

**Etablierung eines Kleintiermodells zur Simulation
einer *Two-Stage-Revision Procedure*
bei Implantat-assoziiertes Methicillin-resistenter
Staphylococcus aureus Infektion**

Eine experimentelle Studie am Kaninchen

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

vorgelegt von **Maximilian Brunotte**
aus
Bad Gandersheim

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik

für Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie

und dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie

Gutachter: **Prof. Dr. Dr. Volker Alt**

Gutachter: **PD Dr. Christian Fölsch**

Tag der Disputation: **03.12.2021**

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und theoretische Grundlagen	1
1.1	Endoprothetik	1
1.1.1	Definition und historischer Überblick	1
1.1.2	Ätiologie und Epidemiologie	3
1.2	Protheseninfektionen.....	5
1.2.1	Definition und Klassifikationen	5
1.2.2	Erregerspektrum und Pathogenese	8
1.2.3	Inzidenz und Risikofaktoren	13
1.2.4	Protheseninfektionen durch MRSA.....	15
1.2.5	Diagnostik und Behandlungsstrategien.....	19
1.2.6	Therapieversagen und Folgen	29
1.3	Ziel der Arbeit.....	31
2	Material und Methoden.....	32
2.1	Material	32
2.1.1	Geräte und Software	32
2.1.2	Medikamente	33
2.1.3	OP-Materialien	33
2.1.4	Basismedien, Zusätze, Chemikalien, Kits, Labormaterialien	35
2.1.5	Versuchstiere	37
2.1.6	Bakterien	37
2.1.7	Spacer.....	38
2.2	Methoden.....	40
2.2.1	Studiendesign	40
2.2.2	Operationstechnik.....	41
2.2.3	Postoperatives Röntgen.....	46
2.2.4	Klinische Begutachtung	47
2.2.5	Gewichtsentwicklung.....	47
2.2.6	Radiologische Beurteilung am Tag der Euthanasie.....	48
2.2.7	Mikrobiologie.....	48
2.2.8	Histologie	52

3	Ergebnisse	59
3.1	Klinische Begutachtung	59
3.2	Gewichtsentwicklung.....	62
3.3	Radiologische Beurteilung am Tag der Euthanasie.....	65
3.4	Histologie	66
3.5	Mikrobiologie	71
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	74
4	Diskussion	77
4.1	Grundlegendes	77
4.2	Entwickeltes Tiermodell und erzielte Ergebnisse	78
4.3	Weitere experimentelle Studien am Tier im Vergleich	82
4.4	Limitationen und beeinflussende Faktoren	86
4.5	Ausblick.....	90
5	Zusammenfassung	92
6	Summary	94
7	Abkürzungsverzeichnis.....	96
8	Abbildungsverzeichnis.....	98
9	Tabellenverzeichnis	102
10	Literaturverzeichnis	103
11	Anhang	120
12	Publikationsverzeichnis	121
13	Posterbeitrag.....	122
14	Ehrenwörtliche Erklärung	123
15	Danksagung.....	124
16	Lebenslauf	125

1 Einleitung und theoretische Grundlagen

1.1 Endoprothetik

1.1.1 Definition und historischer Überblick

Unter dem Terminus Endoprothetik (Endo - Prothese, von griechisch: *endo* „innen“ und Prothese, von griechisch: *pro* „vor, anstatt“ und *thesis* „das Setzen, Stellen“) versteht man in der traumatologischen und orthopädischen Chirurgie den unumgänglichen Ersatz eines Gelenks bzw. einzelner Gelenkflächen durch ein artifiziell hergestelltes Material. Dieses wird in einem operativen Verfahren im Körper der betroffenen Person verankert und ist zum dauerhaften Verbleib vorgesehen (Bleß & Kip 2017). Dementsprechend wird in diesem Zusammenhang und besonders im umgangssprachlichen Gebrauch auch der Ausdruck des *künstlichen Gelenks* synonym verwendet.

