beispiel Venenverweilkatheter bei Zeichen der Infektion sofort entfernt, beziehungsweise gewechselt werden können, ist bei operativ eingebrachten Implantaten die Entscheidung zur Entfernung mit einer erneuten Operation und den damit einhergehenden Risiken verbunden.

Dabei ist es Stand der Forschung auf dem Gebiet der implantatassoziierten Infektionen, dass biofilmbildende Bakterien die in den Körper eingebrachten Fremdkörper besiedeln (Makarem et al., 2008; Wagner et al., 2006; Wilson, 2001). In zahlreichen Studien zur Erforschung von Implantatinfektionen sind Prädispositionen, Ätiologie und Diagnosestellung beschrieben (Achermann et al., 2010; Kobayashi et al., 2008; Trampuz et al., 2007). Diese Studien behandeln dabei vornehmlich Prothesen-assoziierte Infektionen, darunter vor allem Infektionen endoprothetisch versorgter Hüft- und Kniegelenke. Diese Gelenkersatzmaterialien sind für eine lange Verweildauer im Bereich von Jahren und Jahrzehnten entwickelt. Davon zu unterscheiden sind Osteosynthesematerialien, bei denen eine kurze Verweildauer im Bereich von Monaten geplant ist. Dazu gehören zum Beispiel Schrauben, Nägel und Plattenosteosynthesen, die bei vielen Knochenfrakturen zum Einsatz kommen. Ihr klinischer Einsatz ist als weitaus häufiger anzusehen, die Kenntnisse zu Komplikationen, insbesondere Infektionen, sind dagegen bei unzureichend vorhandenen Studien deutlich eingeschränkt. Gerade das Wissen über den Anteil besiedelter Osteosynthesen bei klinisch unauffälligen Patienten ist zur weiteren Risikoabschätzung unerlässlich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die mikrobiologische und molekulare Untersuchung von Implantaten mit kurzer Verweildauer. Entscheidend für die Auswahl eben dieser Implantate für die Studie war die bislang mangelhafte Qualität und Stichhaltigkeit vorhandener Daten bei hohen Fallzahlen. Um eine grundlegende Kenntnis über die Mikrobiota solcher nur einige Monate im Körper verweilender Metallimplantate zu erwerben, wurden in dieser Arbeit ausschließlich regelrecht explantierte Osteosynthesen untersucht. Das heißt, dass die Patienten zu keinem Zeitpunkt während der Implantationsdauer klinische Zeichen einer Implantatinfektion zeigten. Untersucht wurden ausschließlich Osteosynthesen zur Frakturversorgung, deren Explantation rasch nach der Wiederherstellung der Kontinuität des Knochens erfolgte.

Das untersuchte Material umschloss alle gebräuchlichen internen Osteosynthesen, in absteigender Häufigkeit Schrauben, Platten, Marknägel und Kirschner-Drähte. An verwendeten Materialien wurden Edelstahl und Titan untersucht. Externe Osteosynthesen wurden von der Untersuchung ausgeschlossen, da hier bei der angewandten Methodik mit Nachweisen der die externen Teile besiedelnden Bakterien gerechnet werden musste. Es wurden keine Implantate aufgrund spezieller Frakturlokalisationen ausgeschlossen. Somit wurde ein breites Spektrum von Osteosynthesen sowohl an langen Röhrenknochen der Extremitäten als auch an kurzen Knochen wie Wirbelknochen untersucht. Bei den 80 in die Studie eingeschlossenen Patienten war der Anteil der Männer etwas höher als der der Frauen (1,3:1) und das Durchschnittsalter lag bei 43 Jahren, was annähernd dem Durchschnittsalter der deutschen Bevölkerung entspricht (Statistisches Bundesamt, 2009). Die Patienten stellten sich nach durchschnittlich knapp einem Jahr (11,4 Monaten) Verweildauer des Implantats ohne Beschwerdesymptomatik zur Explantation wieder vor.

Zur geplanten Metagenomanalyse musste zunächst eine für die zu untersuchenden Implantate geeignete Untersuchungsmethode entwickelt werden. Hierfür wurde eine neue Bürstenreinigungsmethode zur Ablösung des Biofilms angewandt. Die hier angewendete systematische Abbürstung des Metalls bei wiederholtem Abspülen des Materials mit steriler Kochsalzlösung stellt ein völlig neues Verfahren dar. Sie entstand aus der Idee, die in biofilmbildenden Einheiten organisierten Bakterien manuell von der Oberfläche des Materials zu lösen. Die Bakterien wurden so aus dem organisierten Biofilmverband gelöst und in der Spülflüssigkeit aufgefangen. Vergleichend wurde ein Teil des explantierten Materials zusätzlich im Ultraschallbad behandelt.

Das Ultraschallbad ist aktuell eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung fraglich infizierter Implantate, dabei waren gerade bei den Untersuchungen der klinisch deutlich infizierten Implantate oft Keimnachweise möglich (Fux et al., 2003; Piper et al., 2009; Trampuz et al., 2007), während bei Untersuchungen an weniger deutlichen Fällen mit vermutlich geringeren Erregerzahlen der DNA-Nachweis nur selten gelang (Nguyen et al., 2002). In der vorliegenden Untersuchung waren nur in einem einzigen Fall die mit der Bürstenreinigung erreichten Keimnachweise auch mit der Ultraschallreinigung nachzuweisen. Eine Problematik des Ultraschallbades besteht darin, dass das Implantat in einem sterilen Behälter mit Medium bedeckt werden muss, das heißt das Implantat ist im Verhältnis zu seiner Größe von viel Medium umgeben. In der Studie wurde zum Beispiel eine 10 cm lange Osteosyntheseplatte mit 5 ml Kochsalz abgespült, im Ultraschallbad waren jedoch 50 ml Medium nötig, um das Implantat zu bedecken. Es ist davon auszugehen, dass durch die große Menge an Medium der Keimnachweis bei einer geringen Anzahl von Bakterien sehr schwierig ist. Ultraschallbehandlungen in sterilen Tüten, die diese Schwierigkeiten umgehen, wiesen in vorangegangenen Untersuchungen eine ausgesprochene Kontaminationsproblematik auf (Trampuz et al., 2006). Somit ist davon auszugehen, dass die Ultraschallreinigung in Fällen von Infektionen, bei denen massenhaft Erreger vorhanden sind, eine gute diagnostische Möglichkeit darstellt. In weniger deutlichen Fällen mit kleinen Erregerzahlen bietet sich dagegen die neu etablierte Bürstenreinigungsmethode an. Weiter zeichnet sich die durchgeführte Bürstenreinigung durch einfache manuelle Handhabung und nur mäßigen Zeitaufwand aus. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte ist sogar eine Tauglichkeit als klinische Routineuntersuchung gegeben.

Im Anschluss an die Bürstenreinigung der Implantate wurde eine Metagenomanalyse mittels einer neuen, besonders sensiblen Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit anschließender denaturierender Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC) und zeitgleichen kulturellen Nachweismethoden durchgeführt, um an eine möglichst umfassende Darstellung der vorhandenen Mikrobiota zu gelangen. Dabei liegen die Vorteile der in kultureller Anzucht gewonnenen Erreger in der Möglichkeit Antibiotika-Suszeptibilitäten zu ermitteln, die Bakterien *in vitro* auf ihre Möglichkeit, Biofilme auszubilden, und ihre Pathogenitätsfaktoren zu untersuchen und Stammsammlungen anzulegen. Molekulare Methoden haben dagegen ihre Vorteile bei Nachweisen schwer anzüchtbarer Bakterien und Pilze. Mit Anwendung dieser Methoden wurden auf 58 der 80 untersuchten Osteosynthesen ein oder sogar mehrere

verschiedene Mikroorganismen nachgewiesen, dabei handelte es sich ausschließlich um Bakterien. Pilze waren weder kulturell noch molekular nachzuweisen.

Dabei wurden in 59 % mehrere Erreger auf einem Implantat nachgewiesen. Auch andere Untersuchungen haben ergeben, dass bei Verwendung hoch entwickelter molekularer Nachweismethoden die Ergebnisse nahe legen, dass polymikrobielle Kolonisationen eher die Regel als die Ausnahme darstellen (Marrie und Costerton, 1985; Walter und Hoffmann, 2008). Es ist an dieser Stelle wichtig, eine Unterscheidung von Besiedlung und Infektion vorzunehmen. Bakterielle Besiedlungen sind asymptomatische Kolonisierungen von bestimmten Habitaten einzelner Lebewesen wie der Darmmikrobiota des Menschen. Wenn Mikroorganismen dagegen beim Wirt klinische Symptome verursachen, ist von einer Infektion auszugehen (Adam, 2004; Marre, 2007). Der Übergang von reiner Besiedlung zu einer beginnenden Infektion ist fließend und schwer festzumachen. Bekannt sind dagegen Faktoren, die diesen Übergang begünstigen, allen voran eine Immunsuppression des Wirtes. In Nischen, die eigentlich steril sind wie die hier untersuchten Implantate, kann eine hohe Keimzahl als Hinweis auf eine Infektion interpretiert werden. In Lebensräumen wie dem Darm dagegen ist eine solche Aussage nicht möglich, da physiologisch bereits eine bakterielle Mikrobiota besteht (Mims, 2006).

Im Folgenden werden die Erreger nach der Häufigkeit ihres Nachweises in dieser Untersuchung dargestellt. Da die nachgewiesenen Erreger nicht obligat als pathogen anzusehen sind, wird jeweils kurz auf das natürliche Vorkommen und typische ausgelöste Krankheitsbilder eingegangen.

Am häufigsten nachzuweisen, nämlich bei fast einem Drittel der besiedelten Implantate, waren Staphylokokken. Diese sind grampositive, fakultativ anaerobe Bakterien, die ubiquitär vorkommen und Haut und Schleimhaut des Menschen besiedeln. Sie werden nach der Koagulase-Reaktion eingeteilt. Dabei gehört die Koagulase-positive Spezies *Staphylococcus aureus* zu den bedeutendsten Krankheitserregern beim Menschen. *Staphylococcus aureus* kann eine Vielzahl von Wirtsgeweben und Medizinprodukten besiedeln und so zu verschiedenen Arten von Infektionen wie Endokarditis, Bakteriämie, Osteomyelitis und septischer Arthritis führen.

Den zweithäufigsten Besiedler stellten in der durchgeführten Untersuchung Koagulase-negative Staphylokokken dar; sie sind in der Regel apathogene Kolonisatoren des Menschen, die aber im Zusammenhang mit Fremdkörpereinbringung zu ernsthaften Infektionen führen

können. Sie nutzen die geschwächte Immunabwehr des Körpers an dieser Stelle, besiedeln die fremden Oberflächen und verursachen neben septischen Infektionen vor allem Endokarditiden und Meningitiden (Huang et al., 2005), aber auch Haut- und Weichteilgewebeeinfektionen (Fritsche et al., 2005). Bei Implantat-assoziierten Infektionen waren Staphylokokken bei dem Großteil der durchgeführten Studien die häufigsten Erreger (Carrega et al., 2008; Fitzgerald et al., 1973; Mousa, 2001; Sanderson, 1991; Trampuz et al., 2007; Tunney et al., 1999; Tunney et al., 1999).

Ein Achtel der nachgewiesenen Erreger bildeten Enterobakterien, Laktobazillen und Moraxellen. Dabei sind Enterobakterien gramnegative, fakultativ anaerobe Bakterien. Sie bilden einen Teil der gesunden Darmmikrobiota des Menschen und kommen ubiquitär in der Umwelt vor. Ihr Spektrum geht von apathogenen über fakultativ pathogene bis hin zu obligat pathogenen Keimen wie Salmonellen, Shigellen und Yersinien und darmpathogenen Stämmen von *Escherichia coli*. Neben den für einzelne Spezies spezifischen Krankheitsbildern wie der Ruhr bei Shigellen oder dem Typhus bei Salmonellen sind Enterobakterien häufige Erreger von Harnwegsinfekten, Wund- und Atemwegsinfektionen, Enteritis und Sepsis (Hahn, 2009). Laktobazillen sind grampositive, mikroaerobe Milchsäurebakterien. Einige bilden einen Teil der gesunden Darmmikrobiota des Menschen. Die als Döderleinbakterien zusammengefassten Laktobazillen sorgen als Teil der natürlichen Scheidenmikrobiota der Frau durch eine mittels Gärung erzeugte saure Umgebung für einen Schutz vor anderen, krankheitserregenden Bakterien und Pilzen, die einen niedrigen pH-Wert nicht tolerieren. Immer häufiger werden aber auch Infektionen durch diese eigentlich apathogenen Keime nachgewiesen (Darbro et al., 2009; Domann et al., 2003; Imirzalioglu et al., 2008; Nadkarni et al., 2010). Moraxellen sind gramnegative, aerobe Bakterien, die zur physiologischen Mikrobiota von Pharynx und Konjunktiven gehören. Sie können endogene Infektionen der Ohren, des oberen und des unteren Respirationstrakts auslösen, weiterhin können sie Ursache eitriger Arthritiden sein und eine Sepsis hervorrufen.

Nur vereinzelt waren die nun aufgeführten Bakterien nachzuweisen: Streptokokken sind grampositive, fakultativ anaerobe Bakterien, die man nach der Hämolyseform einteilt (siehe Abschnitt 2.5.4). Während die vergrünenden Arten, bis auf die Pneumokokken, Teil der physiologischen Mundmikrobiota sind und nur als opportunistische Erreger Infektionen auslösen, sind die  $\beta$ -hämolysierenden Streptokokken obligat pathogen. Klassisch sind dabei Infektionen des Respirationstraktes und der Haut, aber auch fatale Formen von Weichteilinfektionen wie die nekrotisierende Faszitis werden von Streptokokken verursacht.

Zudem gibt es schwerwiegende Folgeerkrankungen nach Streptokokken-Infektionen. Aus der Familie der *Bacteroidaceae* waren *Bacteroides*, *Porphyromonas* und *Prevotella* nachweisbar. Dies sind gramnegative, strikt anaerobe Bakterien. Sie stellen den überwiegenden Teil der physiologischen Darmmikrobiota dar, bis zu  $10^{13}$  Anaerobier sind in einem Gramm Stuhl zu finden (Hahn, 2009). Sie besiedeln weiterhin die Mundhöhle und den Urogenitaltrakt. Die an ihrem physiologischen Standort apathogenen Bakterien können durch Verschleppung in üblicherweise sterile Bereiche zu endogenen Infektionserregern werden. Sie sind somit als Opportunisten an der Ätiologie verschiedener Krankheitsbilder, wie dentogenen Infektionen, Aspirationspneumonien, Hirnabszessen, Peritonitis und Wundinfektionen, beteiligt. Meist sind sie Teil polymikrobieller Infektionen (Hahn, 2009). Die vereinzelt nachgewiesenen Corynebakterien sind grampositiv und leben fakultativ anaerob. Einige sind Saprophyten. Andere nicht pathogene Corynebakterien sind häufig Bestandteil der Schleimhaut- und Hautmikrobiota des Menschen. Gerade bei immunsupprimierten Menschen sind opportunistische Infektionen möglich. Bekanntester obligat pathogener Vertreter ist *Clostridium diphtheriae*, Verursacher der Diphtherie.

Pseudomonaden sind gramnegative obligate Aerobier und ubiquitäre Umweltkeime. Sie können zu opportunistischen Krankheitserregern werden, für den Mensch ist aber vor allem *Pseudomonas aeruginosa* gefährlich, der in feuchten Milieus vorkommt und so ein gefürchteter Erreger nosokomialer Infektionen ist. Neben Pneumonien, Enterokolitiden und Harnwegsinfektionen können auch schwere Wundinfektionen ausgelöst werden. Auch in anderen Studien konnte bei infizierten Osteosynthesen *Pseudomonas aeruginosa* als Verursacher identifiziert werden (Mousa, 2001; Trampuz et al., 2007). Das in drei Fällen nachgewiesene grampositive anaerobe Propionibakterium ist Teil der Hautmikrobiota. Neben Akne-Läsionen und kornealen Ulzera löst es auch septische Arthritiden aus. *Propionibacterium acnes* wurde besonders häufig bei besiedelten und infizierten Implantaten nachgewiesen (Hahn et al., 2005; Kanafani et al., 2009; Sampedro et al., 2009; Zeller et al., 2007). Der Gattung *Micrococcus* gehören grampositive, aerobe Bakterien an, die zumeist apathogen sind und einen Teil der physiologischen Hautmikrobiota darstellen. Bei geschwächtem Immunsystem sind opportunistische Infektionen möglich. Auch bei Untersuchungen Prothesen-assoziiertes Infektionen wurde *Micrococcus* sp. nachgewiesen (Carrega et al., 2008). *Stenotrophomonas maltophilia* ist ein ubiquitär vorkommendes gramnegatives aerobes Bakterium. Es wird immer häufiger als wichtiger Verursacher nosokomialer Infektionen identifiziert. Es werden Infektionen der Lunge, des Urogenital- und

Magen-Darm-Trakts bis hin zur Sepsis beschrieben (Denton und Kerr, 1998). Clostridien sind grampositive, anaerobe Bakterien, zu denen neben apathogenen Arten auch die Erreger des Gasbrandes und des Wundstarrkrampfes gehören. Clostridien sind in der Natur ubiquitär verbreitet und auch Teil der physiologischen Darmmikrobiota. Als Erreger von Wundinfektionen nach Implantaten sind sie bereits beschrieben worden (Taylor et al., 2010). *Bacillus* und *Paenibacillus* sind grampositive, fakultative Anaerobier und gehören ebenfalls zu den Umweltkeimen. Die meisten Arten sind apathogen, es sind aber auch obligate Krankheitserreger wie *Bacillus anthracis*, der Erreger des Milzbrandes, und *Bacillus cereus* als Lebensmittelvergifter darunter (Hahn, 2009). Es gibt einzelne Fallberichte zu implantatassoziierten Infektionen mit *Paenibacilli* (Bigaillon et al., 2008; Ouyang et al., 2008). Weiterhin werden Fremdkörper-assoziierte Infektionen mit verschiedenen *Bacillus*-Arten beschrieben (Kuroki et al., 2009).

Ein Vergleich mit den Ergebnissen einer 2007 von Trampuz und seiner Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchung an 331 wegen Revision ausgebauter Hüft- und Knieprothesen zeigt bezüglich der nachgewiesenen Erreger ein äußerst ähnliches Keimspektrum. In der Studie wurden 79 Prothesen-assoziierte Infektionen und 252 Fälle aseptischen Versagens untersucht und dabei in 62 von 79 und 5 von 252 Fällen Erreger nachgewiesen. Auch bei Trampuz sind Staphylokokken die am häufigsten nachgewiesenen Erreger. Des Weiteren waren Enterobakterien, Streptokokken, Corynebakterien, Propionibakterien, Pseudomonaden und Bacteroides nachgewiesen worden, was kongruent mit der aktuellen Studie ist. Neben den genannten, übereinstimmenden Erregern wurden bei Trampuz noch fünf weitere Bakterien (*Enterococcus*, *Fingoldia magna*, *Dermabacter hominis*, *Peptoniphilus asacchrolyticus*, *Anaerococcus hydrogenalis*) und in zwei Fällen *Candida* nachgewiesen (Trampuz et al., 2007).