Man unterscheidet zwischen einem Teilgelenkersatz und einem Totalgelenkersatz. Während bei einem Teilersatz lediglich einzelne Gelenkflächen durch eine sogenannte Hemiprothese (HEP) ausgetauscht werden, ersetzt man im Rahmen eines Totalersatzes das komplette Gelenk mittels einer entsprechend benannten Totalendoprothese (TEP) (Bleß & Kip 2017). Anwendungsgebiete der traumatologischen und orthopädischen Endoprothetik sind unter anderem artifizielle Gelenke im Hüft-, Knie, Schulter-, Ellenbogen- sowie Fuß- und Sprunggelenksbereich (Claes et al 2012a, Loew 2010, Neumann 2012, Rüter & Simmen 2013, Wirtz 2011).

Historisch gesehen geht die Entwicklung der Endoprothetik bis in das späte 19. Jahrhundert zurück, wie es E. Morscher (1995), Claes et al. (2012a) und Wirtz (2011) zusammenfassen. So war es im Jahr 1890 der Berliner Chirurg Themistokles Gluck, der als Erster einen kompletten Gelenkersatz mit körperfremdem Material durchzuführen versuchte und sich zu einem Totalersatz äußerte (Gluck 1890a, Gluck 1890b, Gluck 1891). Er implantierte Patienten, deren Knie durch Tuberkulose degeneriert waren, einen aus Elfenbein bestehenden Gelenkersatz in Form eines Scharniergelenks. Aufgrund fehlender Asepsis und durch Materialversagen scheiterten diese ersten Versuche allerdings (Claes et al 2012a). Es dauerte bis in die fortgeschrittene Anfangsphase des 20.

Jahrhunderts, bis die entscheidenden Entwicklungsschritte hin zur modernen Endoprothetik eingeleitet wurden. 1923 stellte der Bostoner Chirurg Smith-Petersen die von ihm entwickelte „Mould Arthroplasty“ vor (Smith-Petersen 1978). Dabei wurde zunächst eine Kappe aus Glas auf den Femurkopf gesetzt. Durch unzureichende Ergebnisse fand eine Weiterentwicklung dieser Kappe hin zu Vitallium als genutztem Material statt. Im Jahr 1938 war es Philip Wiles der nach vorangegangenen und vielversprechenden Tierversuchen die erste Hüft-TEP bei insgesamt sechs Patienten implantierte (Wiles 1958). Nachdem in den darauffolgenden Jahren diverse weitere Formen und Arten von Hemi- (Judet & Judet 1950, Moore 1952, Valls 1952) und Totalendoprothesen (McKee & Watson-Farrar 1966) für Hüfte und Knie entwickelt worden waren, legte Charnley im Jahr 1960 mit der Etablierung von Polymethylmethacrylat- (PMMA) Knochenzement einen neuen Maßstab (Charnley 1960, Charnley 1961). Denn zuvor war eines der größten Probleme der damaligen Endoprothetik die vorzeitige Materiallockerung im Bereich der Verankerungskomponenten am Knochen (Claes et al 2012a). Auch Haboush (Haboush 1953) versuchte sich bereits an PMMA-Knochenzement, setzte sich damit aber noch nicht durch.

Darüber hinaus gelang es John Charnley, weitere wegweisende Entwicklungsschritte auf dem Weg zur modernen Endoprothetik durchzuführen. So konnte er in den 1960er Jahren mit der sogenannten *Low-Friction Arthroplasty* den Materialabrieb durch Verringerung der wirkenden Reibungs- und Scherkräfte deutlich verringern (Charnley 1961, Charnley 1970). Immer bessere Langzeitergebnisse konnten somit erzielt werden.

Nach den ersten, über einhundert Jahre zurückliegenden Versuchen, artifizielle Gelenkformen in der operativen Chirurgie zu etablieren, stellt die endoprothetische Versorgung heutzutage eine der erfolgreichsten Operationen im Bereich der traumatologischen und orthopädischen Chirurgie überhaupt dar (Learmonth et al 2007). So betiteln Learmonth et al (2007) den endoprothetischen Hüftgelenkersatz mit *Operation of the Century* und unterstreichen damit die herausragende Bedeutung dieses operativen Verfahrens für die heutige Medizin.