An dieser Stelle ist die Frage der Ätiopathogenese wieder aufzunehmen und in Zusammenhang mit dem Wissen über das natürliche Vorkommen der nachgewiesenen Erreger näher zu beleuchten. Grundsätzlich kommen dabei verschiedene Wege der Verschleppung von Bakterien zu den in einen ursprünglich sterilen Raum eingebrachten Implantaten in Frage. Gemeinsam ist ihnen aber ein meist endogener Infektionsweg. Bei offenen Frakturen kommen Keime in Kontakt mit dem verletzten Gewebe und dem diskontinuierlichen Knochen und können so schon präoperativ an Ort und Stelle gelangen. Auch bei vollständiger Desinfektion des Wundbereiches vor und während der Operation ist es möglich, dass einzelne Erreger überleben. Durch eine solche Genese können besonders ubiquitäre Umweltkeime wie

Pseudomonaden und Clostridien und Hautkeime wie Staphylokokken, Streptokokken, Corynebakterien und Propionibakterien zu Besiedlern werden. Weiter kann perioperativ eine bakterielle Kontamination im Operationssaal stattfinden. Dabei ist die Verschleppung von Hautkeimen ausgehend vom Patienten wie auch vom Operationsteam möglich, auch wenn dieser Weg bei sterilen OP-Bedingungen und Arbeiten unter Laminar-Airflow als äußerst unwahrscheinlich anzusehen ist. Weiter sind Luft- und Wasserkeime trotz der sterilen Bedingungen nicht außer Acht zu lassen. Dagegen ist für Bakterien, die die Mund- oder Darmmikrobiota bilden, die Erklärung der Besiedlung durch hämatogene Streuung wahrscheinlicher. Beispielsweise können bei Infektionen wie einer Parodontitis die verursachenden Erreger wie z.B. *Porphyromonas gingivalis* durch mit der Erkrankung einhergehende Schleimhautläsionen in den Blutkreislauf und so zum Knochen gelangen (Welkerling et al., 2006). Aber auch schon eine Gingivitis oder das Zähneputzen kann zum Eintritt in der Mundhöhle ubiquitär vorkommender Erreger in die Blutbahn führen. Übertritte der zur Darmmikrobiota gehörenden Erreger erfolgen im Rahmen verschiedentlich verursachter Darmbarriere-störungen wie einer enteralen Ischämie, einer entzündlichen Reaktion bei Gastroenteritis oder auch Diskontinuität der Darmwand.

Warum die nachgewiesenen Erreger der vorliegenden Untersuchung als Besiedler und nicht als Infektionsverursacher zu sehen sind, ist in der Menge der Erreger begründet (Mims, 2006). Bei den in der Studie zum Keimnachweis angewendeten Methoden waren jeweils jene erfolgreich, zum Nachweis nur eine sehr geringe Menge Bakterien benötigen. Bei den kulturellen Anzuchtmethoden waren die Erreger immer in den Flüssigkulturen bei allerdings sterilen gebliebenen Nähragarplatten nachgewiesen worden. Das ist damit zu erklären, dass in Flüssignährmedien eine annähernd exponentielle Vermehrung stattfindet und so theoretisch eine Beimpfung durch ein einzelnes Bakterium möglich ist. Bei der Anwendung der herkömmlichen PCR blieb der Erfolg zunächst aus und selbst bei Proben, bei denen in der kulturellen Anreicherung erfolgreich Keime angezüchtet wurden, blieb die PCR negativ. Erst die Austestung eines in der Arbeitsgruppe neu eingeführten Thermocyclers und der zugehörigen besonders spezifischen Polymerase erbrachte positive Ergebnisse. Viele der Sequenzanalysen der mit der neuen Technik erfolgreich amplifizierten Proben zeigten im Chromatogramm mehrere Kurvenverläufe gleicher Amplitudenhöhe. Dieses Ergebnis sprach für die Amplifikation von Bakteriengemischen. Daraufhin wurden alle erfolgreich amplifizierten Proben mittels DHPLC untersucht.

Die Anwendung von DHPLC zum Nachweis polymikrobieller Infektionen wurde bereits 2003 in der Gruppe um Domann etabliert. Aus der Tatsache, dass die Verfahren mit hoher Sensitivität für geringe Erregermengen erfolgreich waren, ist der Rückschluss zu ziehen, dass die Osteosynthesen zum Großteil besiedelt waren. Diese wenigen Erreger stellen eine nicht zu unterschätzende Gefährdung für den Patienten dar, da sie eine Quelle für disseminierte Infektionen bei beispielsweise Einschränkung der humoralen Immunabwehr des Patienten bilden. Weiterhin sind bei Änderung des lokalen Milieus Vermehrungen der Bakterien mit folgender Infektion, Implantatslockerung bis hin zum Notwendigwerden einer operativen Entfernung denkbar. Somit stellen auch diese geringen Erregerzahlen eine ernstzunehmende Gefährdung für den Patienten dar.

Initial werden die sterilen Implantate operativ in den Körper eingebracht und das nachgewiesene Keimspektrum legt überwiegend endogene Erregerquellen nahe. Weiterhin ist vielfach nachgewiesen worden, dass sich bei der Besiedlung in den Körper eingebrachter Fremdkörper die Bakterien in Biofilmen formieren (Wilson, 2001). Bei der Entstehung von Biofilmen auf Metallfremdkörpern ist davon auszugehen, dass die Bakterien zunächst über unspezifische Faktoren wie elektrostatische Wechselwirkungen adhärieren (Stock, 2008). Weiterhin werden nach der Implantation von Biomaterialien diese sehr bald von Plasma-proteinen des Wirts, vorrangig Fibrinogen und Fibronectin, umhüllt. Diese Ablagerungen auf den Fremdkörpern und dem verletzten Gewebe dienen möglicherweise als Substrat für die Anhaftung von Mikroorganismen (Herrmann et al., 1988). Für die Entstehung von Biofilmen gibt es folgende Voraussetzungen: einerseits die Existenz einer Grenzfläche, andererseits das Vorhandensein von Feuchtigkeit, weiter die Anwesenheit von Mikroorganismen und ein Angebot von Nährstoffen (Strathmann, 1999). Auf die aktuelle Studie übertragen ist das Implantat die Grenzfläche, welches in einer feuchten Umgebung eingebettet liegt. Weiter kommt es einerseits durch das initiale und andererseits durch das operative Trauma zur Zerstörung von Gewebe und somit auch zu ausreichend Nährstoffen. Das Leben im Biofilm bietet den dort angesiedelten Bakterien verschiedene Vorteile. Sie sind vor der Immunabwehr des Wirtsorganismus sowie medikamentösen Einflüssen geschützt (Costerton, 2004). Es entstehen Symbiosen und ökologische Nischen wie zum Beispiel anaerobe Bereiche unter aerobem Oberflächenbiofilm.

Die Isolate der kulturell gewonnenen Erreger wurden anhand des Assays nach O'Toole auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung untersucht (O'Toole et al., 1999). Hierbei wurden in Plastikvertiefungen die isolierten Erreger in Flüssignährmedium angezüchtet, nach Verwerfen

der Suspension die dem Plastik anhaftenden Bakterien angefärbt und sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet. Die Untersuchung der nachgewiesenen Erreger auf Biofilmbildung zeigte, dass über 80 % der untersuchten Keime in der Lage waren, *in vitro* einen Biofilm auszubilden. Dabei ist anzunehmen, dass beinahe alle in dieser Studie nachgewiesenen Bakterien *in-vivo*-Biofilmbildner sind. Aus dieser Vermutung ergeben sich interessante neue Fragestellungen, die in kommenden Untersuchungen behandelt werden könnten zum Beispiel, ob die DNA der nachgewiesenen Erreger spezifische Genabschnitte für Biofilmbildung enthält. Viele verschiedene Studien versuchen für einzelne Bakterienarten solche Regionen nachzuweisen. Dabei konnte beispielsweise bereits nachgewiesen werden, dass die *epsI-epsO genes* bei *Bacillus subtilis* eine bedeutende Rolle in der Zell-Oberflächen-Adhärenz und Biofilmbildung spielen (Nagorska et al., 2010). Für viele andere Bakterienarten konnten bereits solche wichtigen Genregionen nachgewiesen werden und das Wissen über solche molekularen Prozesse nimmt innerhalb kurzer Zeit enorm zu (Gao et al., 2010; Mattmann und Blackwell, 2010; Sillanpaa et al., 2010). Somit wäre ein neuer Studienansatz mit Untersuchung der von Fremdkörpern isolierten Bakterien-DNA auf eben diese Genregionen als sehr interessant zu bewerten.

Um den Verhältnissen der Implantatbesiedlung *in vivo* näher zu kommen, wurde der eigentlich auf Plastikoberflächen durchgeführte Test für Metalloberflächen, den für die Implantate verwendeten Materialien Stahl und Titan, in Anlehnung an vorhandene Untersuchungen modifiziert (Bjerkas et al., 2009). Die Besiedlung der Metallwürfel in der beimpften Flüssigkultur geschah bei den positiven Nachweisen innerhalb von 24 Stunden. In dieser Studie wurde der ausgebildete Biofilm auf dem Metall rein qualitativ ausgewertet. Eine Weiterentwicklung dieses Biofilmtests auf Metalloberflächen wäre für Untersuchungen mit ähnlicher Fragestellung wünschenswert, dabei wären festgelegte Bakterienzahlen zur Beimpfung und eine quantitative Auswertung erstrebenswert. Die Untersuchung auf Biofilmbildung war nur mit den kulturell nachgewiesenen Bakterien durchführbar. Aber erst die Kombination von kultureller Anzucht und PCR mit DHPLC ermöglichte den Nachweis des breiten Keimspektrums der besiedelten Osteosynthesen und somit eine umfassende Metagenom-Analyse. Dabei waren die Ergebnisse von Kultur und PCR in 30 Fällen übereinstimmend. Es gibt verschiedene Gründe, warum sich die Ergebnisse von der kulturellen Anzucht der Bakterien von denen der Amplifizierung durch PCR unterscheiden können.