Aufgrund der Übersichtlichkeit, dem vorgegebenen Rahmen der vorliegenden Arbeit und vor allem wegen der größeren Bedeutung, beziehen sich alle folgenden Abschnitte lediglich auf die Hüft- und Knieendoprothetik. Die durchaus ebenso vielfältigen anderen Felder dieses Fachgebiets müssen an anderer Stelle besprochen werden und sind nicht Teil dieser Arbeit.

1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie

Die global am häufigsten vorkommende Gelenkerkrankung ist die Arthrose (Krukemeyer & Möllenhof 2012). Sie ist in symptomatischer Form die *primäre* Ursache für die Notwendigkeit eines künstlichen Gelenkersatzes im Bereich des Hüft- und Kniegelenkes in Deutschland und den USA (Singh et al 2010, Wengler et al 2014). In Deutschland werden über 80 % der Erstoperationen an der Hüfte aufgrund einer Hüftgelenksarthrose (Coxarthrose) und 96 % der Erstoperationen am Knie aufgrund einer Kniegelenksarthrose (Gonarthrose) durchgeführt (Bleß & Kip 2017).

Die Leitsymptome der Arthrose sind Schmerzen und eine progrediente Bewegungseinschränkung. Unterschieden wird zwischen der *primären* und der *sekundären* Arthrose (Adler 2004, Bleß & Kip 2017). Die *primäre* Arthrose entsteht als degenerative Abnutzungserscheinung ohne nachweisliche Ursache und steht vornehmlich mit dem Risikofaktor *Alter* in Verbindung. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von *idiopathischer* Arthrose. Die Pathogenese lässt sich vereinfacht als unzureichender Stoffwechsel des Gelenkknorpels im Bereich der knorpeligen Gelenkfläche und einem damit verbundenen Funktions- und Gewebeverlust erklären, wie von Adler (2004) beschrieben. Demgegenüber lassen sich die *sekundären* Arthrosen abgrenzen. Hierbei führen ein oder mehrere Risikofaktoren zur degenerativen Gelenkerstörung. Den *sekundären* Arthrose zuzuordnen sind: die *metabolische* Arthrose (Bsp. Gicht und Ochronose), die *traumatisch* bedingte Arthrose (Frakturen, die im Laufe der Zeit eine Gelenkdestruktion nach sich ziehen), eine Arthrose aufgrund *angeborener* oder *erworbener* Gelenkschäden (Bsp. Hüftdysplasie, Kniefehlstellungen, Fehlbelastungen, etc.), die *endokrine* Arthrose (Bsp. Diabetes mellitus) und eine Arthrose aufgrund *anderer Ursachen* (Bsp. septische Erkrankungen, entzündlich-rheumatische Erkrankungen, avaskuläre Nekrosen etc.) (Adler 2004, Bleß & Kip 2017).

Neben jeglicher Art der Arthrose gibt es weitere Ursachen für die Notwendigkeit eines endoprothetischen Gelenkersatzes. So ist ein zusätzlicher Hauptgrund für die Implantation einer TEP beispielsweise eine gelenknahe Fraktur, die im primären Therapiekonzept den direkten künstlichen Gelenkersatz beinhaltet. Strohm et al (2015) führen an, dass in Deutschland im Jahr 2011 ca. 25 % aller Hüft-TEPs frakturbedingt implantiert wurden. Besonders im hohen Lebensalter (> 90 Jahre) ist eine proximale Femurfraktur die Hauptursache für den artifizialen Hüftgelenkersatz (Claes et al 2012a).

Weitere Ursachen können drohende Frakturen aufgrund von Osteolysen, primären Knochentumoren, Metastasen oder Osteoporose sein (Claes et al 2012a).

Epidemiologisch betrachtet ist seit der Durchführung der ersten Gelenkprothesen im Bereich des Knie- und Hüftgelenks ein stetiger Anstieg der Implantationszahlen zu verzeichnen. Kurtz et al (2005) beschreibt für die USA im Zeitraum von 1990 bis 2002 einen Anstieg der Implantationen pro 100.000 Einwohner im Bereich der primären Hüft-TEPs um 46 % (Fallzahl insgesamt: 119.000 auf 193.000). Der Anstieg der primären Knie-TEPs hat sich in diesem Zeitraum für die gleiche Bezugsgröße sogar verdreifacht (Fallzahl insgesamt: 129.000 auf 381.000). Eine detaillierte Analyse von Singh et al (2010), die die Entwicklung im Olmsted County, Minnesota (USA) im Zeitraum von 1969 bis 2008 (unterteilt in drei bis fünf Jahres Zeitintervalle) beleuchtet, zeigt ebenfalls, dass über den gesamten Erfassungszeitraum ein stetiger Anstieg der Hüft- und Knie-TEP Implantationen zu verzeichnen war. Die alters- und geschlechtsbereinigten Zahlen bezogen auf Hüft-TEPs zeigen für das Zeitintervall 1969 bis 1972 50,2 Prothesen pro 100.000 Personen verglichen zu 145,4 Prothesen pro 100.000 Personen im Zeitintervall von 2005 bis 2008. Ein besonders starker Anstieg ließ sich in den letzten Analyseintervallen feststellen. So konnte in den Jahren 2001 bis 2004 eine Steigerung um 20 % und in den Jahren 2005 bis 2008 um 43 % nachgewiesen werden (Singh et al 2010). Die Analyse zeigt einen noch stärkeren Trend bei Knie-TEPs. Hier wurden alters- und geschlechtsbereinigt im Zeitraum 1971 bis 1976 31,2 Knie-TEPs pro 100.000 Personen und in den Jahren 2005 bis 2008 220,9 pro 100.000 Personen implantiert. Auch bei den Knie-TEPs konnten Singh et al (2010) einen besonders starken Anstieg in den letzten Analyseintervallen aufweisen. Die Zahlen stiegen in den Jahren 2001 bis 2004 um 32 % und in den Jahren 2005 bis 2008 um 24 % an.

Der in den USA beschriebene Trend zeigt sich ebenfalls in Deutschland. Wengler et al (2014) untersuchten den durchgeführten Hüft- und Kniegelenkersatz im Zeitraum von 2005 bis 2011 in Deutschland und den USA. Für Deutschland zeigte sich in den Rohdaten eine Zunahme der primär durchgeführten Hüft-TEPs von 254 auf 284 pro 100.000 Personen (Fallzahl insgesamt: 209.292 auf 232.320) und der Knie-TEPs von 164 auf 206 pro 100.000 Personen (Fallzahl insgesamt: 135.133 auf 168.486). Dies ist ein Anstieg innerhalb von sechs Jahren um 11 % im Bereich der Hüft-TEPs und von 22 % im Bereich der Knie-TEPs. Wengler et al (2014) haben die Daten zwischen Deutschland und den USA auch untereinander verglichen. Nach Korrektur der unterschiedlichen

Bevölkerungsstruktur zeigte sich, dass in Deutschland im Jahr 2011 ca. 1,4-mal häufiger Hüft-TEPs durchgeführt wurden als in den USA. Verglichen hierzu wurden in den USA 2011 ca. 1,5-mal häufiger Knie-TEPs implantiert.

Auch in Zukunft wird sich der aktuelle Trend fortsetzen. Kurtz et al (2007a) prophezeien, dass in den USA bis zum Jahr 2030 ca. 572.000 primäre Hüft-TEPs implantiert werden. Dies würde einen Anstieg um 174 % von 2005 bis 2030 bedeuten. Die erwarteten Zahlen bezüglich der primären totalen Knieendoprothesen sind noch weitaus höher. Kurtz et al (2007a) gehen davon aus, dass im gleichen Zeitintervall ein Anstieg um 673 % zu verzeichnen sein wird, was einer Anzahl von ca. 3,48 Millionen Prothesen entspräche.