Die erfolgreiche kulturelle Anzucht von Bakterien bei negativer PCR gründet meist in einer zu geringen Bakterienzahl im zu untersuchenden Ausgangsmaterial. Da im Kulturmedium ein exponentielles Wachstum stattfindet, reichen einzelne Erreger für eine erfolgreiche Anzucht aus, während für die PCR eine Nachweisgrenze existiert. Diese Nachweisgrenze ist von den verwendeten Polymerasen, Geräten und Amplifikationsbedingungen abhängig. Der DNA-Nachweis war in unserer Untersuchung erst nach der Einführung der neueren, sensitiveren PCR-Methode, mit der bereits bei ca. 14 Bakterien pro Milliliter ein DNA-Nachweis gelang (siehe Abschnitt 3.3.2), möglich.

Ein Nachweis von DNA in der PCR bei negativer Kultur ist einerseits durch den Nachweis der DNA schon abgestorbener Bakterien zu erklären, andererseits können schwer anzüchtbare Bakterien wie Anaerobier mit der PCR deutlich häufiger nachgewiesen werden (Fu et al., 2006; Wang et al., 1996). Speziell ist bei der vorliegenden Untersuchung zu berücksichtigen, dass die Proben während des Transports Sauerstoff ausgesetzt waren und somit von einem Absterben der Anaerobier auszugehen war. Zudem wird bei Bakterien ein VBNC-Zustand (*viable but not culturable*) beschrieben, wobei sich die Bakterien metabolisch in einem Ruhezustand befinden, in dem sie in der Kultur nicht anzuzüchten sind (Oliver, 2009).

Nach der Untersuchung der Mikrobiota der Implantate wurde eine Korrelation mit den klinischen Daten der Patienten hergestellt. Dabei wurde einerseits untersucht, ob es Faktoren gab, die eine Besiedlung begünstigten, wie es bei Implantat-Infektionen bereits für Alter und Geschlecht nachgewiesen wurde (Ozdemir et al., 2002). Andererseits sollten die Entzündungsparameter CRP und die Leukozytenzahl der Patientengruppe mit besiedelten Implantaten mit den Werten der nicht besiedelten Implantate verglichen werden, um zu untersuchen, ob hieraus Rückschlüsse auf eine mögliche Besiedlung zu ziehen sind.

Aus der Tatsache, dass bei 76 % der weiblichen und bei 71 % der männlichen Patienten eine Besiedlung des Implantats vorlag, ließen sich keine Aussagen zu einem solche Kolonisationen begünstigenden Geschlecht machen. Bei der Auswertung der Altersverteilung ist die Altersgruppe im mittleren Bereich, von 27 bis 59 Jahren, mit 85 % häufiger von Besiedlung betroffen als die Jüngeren (61 %) oder Älteren (66 %). Die Häufigkeitsverteilung ist aber nicht statistisch relevant. Die einzelnen Frakturlokalisationen waren bei dem gesamten Stichprobenumfang von 80 Probanden 1 bis 15 Mal vertreten, somit sind die Untergruppen vom Umfang her zu unterschiedlich und zu klein, um aus der Verteilung der Besiedlungen Rückschlüsse auf mögliche Ursachen zu ziehen. Betrachtet man die Lokalisation nur nach der

Einteilung in obere und untere Extremität zeigt sich, dass 80 % der Frakturversorgungen der oberen und 66 % der unteren Extremität von Besiedlung betroffen waren. Auch bei Betrachtung des verwendeten Implantatdesigns zeigte sich zwischen Platten, Schrauben, Nägeln und Drähten kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Besiedlung. Auch andere Studien kamen bei der Untersuchung der Infektionsanfälligkeit bei unterschiedlichen Designs zu ähnlichen Ergebnissen (Horn et al., 2005).

Unspezifische Entzündungsparameter wie CRP und Leukozytenzahl zeigen postoperativ als Reaktion auf das Trauma einen Anstieg, dabei ist die Höhe des Anstiegs von Lokalisation und Ausmaß des operativen Eingriffes abhängig (Larsson et al., 1992; Scherer et al., 2001). In der Studie von Piper et al. wurde das CRP als klinisch gut geeigneter Parameter für die Feststellung Prothesen-assoziiertes Infektionen festgestellt, wobei die Normgrenzen für die einzelnen Lokalisationen untersucht und festgelegt wurden, dabei lag der Grenzwert bei Knieprothesen zum Beispiel bei 10 mg/l (Piper et al., 2010). Bei den Patienten der aktuellen Studie lag der Mittelwert der bestimmten CRP-Werte bei 8,7 mg/l. Damit bewegen sich die meisten Werte deutlich unter den von Piper festgestellten Grenzwerten. Das ist nicht überraschend, da regulär explantierte Osteosynthesen untersucht wurden, die in ihrem Verlauf bei den Patienten keine Probleme verursachten. Auch die Leukozyten waren im Durchschnitt mit 7 300/ $\mu$ l unter dem die oberen Normgrenze bildenden Wert von 10 000/ $\mu$ l. Die postoperative Laborkontrolle der Patienten nach Implantation ist von großer Bedeutung, dabei ist aber zu berücksichtigen, dass überwiegend die Verlaufsbeobachtung klinische Rückschlüsse erlaubt, während einzelne Laborparameter nur mit Vorsicht zu interpretieren sind. Eine Eignung der postoperativ bestimmten CRP-Werte und Leukozytenzahlen zur Differenzierung zwischen besiedelten und nicht besiedelten Implantaten ist somit nicht gegeben. Zu bedenken ist hier aber, dass nicht klar ist, ob die Implantate wenige Tage nach der Operation, wenn die Laborwerte routinemäßig bestimmt werden, überhaupt schon besiedelt sind. Zur Identifikation einer Früh-Infektion von Implantaten sind sie dagegen geeignet (Penny et al., 2010). Für zukünftige Studien wäre die Bestimmung von Procalcitonin im Serum interessant, da dieser Wert deutlich spezifischer für bakterielle Infektionen ist als CRP- und Leukozytenwerte (Czerwionka-Szaflarska und Parzecka, 2005; Ferriere, 2000; Takajo und Okayama, 2010). Dabei könnte ein Vergleich mit der Höhe des Interleukin-6-Spiegels und TNF- $\alpha$  interessant sein, da sich in einzelnen Studien diese beiden Parameter als spezifische Serummarker der Protheseninfektion gezeigt haben (Bottner et al., 2007; Trampuz und Widmer, 2006).

Eine weitere sich aus den dargelegten Ergebnissen der Studie ergebende Konsequenz ist bei dem mit 72,5 % hohen Anteil an besiedelten Implantaten der vermehrte Beratungsbedarf der Patienten hinsichtlich zeitnah nach der Wiederherstellung der Knochenkontinuität durchgeführter Explantationen. Manche Patienten verzögern oder verzichten auf die Explantation, besonders wenn die Implantate ihrem Empfinden nach nicht hinderlich sind und nicht zu ästhetischen Problemen führen. Zur Begründung der rechtzeitigen Explantation ist vorzubringen, dass die das Implantat besiedelnden Erreger bei sinkender Immunkompetenz des Patienten zu einer ernstzunehmenden Gefährdung werden können. Eine verringerte Widerstandsfähigkeit des Organismus kann dafür ausreichen, dass die besiedelnden Bakterien sich vermehren und an Ort und Stelle zu einer Infektion des implantatumgebenden Gewebes führen oder sogar über die Blutbahn oder den Lymphabfluss im Körper verteilt werden. Folge dieser bakteriellen Streuung können lokale Infektionen wie Lungenentzündungen oder bis zur Sepsis reichende systemische Geschehen sein. Diese potentiellen Komplikationen lassen sich durch eine rechtzeitige Explantation vermeiden.

Bei der Auswertung der durchgeführten Untersuchung auf die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika waren keine multiresistenten Keime zu verzeichnen. Gegen das zur perioperativen Prophylaxe verwendete Cefazolin war nur ein Koagulase-negativer Staphylokokkus resistent. Somit ist die Prophylaxe mit Cefazolin gegen die kulturell nachgewiesenen Erreger *in vitro* weitgehend wirksam, keine Wirksamkeit besteht allerdings gegen Pseudomonaden. Bei der Betrachtung muss aber berücksichtigt werden, dass die molekular nachgewiesenen Keime nicht auszutesten waren und darunter besonders die Anaerobier mit einer Cefazolin-Prophylaxe nicht erfasst werden. Gerade bei Risikopatienten mit Einschränkung der Immunantwort wäre eine Ausweitung dieser Standard-Prophylaxe überlegenswert. Dabei würden sich beispielsweise Cephalosporine der Cefoxitin-Gruppe anbieten, diese sind neben einer deutlich stärkeren Pseudomonas-Aktivität auch gegen  $\beta$ -Lactamase bildende Anaerobier wirksam. Darüber hinaus ergeben sich auch Überlegungen zu therapeutischen Konsequenzen, da die einmalig perioperativ verabreichte Antibiotika-Prophylaxe eine Besiedlung der Implantate nach den vorliegenden Daten nicht sicher verhindern kann. Die prophylaktische Einmalgabe von Antibiotika kann wahrscheinlich vor einer geringen Anzahl von Bakterien in den ersten Tagen nach der Implantation schützen, kann aber nicht die Kolonisierung bei großen Erregermengen verhindern (Neut et al., 2001), die Oberfläche vor Biofilmbildung bewahren (Dunne et al., 2007) oder sogar ausgebildete Biofilme eliminieren (Tunney et al., 2007).

Ob aber eine längere antibiotische Prophylaxe mit ihrem Nutzen ihre Kosten und Nachteile aufwiegen kann, bleibt in folgenden Studien zu untersuchen. Wichtig ist die rechtzeitige Applikation der antimikrobiellen Substanz 30 bis 60 Minuten vor dem Operationsbeginn.

Gerade wegen der auch zu bedenkenden Nebenwirkungen systemisch verabreichter Antibiotika und in Anbetracht der Biofilmbildung der besiedelnden Erreger ist die Forschung an beschichteten Implantaten unerlässlich. Dabei liegt der klare Vorteil der das Implantat direkt umhüllenden antimikrobiellen Agenzien in einer lokalen Wirkung mit wesentlich geringerer Belastung des gesamten Organismus. Außerdem gibt es auch beim Einsatz von Osteosynthesen Indikationen, die einen sehr langen Verbleib im Körper indizieren, wie beispielsweise die künstliche Insertion von Sehnenplastiken in den Knochen mittels Interferenzschrauben nach Rupturen. Gerade in diesem Einsatzgebiet ist die Entwicklung Besiedlungs-unterdrückender Materialien von hoher Bedeutung. Neue Ansätze sind neben der Beschichtung solcher Implantate mit Antibiotika im Fokus der Entwicklung entsprechender Hersteller. Die Herstellung superhydrophober Oberflächen mit Lotus-Effekt steht dabei im Interesse der Entwickler. Dabei werden Beschichtungen mit nanopartikulären Substanzen wie Diamant, Hydroxyapatit und Metallkeramik ausgetestet (Alt et al., 2006; Catledge et al., 2002; Hill et al., 2008). Weiterhin sind Beschichtungen der Osteosynthesen mit nanopartikulärem Silber in Entwicklung, dabei werden die antimikrobiellen Eigenschaften des Silbers genutzt, um so zu einer Inhibition einer bakterieller Besiedlung zu führen (Alt et al., 2004; Chen et al., 2007; Das et al., 2008; Khalilpour et al., 2010).

Bis zur Entwicklung und Zulassung solcher Osteosynthesen steht im klinischen Alltag aber immer noch die Optimierung der Diagnosestellung Implantat-assoziiertes Infektionen im Vordergrund des Interesses. In der durchgeführten Studie ließ sich feststellen, dass die verwendete neue Bürsten-Methode eine aussichtsreiche Alternative zu bisher angewandten Untersuchungen fraglich besiedelter Implantate darstellt. Die untersuchte Methode brachte gerade im Umgang mit kleinsten Erregermengen klare Ergebnisse und ist so für die Untersuchung fraglich infizierter Implantate gut geeignet.

Bisher gibt es bezüglich der Diagnostik und Therapie Implantat-assoziiertes Infektionen keine interdisziplinären evidenzbasierten Leitlinien. Daraus resultieren in verschiedenen Kliniken und Laboratorien sehr unterschiedliche diagnostische Standards. Die hier entwickelte Methode zur Untersuchung auf mikrobielle Besiedler könnte ein Element einer solchen Leitlinie zur Diagnostik und Therapie Implantat-assoziiertes Infektionen werden.

Es ist auch eine Übertragung der Methode auf die Untersuchung anderer in den Körper eingebrachter Fremdkörper vorstellbar. Da gezeigt werden konnte, dass Bakterien nachgewiesen und spezifiziert werden können, kann nach eindeutiger Zuordnung des verursachenden Erregers eine empirische antiinfektive Therapie eingeleitet werden, die der kalkulierten Antibiotikagabe deutlich überlegen ist. Der Wissenszuwachs über die Mikrobiota der Osteosynthesen, der bei einer generellen Untersuchung infizierter Materialien mit der hier entwickelten Methode generiert werden würde, ist enorm. Für die kalkulierte antibiotische Therapie könnten deutlich spezifischere Empfehlungen gegeben und diese Therapieempfehlungen wiederum für eine Leitlinie verwendet werden.

## 5 Zusammenfassung

Osteosynthesen stellen eine bedeutende Behandlungsoption zur Versorgung von Knochenfrakturen dar. Dabei gehören Implantatinfektionen zu den gefürchtetsten Komplikationen, da sie neben dem Implantatversagen auch eine Quelle für disseminierte Infektionen darstellen. Bisher gibt es bezüglich der Diagnostik und Therapie Implantat-assoziiertes Infektionen keine interdisziplinären evidenzbasierten Leitlinien. Das Ziel dieser Arbeit war nach Etablierung einer geeigneten Aufarbeitungsmethode der Erhalt fundierter Kenntnisse über Osteosynthesen besiedelnde Mikrobiota.

Insgesamt wurden von 80 Patienten geplant explantierte Osteosynthesen untersucht. In Ermangelung einer Leitlinie und somit eines diagnostischen Goldstandards zur Feststellung bakterieller Besiedlung von Metallimplantaten wurde eine vollkommen neue Methodik der Implantat-Aufbereitung entwickelt und erprobt.

Dabei wurde durch manuelles, systematisches Abbürsten der bakterielle Biofilm zerstört und die Bakterien so den Nachweismethoden zugänglich gemacht. Unter Anwendung von kulturellen Anzuchtmethoden, 16S rDNA PCR und denaturierender Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC) konnten bei über 70% der untersuchten Osteosynthesen Bakterien nachgewiesen werden. Bei annähernd einem Drittel der besiedelten Osteosynthesen konnte gezeigt werden, dass sogar polymikrobielle Besiedlungen vorlagen. Dabei bot das Keimspektrum neben den am häufigsten nachgewiesenen Staphylokokken beispielsweise Enterobakterien, Laktobazillen und Moraxellen und ist mit vorangegangenen Untersuchungen an Gelenkersatzmaterialien vergleichbar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Großteil der geplant explantierten Implantate bakteriell besiedelt war. Da davon auszugehen ist, dass die besiedelnden Bakterien auf den Implantaten in Biofilmen organisiert sind, wurden *in-vitro*-Tests auf die Fähigkeit der Biofilmbildung durchgeführt. Weiterhin wurden die Antibiotikaszuszeptibilitäten ausgetestet und die klinischen Daten der Patienten mit nachweislich besiedelten Implantaten mit denen der Patienten ohne Besiedlung verglichen.

## Summary

The method of internal fixation is an important option in the treatment of bone fractures. Implantinfections are among the most feared complications, they do not only cause implant failures but are also a source of disseminated infections.

So far, regarding the diagnosis and treatment of implant-associated infections, there are no existing interdisciplinary evidence-based guidelines. The goal of this work was, after establishing a suitable working method, to obtain a proper understanding of the microbiota colonizing internal fixation devices.

In this study the on schedule explanted fixation devices of 80 patients were under examination. In absence of a proper guideline and a diagnostic gold standard for detecting bacterial colonization of metal implants a completely new method of treatment was developed and tested. Therefore the bacterial biofilm was destroyed by manual systematic brushing of the implant, which made the the bacteria available for the detection methods.

Applying cultural cultivation methods, 16S rDNA PCR and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) colonizing bacteria could be detected in over 70% of the investigated fixation devices. We showed that in approximately one-third of those devices even polymicrobial settlements existed. In addition to the most commonly detected staphylococci the bacterial spectrum offered other microbiota such as enterobacteria, lactobacilli and moraxellae; those results are comparable to previous studies of joint replacement materials.

In this study we were able to show, that the bulk of the explanted implants was colonized by bacteria. We assumed that the colonizing bacteria were organized in biofilms on the implants, so in vitro tests regarding the ability of biofilm formation were applied. Furthermore we determined antibiotic susceptibility and compared the clinical data of patients with evidence for colonization with those of patients without them.

## 6 Literaturverzeichnis

- Achermann, Y., Vogt, M., Leunig, M., Wust, J., and Trampuz, A. (2010): Improved Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection by Multiplex Polymerase Chain Reaction in Sonication Fluid of Removed Implants. *J Clin Microbiol*.
- Adam, D., H. Doerr, H. Link (2004): Die Infektiologie.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. (2009): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Elsevier. München.
- Alt, V., Bechert, T., Steinrucke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., Domann, E., and Schnettler, R. (2004): An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* **25**, 4383-91.
- Alt, V., Bitschnau, A., Osterling, J., Sewing, A., Meyer, C., Kraus, R., Meissner, S. A., Wenisch, S., Domann, E., and Schnettler, R. (2006): The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials* **27**, 4627-34.
- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143-69.
- Arens, S., and Hansis, M. (1998): Implantate in der Unfallchirurgie. *Deutsches Ärzteblatt* **24**, 4.
- Atkins, B. L., Athanasou, N., Deeks, J. J., Crook, D. W., Simpson, H., Peto, T. E., McLardy-Smith, P., and Berendt, A. R. (1998): Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol* **36**, 2932-9.
- Austin, M. S., Ghanem, E., Joshi, A., Lindsay, A., and Parvizi, J. (2008): A simple, cost-effective screening protocol to rule out periprosthetic infection. *J Arthroplasty* **23**, 65-8.
- Bassler, B. L. (2002): Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109**, 421-4.
- Bernard, L., Lubbeke, A., Stern, R., Bru, J. P., Feron, J. M., Peyramond, D., Denormandie, P., Arvieux, C., Chirouze, C., Perronne, C., and Hoffmeyer, P. (2004): Value of preoperative investigations in diagnosing prosthetic joint infection: retrospective cohort study and literature review. *Scand J Infect Dis* **36**, 410-6.
- Bigaillon, C., Cade, S., Soler, C., Boukhira, A., Le Fleche-Mateos, A., Herve, V., and Elouennass, M. (2008): [Post-traumatic scalp infection due to *Paenibacillus alvei*]. *Med Trop (Mars)* **68**, 311-2.
- Bjerkkan, G., Witso, E., and Bergh, K. (2009): Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro. *Acta Orthop* **80**, 245-50.