1.2 Protheseninfektionen

1.2.1 Definition und Klassifikationen

Protheseninfektionen (abgekürzt PJI vom englischen *periprotetic joint infection*) beruhen vereinfacht dargestellt auf einer Infektion des periimplantären Gewebes, eines in den Körper eingebrachten künstlichen Gelenkersatzes (Otto-Lambertz et al 2017). Eine einheitliche Definition mit standardisierten Diagnosekriterien lag lange Zeit nicht vor (Parvizi et al 2011a). Zimmerli (2004) versuchte 2004 nach Auswertung verschiedener Arbeiten (Berbari et al 1998, Brandt et al 1997, Meehan et al 2003, Tattavin et al 1999) als einer der ersten Autoren zusammenzufassen, dass mindestens eines der folgenden vier Kriterien zur Diagnosestellung einer PJI erfüllt sein muss: (1) Wachstum desselben Erregers in zwei oder mehr Zellkulturen einer Gelenkprobe, (2) eitrige Synovia bzw. Eiter im Bereich des Implantats, (3) histopathologische Zeichen eines akuten Inflammationsgeschehens im periprotetischen Gewebe oder (4) das Vorhandensein einer Gelenkfistel zwischen Haut und Implantat.

Auch in den Folgejahren wurde eine Vielzahl an Studien und Artikel, die sich mit der Definition von PJIs auseinandersetzen, veröffentlicht (Berbari et al 2007, Parvizi et al 2006, Parvizi et al 2008, Schinsky et al 2008, Trampuz et al 2007, Trampuz & Zimmerli 2005, Trampuz & Zimmerli 2008, Zimmerli 2006). Doch erst ab 2010 finden sich durch diverse Fachgesellschaften, wie der *American Academy of Orthopaedic Surgeons* (AAOS), der *Musculoskeletal Infection Society* (MSIS), der *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) und der *Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française*

(SPILF) nahezu vereinheitlichte und evidenzbasierte Kriterien, die eine möglichst eindeutige Definition für das Vorliegen einer PJI liefern sollen (Osmon et al 2013, Parvizi et al 2011b, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010). Diese sind die folgenden drei Hauptkriterien:

- (1) Das Vorliegen einer Gelenkfistel, welche eine Kontaktverbindung von der Haut bis zur Prothese darstellt und im Englischen *sinus tract* genannt wird,
- (2) der Erregernachweis durch Zellkultur aus mindestens zwei separaten Gewebe- oder Synoviaprobe aus dem betroffenen Gelenk,
- (3) das Vorliegen von vier der nachfolgenden sechs Nebenkriterien:
 - Erhöhte Erythrozyten-Sedimentationsrate (ESR) und Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) im Serum,
 - Erhöhte synoviale Leukozytenzahl,
 - Erhöhter synovialer Neutrophilenanteil (PMN%),
 - Vorhandensein von Eiter im betroffenen Gelenk,
 - Erregernachweis in einer einzigen Zellkultur aus periprothetischem Gewebe- oder Synoviaprobe oder
 - mehr als fünf Neutrophile pro Hauptgesichtsfeld (HPF) in insgesamt fünf HPF bei der histologischen Analyse von periprothetischem Gewebe aus dem betroffenen Gelenk

Ist eines dieser drei Hauptkriterien erfüllt, liegt definitionsgemäß eine PJI vor. Es ist allerdings zu beachten, dass sich PJIs mitunter weniger eindeutig zeigen. So kann eine PJI auch dann vorliegen, wenn keines der drei Hauptkriterien vollumfänglich erfüllt ist. Hieran zeigt sich die Schwierigkeit der PJI Diagnosefindung.

Parvizi et al (2018) veröffentlichten 2018 eine Überarbeitung der PJI-Definition unter Berücksichtigung der mit den o.g. Kriterien gemachten Erfahrungen und aktueller Forschungsergebnisse. Sie erweiterten und passten die Nebenkriterien an und entwickelten ein Scoringssystem, um eine noch sicherere Diagnosestellung zu gewährleisten. Laut den Autoren liefert die neue *2018 Definition* eine höhere Sensitivität bei gleicher Spezifität im Vergleich zu den Fachgesellschaftsdefinitionen. Es wird sich zeigen, inwieweit die Fachgesellschaften auf diese Ergebnisse reagieren werden.

Neben der Definition spielt die Klassifikation eine entscheidende Rolle. Hiernach entscheidet sich unter anderem die weitere Therapiestrategie (vgl. Kapitel 1.2.5). PJIs können auf zwei Arten klassifiziert werden: Zum einen anhand des zeitlichen Symptombeginns nach erfolgter Implantation (Trampuz & Zimmerli 2005, Trampuz & Zimmerli 2008, Zimmerli 2004), zum anderen anhand der Ausbreitungsart (Trampuz & Zimmerli 2005, Trampuz & Zimmerli 2008). Beides steht in engem Zusammenhang. Zeitlich unterteilt man PJIs in *Frühinfektionen* (Symptombeginn < 3 Monate nach OP), *verzögerte Infektionen* (Symptombeginn 3-24 Monate nach OP) und *Spätinfektionen* (Symptombeginn > 24 Monate nach OP). Klinisch unterscheiden sich die einzelnen Infektionsformen wie folgt: Bei den *Frühinfektionen* zeigen sich klassische Infektionszeichen. Es besteht ein persistierender lokaler Schmerz im Bereich der implantierten Prothese, es liegt eine Schwellung sowie Rötung vor, oftmals besteht ein großes Hämatom, es kommt zu Wundheilungsstörungen und die Patienten leiden häufig an Fieber (Otto-Lambertz et al 2017, Trampuz & Zimmerli 2005, Zimmerli 2006, Zimmerli 2004). Dahingegen präsentieren sich *verzögerte Infektionen* wesentlich unspezifischer. Hier steht ein chronisch persistierender oder immer stärker werdender Schmerz im Bereich des Implantates sowie eine frühzeitige Implantatlockerung im Vordergrund. Typische Infektionszeichen können teilweise oder ganz fehlen (Otto-Lambertz et al 2017, Trampuz & Zimmerli 2005, Zimmerli 2006). *Spätinfektionen* weisen in 30 % der Fälle einen plötzlichen und unerwarteten Beginn mit einer systemischen Infektion auf. Im Vergleich dazu zeigen 70 % der *Spätinfektionen* ein subklinisches Bild aufgrund einer unbemerkten Bakteriämie (Trampuz & Zimmerli 2005, Zimmerli 2006). Teilt man PJIs anhand der Ausbreitungsart ein, so lassen sich drei Wege voneinander abgrenzen. Trampuz und Zimmerli (2005) fassen diese in Verbindung mit der zeitlichen Komponente wie folgt zusammen: Die infektiöse Ausbreitung der pathogenen Erreger kann entweder (1) *perioperativ*, (2) *hämatogen* oder (3) *angrenzend* verlaufen. Beim *perioperativen* Ausbreitungsweg gelangen pathogene Erreger bereits während oder unmittelbar nach der Operation in die Wunde. Dieser Ausbreitungsweg ist in der Regel mit *Frühinfektionen* vergesellschaftet. Die *hämatogene* Ausbreitung erfolgt namensentsprechend über die Blut- oder Lymphbahn. Hierbei ist ein implantatferner Fokus ursächlich. In der Regel lassen sich *Spätinfektionen* auf diesen Ausbreitungsweg zurückführen. PJIs, welche durch den *angrenzenden* Ausbreitungsweg hervorgerufen werden, haben einen unmittelbar benachbarten Infektionsherd zu Grunde liegen.

Beispielsweise können ein Trauma, eine bereits vorbestehende Osteomyelitis oder Haut- und Gewebeschäden zu dieser Ausbreitungsform führen.