- Bosshard, P. P., Abels, S., Zbinden, R., Bottger, E. C., and Altwegg, M. (2003): Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *J Clin Microbiol* **41**, 4134-40.
- Bottner, F., Wegner, A., Winkelmann, W., Becker, K., Erren, M., and Gotze, C. (2007): Interleukin-6, procalcitonin and TNF-alpha: markers of peri-prosthetic infection following total joint replacement. *J Bone Joint Surg Br* **89**, 94-9.
- Broos, P. L., and Sermon, A. (2004): From unstable internal fixation to biological osteosynthesis. A historical overview of operative fracture treatment. *Acta Chir Belg* **104**, 396-400.
- Caligiorme, R. B., de Resende, M. A., Dias-Neto, E., Oliveira, S. C., and Azevedo, V. (1999): Dematiaceous fungal pathogens: analysis of ribosomal DNA gene polymorphism by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Mycoses* **42**, 609-14.
- Camilli, A., and Bassler, B. L. (2006): Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* **311**, 1113-6.
- Carrega, G., Bartolacci, V., Burastero, G., Casalino Finocchio, G., Grappiolo, G., Salomone, C., Sandrone, C., Santoriello, L., and Riccio, G. (2008): Etiology of prosthetic joint infections in a tertiary care centre in Italy. *Infesz Med* **16**, 204-8.
- Catledge, S. A., Fries, M. D., Vohra, Y. K., Lacefield, W. R., Lemons, J. E., Woodard, S., and Venugopalan, R. (2002): Nanostructured ceramics for biomedical implants. *J Nanosci Nanotechnol* **2**, 293-312.
- Chen, C. C., Teng, L. J., and Chang, T. C. (2004): Identification of clinically relevant viridans group streptococci by sequence analysis of the 16S-23S ribosomal DNA spacer region. *J Clin Microbiol* **42**, 2651-7.
- Chen, W., Oh, S., Ong, A. P., Oh, N., Liu, Y., Courtney, H. S., Appleford, M., and Ong, J. L. (2007): Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process. *J Biomed Mater Res A* **82**, 899-906.
- Clarridge, J. E., 3rd (2004): Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **17**, 840-62, table of contents.
- Costerton, B. (2004): Microbial ecology comes of age and joins the general ecology community. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16983-4.
- Costerton, J. W. (2005): Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res*, 7-11.
- Czerwionka-Szaflarska, M., and Parzecka, M. (2005): [Role of procalcitonin concentration in clinical diagnosis]. *Pol Merkur Lekarski* **19**, 584-6.

- Darbro, B. W., Petroelje, B. K., and Doern, G. V. (2009): *Lactobacillus delbrueckii* as the cause of urinary tract infection. *J Clin Microbiol* **47**, 275-7.
- Das, K., Bose, S., Bandyopadhyay, A., Karandikar, B., and Gibbins, B. L. (2008): Surface coatings for improvement of bone cell materials and antimicrobial activities of Ti implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **87**, 455-60.
- Dempsey, K. E., Riggio, M. P., Lennon, A., Hannah, V. E., Ramage, G., Allan, D., and Bagg, J. (2007): Identification of bacteria on the surface of clinically infected and non-infected prosthetic hip joints removed during revision arthroplasties by 16S rRNA gene sequencing and by microbiological culture. *Arthritis Res Ther* **9**, R46.
- Denton, M., and Kerr, K. G. (1998): Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 57-80.
- Dettmer, U., Folkerts, M., Kächler E., Sönnichsen A. (2005): Intensivkurs Biochemie. 256.
- Dickinson, G. M., and Bisno, A. L. (1989): Infections associated with indwelling devices: infections related to extravascular devices. *Antimicrob Agents Chemother* **33**, 602-7.
- Domann, E., Hong, G., Imirzalioglu, C., Turschner, S., Kuhle, J., Watzel, C., Hain, T., Hossain, H., and Chakraborty, T. (2003): Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* **41**, 5500-10.
- Dunne, N., Hill, J., McAfee, P., Todd, K., Kirkpatrick, R., Tunney, M., and Patrick, S. (2007): In vitro study of the efficacy of acrylic bone cement loaded with supplementary amounts of gentamicin: effect on mechanical properties, antibiotic release, and biofilm formation. *Acta Orthop* **78**, 774-85.
- Ferriere, F. (2000): [Procalcitonin, a new marker for bacterial infections]. *Ann Biol Clin (Paris)* **58**, 49-59.
- Fitzgerald, R. H., Jr., Peterson, L. F., Washington, J. A., 2nd, Van Scoy, R. E., and Coventry, M. B. (1973): Bacterial colonization of wounds and sepsis in total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* **55**, 1242-50.
- Fritsche, T. R., Sader, H. S., Stilwell, M. G., Dowzicky, M. J., and Jones, R. N. (2005): Potency and spectrum of tigecycline tested against an international collection of bacterial pathogens associated with skin and soft tissue infections (2000-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* **52**, 195-201.
- Fu, C. J., Carter, J. N., Li, Y., Porter, J. H., and Kerley, M. S. (2006): Comparison of agar plate and real-time PCR on enumeration of *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and total anaerobic bacteria in dog faeces. *Lett Appl Microbiol* **42**, 490-4.
- Fux, C. A., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., and Costerton, J. W. (2003): Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev Anti Infect Ther* **1**, 667-83.

- Gao, P., Pinkston, K. L., Nallapareddy, S. R., van Hoof, A., Murray, B. E., and Harvey, B. R. (2010): The *Enterococcus faecalis* *mjB* is required for pilin gene expression and biofilm formation. *J Bacteriol.*
- Gardes, M., and Bruns, T. D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* **2**, 113-8.
- Hahn, F., Zbinden, R., and Min, K. (2005): Late implant infections caused by *Propionibacterium acnes* in scoliosis surgery. *Eur Spine J* **14**, 783-8.
- Hahn, H., Kaufmann, S, Thomas F. Schulz und Sebastian Suerbaum (2009): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 6., komplett überarbeitete Auflage.
- Herrmann, M., Vaudaux, P. E., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, P. D., Schumacher-Perdreau, F., Peters, G., and Waldvogel, F. A. (1988): Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* **158**, 693-701.
- Hill, M. R., Catledge, S. A., Konovalov, V., Clem, W. C., Chowdhury, S. A., Etheridge, B. S., Stanishevsky, A., Lemons, J. E., Vohra, Y. K., and Eberhardt, A. W. (2008): Preliminary tribological evaluation of nanostructured diamond coatings against ultra-high molecular weight polyethylene. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **85**, 140-8.
- Horn, J., Schlegel, U., Krettek, C., and Ito, K. (2005): Infection resistance of unreamed solid, hollow slotted and cannulated intramedullary nails: an in-vivo experimental comparison. *J Orthop Res* **23**, 810-5.
- Huang, C. R., Lu, C. H., Wu, J. J., Chang, H. W., Chien, C. C., Lei, C. B., and Chang, W. N. (2005): Coagulase-negative staphylococcal meningitis in adults: clinical characteristics and therapeutic outcomes. *Infection* **33**, 56-60.
- Hurtle, W., Shoemaker, D., Henchal, E., and Norwood, D. (2002): Denaturing HPLC for identifying bacteria. *Biotechniques* **33**, 386-8, 390-1.
- Imirzalioglu, C., Hain, T., Chakraborty, T., and Domann, E. (2008): Hidden pathogens uncovered: metagenomic analysis of urinary tract infections. *Andrologia* **40**, 66-71.
- Jenkins, P. J., Clement, N. D., Gaston, P., Breusch, S., Simpson, H., and Dave, J. (2010): Invasive group B streptococcal disease in an orthopaedic unit. *J Hosp Infect.*
- Kanafani, Z. A., Sexton, D. J., Pien, B. C., Varkey, J., Basmania, C., and Kaye, K. S. (2009): Postoperative joint infections due to *Propionibacterium* species: a case-control study. *Clin Infect Dis* **49**, 1083-5.
- Kathju, S., Nistico, L., Hall-Stoodley, L., Post, J. C., Ehrlich, G. D., and Stoodley, P. (2009): Chronic surgical site infection due to suture-associated polymicrobial biofilm. *Surg Infect (Larchmt)* **10**, 457-61.

- Kawamura, Y., Hou, X. G., Sultana, F., Miura, H., and Ezaki, T. (1995): Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 406-8.
- Khalilpour, P., Lampe, K., Wagener, M., Stigler, B., Heiss, C., Ullrich, M. S., Domann, E., Schnettler, R., and Alt, V. (2010): Ag/SiO(x)C(y) plasma polymer coating for antimicrobial protection of fracture fixation devices. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **94**, 196-202.
- Kobayashi, N., Procop, G. W., Krebs, V., Kobayashi, H., and Bauer, T. W. (2008): Molecular identification of bacteria from aseptically loose implants. *Clin Orthop Relat Res* **466**, 1716-25.
- Kuroki, R., Kawakami, K., Qin, L., Kaji, C., Watanabe, K., Kimura, Y., Ishiguro, C., Tanimura, S., Tsuchiya, Y., Hamaguchi, I., Sakakura, M., Sakabe, S., Tsuji, K., Inoue, M., and Watanabe, H. (2009): Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Intern Med* **48**, 791-6.
- Larsson, S., Thelander, U., and Friberg, S. (1992): C-reactive protein (CRP) levels after elective orthopedic surgery. *Clin Orthop Relat Res*, 237-42.
- Law, M. D., Jr., and Stein, R. E. (1993): Late infection in healed fractures after open reduction and internal fixation. *Orthop Rev* **22**, 545-52.
- Liu, W., Smith, D. I., Rechtzigel, K. J., Thibodeau, S. N., and James, C. D. (1998): Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations. *Nucleic Acids Res* **26**, 1396-400.
- Luhr, H. G. (2000): [The development of modern osteosynthesis]. *Mund Kiefer Gesichtschir* **4 Suppl 1**, S84-90.
- Makarem, A. O., Schaudinn, C., Webster, P., and Linthicum, F. H. (2008): Possible role of biofilm in fulminant meningitis related to cochlear implantation of dysplastic inner ear. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* **129**, 245-8.
- Malic, S., Hill, K. E., Hayes, A., Percival, S. L., Thomas, D. W., and Williams, D. W. (2009): Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA FISH). *Microbiology* **155**, 2603-11.
- Marre, R., T. Mertens, M. Trautmann, W. Zimmerli (2007): Klinische Infektiologie: Infektionskrankheiten erkennen und behandeln. *Urban&Fischer*.
- Marrie, T. J., and Costerton, J. W. (1985): Mode of growth of bacterial pathogens in chronic polymicrobial human osteomyelitis. *J Clin Microbiol* **22**, 924-33.
- Matter, P. (1998): History of the AO and its global effect on operative fracture treatment. *Clin Orthop Relat Res*, 11-8.

- Mattmann, M. E., and Blackwell, H. E. (2010): Small Molecules That Modulate Quorum Sensing and Control Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Org Chem*.
- Mims, C., H. M. Dockrell, R. V. Goering, I. Roitt, D. Wakelin, M. Zuckerman (2006): Medizinische Mikrobiologie - Infektiologie. *Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH* 2. Auflage.
- Mohanty, M., Baby, S., and Menon, K. V. (2003): Spinal fixation device: a 6-year postimplantation study. *J Biomater Appl* **18**, 109-21.
- Mousa, H. A. (2001): Infection following orthopaedic implants and bone surgery. *East Mediterr Health J* **7**, 738-43.
- Mullard, A. (2008): Microbiology: the inside story. *Nature* **453**, 578-80.
- Nadkarni, M. A., Simonian, M. R., Harty, D. W., Zoellner, H., Jacques, N. A., and Hunter, N. (2010): Lactobacilli are prominent in the initial stages of polymicrobial infection of dental pulp. *J Clin Microbiol*.
- Nagorska, K., Ostrowski, A., Hinc, K., Holland, I. B., and Obuchowski, M. (2010): Importance of eps genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. *J Appl Genet* **51**, 369-381.
- Neut, D., van de Belt, H., Stokroos, I., van Horn, J. R., van der Mei, H. C., and Busscher, H. J. (2001): Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimicrob Chemother* **47**, 885-91.
- Neut, D., van Horn, J. R., van Kooten, T. G., van der Mei, H. C., and Busscher, H. J. (2003): Detection of biomaterial-associated infections in orthopaedic joint implants. *Clin Orthop Relat Res*, 261-8.
- Nguyen, L. L., Nelson, C. L., Saccante, M., Smeltzer, M. S., Wassell, D. L., and McLaren, S. G. (2002): Detecting bacterial colonization of implanted orthopaedic devices by ultrasonication. *Clin Orthop Relat Res*, 29-37.
- O'Toole, G. A., Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weaver, V. B., and Kolter, R. (1999): Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* **310**, 91-109.
- Ochs, B. G., Kommerell, M., Geiss, H. K., and Simank, H. G. (2005): [Improving microbiological diagnostics in septic orthopaedic surgery. Comparative study of patients receiving systemic antibiotic therapy]. *Orthopade* **34**, 345-51.
- Oliver, J. D. (2009): Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*.
- Ouyang, J., Pei, Z., Lutwick, L., Dalal, S., Yang, L., Cassai, N., Sandhu, K., Hanna, B., Wieczorek, R. L., Bluth, M., and Pincus, M. R. (2008): Case report: *Paenibacillus thiaminolyticus*: a new cause of human infection, inducing bacteremia in a patient on hemodialysis. *Ann Clin Lab Sci* **38**, 393-400.

- Ozdemir, H., Urguden, M., Soyuncu, Y., and Aslan, T. (2002): [Long-term functional results of adult intra-articular distal humeral fractures treated by open reduction and plate osteosynthesis]. *Acta Orthop Traumatol Turc* **36**, 328-35.
- Patel, R., Piper, K. E., Rouse, M. S., Steckelberg, J. M., Uhl, J. R., Kohner, P., Hopkins, M. K., Cockerill, F. R., 3rd, and Kline, B. C. (1998): Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. *J Clin Microbiol* **36**, 3399-407.
- Penny, C., Nadalig, T., Alioua, M., Gruffaz, C., Vuilleumier, S., and Bringel, F. (2010): Coupling of denaturing high-performance liquid chromatography and terminal restriction fragment length polymorphism with precise fragment sizing for microbial community profiling and characterization. *Appl Environ Microbiol* **76**, 648-51.
- Piper, K. E., Fernandez-Sampedro, M., Steckelberg, J. M., Mandrekar, J. N., Karau, M. J., Steckelberg, J. M., Berbari, E. F., Osmon, D. R., Hanssen, A. D., Lewallen, D. G., Cofield, R. H., Sperling, J. W., Sanchez-Sotelo, J., Huddleston, P. M., Dekutoski, M. B., Yaszemski, M., Currier, B., and Patel, R. (2010): C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate and orthopedic implant infection. *PLoS One* **5**, e9358.
- Piper, K. E., Jacobson, M. J., Cofield, R. H., Sperling, J. W., Sanchez-Sotelo, J., Osmon, D. R., McDowell, A., Patrick, S., Steckelberg, J. M., Mandrekar, J. N., Fernandez Sampedro, M., and Patel, R. (2009): Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection by use of implant sonication. *J Clin Microbiol* **47**, 1878-84.
- Pitt, W. G., and Ross, S. A. (2003): Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnol Prog* **19**, 1038-44.
- Raz, G., Ofiram, E., Arieli, I., and Sagiv, S. (2009): Disseminating septic arthritis following hip hemiarthroplasty. *Isr Med Assoc J* **11**, 317-8.
- Sampedro, M. F., Piper, K. E., McDowell, A., Patrick, S., Mandrekar, J. N., Rouse, M. S., Steckelberg, J. M., and Patel, R. (2009): Species of *Propionibacterium* and *Propionibacterium acnes* phylotypes associated with orthopedic implants. *Diagn Microbiol Infect Dis* **64**, 138-45.
- Sanderson, P. J. (1991): Infection in orthopaedic implants. *J Hosp Infect* **18 Suppl A**, 367-75.
- Scharf, H., Rüter, A (2008): Orthopädie und Unfallchirurgie.
- Scherer, M. A., Neumaier, M., and von Gumppenberg, S. (2001): C-reactive protein in patients who had operative fracture treatment. *Clin Orthop Relat Res*, 287-93.
- Schmidmaier, G., Lucke, M., Wildemann, B., Haas, N. P., and Raschke, M. (2006): Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury* **37 Suppl 2**, S105-12.

- Schwaber, M. J., Raney, P. M., Rasheed, J. K., Biddle, J. W., Williams, P., McGowan, J. E., Jr., and Tenover, F. C. (2004): Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum beta-lactamases in non-Escherichia coli and Non-Klebsiella spp. of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* **42**, 294-8.
- Sillanpaa, J., Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Prakash, V. P., Fothergill, T., Ton-That, H., and Murray, B. E. (2010): Characterization of the ebp pilus-encoding operon of Enterococcus faecium and its role in biofilm formation and virulence in a murine model of urinary tract infection. *Virulence* **1**, 236-246.
- Statistisches Bundesamt (2009): Statistisches Jahrbuch. 27.
- Stock, I. (2008): Erkrankungen durch Koagulase-negative Staphylokokken. *Chemotherapie Journal* **17**, 10-24.
- Stoodley, P., Kathju, S., Hu, F. Z., Erdos, G., Levenson, J. E., Mehta, N., Dice, B., Johnson, S., Hall-Stoodley, L., Nistico, L., Sotereanos, N., Sewecke, J., Post, J. C., and Ehrlich, G. D. (2005): Molecular and imaging techniques for bacterial biofilms in joint arthroplasty infections. *Clin Orthop Relat Res*, 31-40.
- Strathmann, M. (1999): Herstellung und Untersuchung von Hydrogelen als Biofilm-Modelle.
- Takajo, I., and Okayama, A. (2010): [Diagnosis of bacterial infection using procalcitonin]. *Rinsho Byori* **58**, 517-22.
- Taylor, S. M., Wolfe, C. R., Dixon, T. C., Ruch, D. S., and Cox, G. M. (2010): Wound botulism complicating internal fixation of a complex radial fracture. *J Clin Microbiol* **48**, 650-3.
- Trampuz, A., Piper, K. E., Hanssen, A. D., Osmon, D. R., Cockerill, F. R., Steckelberg, J. M., and Patel, R. (2006): Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination. *J Clin Microbiol* **44**, 628-31.
- Trampuz, A., Piper, K. E., Jacobson, M. J., Hanssen, A. D., Unni, K. K., Osmon, D. R., Mandrekar, J. N., Cockerill, F. R., Steckelberg, J. M., Greenleaf, J. F., and Patel, R. (2007): Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* **357**, 654-63.
- Trampuz, A., and Widmer, A. F. (2006): Infections associated with orthopedic implants. *Curr Opin Infect Dis* **19**, 349-56.
- Trampuz, A., and Zimmerli, W. (2005): Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly* **135**, 243-51.
- Trampuz, A., and Zimmerli, W. (2006): Antimicrobial agents in orthopaedic surgery: Prophylaxis and treatment. *Drugs* **66**, 1089-105.

- Tunney, M. M., Dunne, N., Einarsson, G., McDowell, A., Kerr, A., and Patrick, S. (2007): Biofilm formation by bacteria isolated from retrieved failed prosthetic hip implants in an in vitro model of hip arthroplasty antibiotic prophylaxis. *J Orthop Res* **25**, 2-10.
- Tunney, M. M., Patrick, S., Curran, M. D., Ramage, G., Hanna, D., Nixon, J. R., Gorman, S. P., Davis, R. I., and Anderson, N. (1999): Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* **37**, 3281-90.
- van Den Bosch, B. J., de Coo, R. F., Scholte, H. R., Nijland, J. G., van Den Bogaard, R., de Visser, M., de Die-Smulders, C. E., and Smeets, H. J. (2000): Mutation analysis of the entire mitochondrial genome using denaturing high performance liquid chromatography. *Nucleic Acids Res* **28**, E89.
- Vinh, D. C., and Embil, J. M. (2005): Device-related infections: a review. *J Long Term Eff Med Implants* **15**, 467-88.
- Wagner, C., Hansch, G. M., Wentzensen, A., and Heppert, V. (2006): [Implant-associated post-traumatic osteomyelitis. Bacterial biofilms and the immune defence as protagonists of the local inflammatory process]. *Unfallchirurg* **109**, 761-9.
- Walter, and Hoffmann (2008): Implant-associated infections in orthopedic and trauma surgery. *Krankenhaus-Hygiene und Infektionsverhütung Heft 1 2009*, 6.
- Wang, R. F., Cao, W. W., and Cerniglia, C. E. (1996): PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1242-7.
- Welkerling, H., Geissdorfer, W., Aigner, T., and Forst, R. (2006): Osteomyelitis of the ulna caused by *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* **44**, 3835-7.
- Wilson, M. (2001): Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog* **84**, 235-54.
- Zeller, V., Ghorbani, A., Strady, C., Leonard, P., Mamoudy, P., and Desplaces, N. (2007): *Propionibacterium acnes*: an agent of prosthetic joint infection and colonization. *J Infect* **55**, 119-24.

## 7 Anhang

Probe	Patient		Implantat Besiedlung	Labor		Implantations- dauer (Monate)	Lokalisation	Material
	Geschl.	Alter (Jahre)		CRP (mg/l)	Leukozyten (giga/l)			
1	w	67	positiv	6,9	4,9	12	Articulatio talocruralis	Platte
2	n.b.	n.b.	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Platte
3	m	35	positiv	1	10,7	15	Articulatio talocruralis	Platte
4	m	n.b.	-	55	9,6	15	Femur	Marknagel
5	w	61	-	< 0,5	6,6	8	Radius	Platte
6	w	61	positiv	17,7	7,8	15,5	Articulatio talocruralis	Platte
7	m	41	positiv	< 0,5	5,2	16	Femur	Marknagel
8	w	42	positiv	1,2	5,4	6	Clavicula	Platte
9	w	70	positiv	38	9,7	27	Femur	Platte
10	m	38	positiv	< 0,5	4,7	23	Humerus	Platte
11	w	80	-	0,7	6,3	2	Femur	Schrauben
12	m	14	-	11,4	12	3	Tibia	Platte
13	m	22	-	8,3	9,2	8	Radius	K-Draht
14	m	13	-	6	9,1	3	Tibia	Schrauben
15	m	67	-	5,7	7,1	2	Sprunggelenk	Schrauben
16	m	70	-	1,3	6,4	31	Tibia	Platte
17	w	78	-	4,8	6,5	14	Humerus	Platte
18	w	11	positiv	1,5	10	1,5	Femur	Schrauben
19	m	34	positiv	2	7,4	4	Tibia	Schrauben
20	w	42	positiv	n.b.	n.b.	n.b.	Clavicula	Schrauben
21	m	76	positiv	3,2	5,4	14	Sprunggelenk	Platte
22	w	14	positiv	< 0,5	8,3	10	Clavicula	Platte
23	w	52	positiv	11,6	8,7	12	Vertebra lumbalis	Schrauben
24	m	26	positiv	5,3	9,2	n.b.	Clavicula	Platte
25	m	56	positiv	68	12,3	1	Tibia	Marknagel
26	m	46	-	4,1	4	12	Femur	Marknagel
27	w	73	positiv	< 0,5	7,4	9	Humerus	Platte
28	w	25	positiv	38	9	14	Tibia	Platte
29	m	21	positiv	30,5	6,8	22	Clavicula	Platte
30	w	71	positiv	13,8	10,5	13	Tibia	Platte
31	m	44	positiv	0,7	6,8	5	Radius	Platte
32	m	44	positiv	45,8	10,2	9	Tibia	Marknagel
33	m	46	-	12,9	10,5	13	Articulatio talocruralis	Platte
34	m	56	-	1,4	7,1	17	Articulatio talocruralis	Platte
35	m	66	positiv	1,5	5	2,5	Clavicula	Platte
36	m	35	positiv	3,3	7,1	13	Tibia	Platte
37	w	59	positiv	< 0,5	5,3	0,5	Articulatio talocruralis	Schrauben
38	m	41	positiv	< 0,5	9,5	4	Manus	Schrauben
39	m	63	positiv	43,5	6,4	3	Articulatio talocruralis	Platte
40	n.b.	n.b.	positiv	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Marknagel
41	m	30	positiv	2	5,6	9	Femur	Marknagel
42	m	51	positiv	7,8	3,3	22	Clavicula	Platte
43	m	66	positiv	15,1	4	13	Humerus	Platte
44	m	53	positiv	9,5	10,9	0,5	Sacrum	Platte
45	m	43	positiv	11,7	9,2	9	Vertebra lumbalis	K-Draht
46	w	67	positiv	13,2	6,7	13	Radius	Platte
47	w	36	positiv	1,3	6,6	60	Radius	Schrauben

Probe	Patient		Implantat Besiedlung	Labor		Implantations- dauer (Monate)	Lokalisation	Material
	Geschl.	Alter (Jahre)		CRP (mg/l)	Leukozyten (giga/l)			
48	w	45	positiv	2,8	7,7	13	Humerus	Platte
49	m	43	positiv	< 0,5	7,1	11	Articulatio talocruralis	Platte
50	m	5	positiv	n.b.	n.b.	3	Radius	Platte
51	w	13	-	< 0,5	7,1	7	Tibia	Platte
52	w	35	positiv	< 0,5	5,2	16	Humerus	Platte
53	w	23	-	10,3	8	12	Articulatio talocruralis	Schrauben
54	m	60	-	< 0,5	6,4	12	Humerus	Platte
55	m	28	positiv	2,4	8,2	1,5	Manus	K-Draht
56	n.b.	n.b.	positiv	n.b.	n.b.	n.b.	Humerus	Marknagel
57	w	68	positiv	6,4	7,5	9	Radius	Platte
58	w	9	positiv	n.b.	n.b.	1,5	Humerus	K-Draht
59	m	14	positiv	n.b.	n.b.	6	Clavicula	Platte
60	w	76	positiv	2	6,6	18	Vertebra lumbalis	Schrauben
61	m	43	positiv	< 0,5	5,8	21	Ulna	Platte
62	m	25	positiv	3,9	9,5	17	Clavicula	Platte
63	w	32	positiv	8	6,9	12,5	Ulna	Platte
64	m	23	positiv	< 0,5	6,4	17	Calcaneus	Schrauben
65	m	31	positiv	6,7	8,7	26	Articulatio talocruralis	Platte
66	w	75	positiv	22,3	4,1	5	Ulna	Platte
67	m	67	positiv	< 0,5	4,6	4	Clavicula	Platte
68	m	28	positiv	6,6	6,8	3	Tibia	Schrauben
69	w	69	-	< 0,5	9,2	13	Humerus	Platte
70	w	10	positiv	0,6	5,8	5	Femur	Platte
71	w	64	positiv	11,1	7,7	11	Articulatio talocruralis	Platte
72	w	43	positiv	2,6	5,5	4	Clavicula	Platte
73	w	52	positiv	7,4	7,2	24	Articulatio talocruralis	Schrauben
74	w	73	-	< 0,5	4,5	16	Tibia	Platte
75	m	57	positiv	1,9	4,8	17	Calcaneus	Schrauben
76	m	20	-	20,1	10	8	Articulatio talocruralis	Platte
77	m	25	-	< 0,5	9,4	6	Clavicula	Platte
78	w	45	-	1,2	7,7	20	Radius	Platte
79	m	34	-	2,6	10,2	n.b.	Tibia	Platte
80	w	66	positiv	< 0,5	5,7	9	Radius	Platte

### **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.“

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

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

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eugen Domann, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Promotionsthemas und die fachliche Unterstützung herzlich bedanken. Besonders danke ich ihm für die gründlichen und raschen Korrekturen in der Phase der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Can Imirzalioglu danke ich für eine gute Betreuung, fachlichen Beistand, viel Geduld während der Einarbeitung und der experimentellen Phase und ganz besonders dafür, dass er mir nie das Gefühl gegeben hat ihn zu stören, auch wenn er selbst gerade zeitlich sehr ausgelastet war.

Für eine gute und reibungslose Zusammenarbeit mit der Unfallchirurgie des UKGM Standort Gießen danke ich Herrn PD Dr. Dr. Volker Alt und Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler.

Vielen Dank an die Mitarbeiterinnen des Instituts für medizinische Mikrobiologie. Insbesondere danke ich Isabell Trur, Kirsten Bommersheim, Claudia Neumann und Silke Zechel-Gran für geduldige Einarbeitung und unerschöpfliche konstruktive Beantwortung meiner Fragen.

Für die kostenfreie Sonderanfertigung der in den Experimenten benötigten Metallwürfel möchte ich der Firma Stryker danken.

Ich danke den Patienten für ihre freiwillige Teilnahme und ihre Zustimmung zur Verwendung ihrer Daten.

Ich danke meinen Freunden, ganz besonders Charlotte, für fortwährende Motivation, fleißiges Korrekturlesen und besonders ihr Dasein in schwierigen Situationen. Meinem weltlichen Patenonkel Cornelius danke ich für motivierende Gespräche und finanzielle Unterstützung.

Meinem Mann Roland danke ich für den liebevollen Rückhalt und die Unterstützung während der gesamten Zeit und dafür, dass er die Launen in den verschiedenen Phasen dieser Arbeit ertragen hat.

Schließlich bedanke ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Mutter, ohne die ich diese Arbeit wahrscheinlich sehr viel später oder nie beendet hätte. Ich danke für ihre Motivation, fast endloses Verständnis und lebenswürdige Unterstützung.