Um aus der Klassifikation für den klinischen Alltag eine bessere therapeutische Relevanz ziehen zu können, gibt es eine weitere, neuere Klassifikationsart. Diese unterscheidet eine *akut hämatogene*, eine *früh postinterventionelle* und eine *chronische* PJI (Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zimmerli 2015). Die *akut hämatogene* Infektion präsentiert sich hierbei mit Symptomen von einer Dauer von drei oder weniger Wochen nach einem initial problemlosen postoperativen Intervall egal welcher Länge. Die *früh postinterventionelle* Infektion zeigt Symptome in einem Zeitraum, der weniger als einen Monat nach der Operation beträgt. Eine *chronische* Infektion liegt dann vor, wenn Symptome länger als drei Wochen bestehen und jenseits der frühen postinterventionellen Phase auftreten (Osmon et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zimmerli 2015). Die Einteilung zielt hierbei auf die Therapiemöglichkeit der erregereigenen Pathogenese in Form der Ausbildung eines Biofilms (siehe 1.2.2) ab. Denn bei *akut hämatogenen* und *früh postinterventionellen* PJI, die je nach Literatur mit einer Latenzzeit von 2-4 Wochen angegeben werden (Esposito et al 2009, Minassian et al 2014, Osmon et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010) ist das Therapieziel die Durchbrechung des noch nicht vollständig ausgebildeten Biofilms unter Erhalt der Prothese. Im Vergleich hierzu kann der Biofilm bei *chronischen* PJI nicht mehr durchbrochen werden und der Verlust des Implantates ist somit die Folge.

1.2.2 Erregerspektrum und Pathogenese

Das Erregerspektrum von PJI ist gut bekannt. Die Literatur bietet einen breiten Überblick über Erregerarten und Häufigkeitsverteilungen. Weisen nahezu alle Studien ein übereinstimmendes Erregerspektrum auf, so zeigt sich bezüglich der Häufigkeitsverteilung mitunter eine größere Spannweite.

Zimmerli und Trampuz (Trampuz & Zimmerli 2005, Zimmerli & Moser 2012, Zimmerli 2004) geben die Häufigkeitsverteilung PJI hervorrufender pathogener Erreger mit Referenz auf Pandey et al (2000), Segawa et al (1999) sowie Steckelberg (2000) in nachfolgender Reihenfolge an: (1) Koagulase-negative Staphylokokken (30-43 %), (2) *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (12-23 %), (3) Streptokokken (9-10 %), (4) Enterkokken (3-7 %), (5) Gram-negative Erreger (3-6 %) und (6) Anaerobier (2-4 %). In

etwa 10-12 % ist die Infektion multibakteriell hervorgerufen und in ca. 10-11 % der Fälle ist der Erreger unbekannt.

Laffer et al (2006) konnten in ihrer retrospektiven Studie aus der Schweiz ein etwas anderes Verteilungsbild feststellen. Sie detektierten als die häufigsten isolierten Erreger mit 33,3 % *S. aureus*, gefolgt von Koagulase-negativen Staphylokokken mit 21,4 %. Das übrige Bild entspricht weitestgehend dem von Zimmerli und Trampuz dargelegten Verteilungsmuster. Zusätzlich wurden bei zwei Patienten Pilze als Ursache der PJI detektiert. Auch die von Pulido et al (2008) veröffentlichte Auswertung einer zwischen Januar 2001 und April 2006 prospektiv gesammelten Datenmenge von 9245 primär implantierten Hüft- und Knie-TEPs in den USA (*Rothman Institute of Orthopaedics*, Thomas Jefferson University Hospital, Philadelphia, USA), von denen 63 Patienten eine PJI entwickelten, zeigte ein *S. aureus* führendes Verteilungsmuster mit 38 %. Auf dem zweiten Platz folgten mit 20 % *Staphylococcus epidermidis* und somit Koagulase-negative Staphylokokken. Lamagni (2014) wertete Daten des britischen *National Health Services* (NHS) aus den Jahren 2006/2007 und 2011/2012 aus. Auch hierbei zeigte sich *S. aureus* als häufigster Erreger, führend vor den Koagulase-negativen Staphylokokken. Demgegenüber analysierte Achermann et al (2014) Daten, welche zwischen Januar 2005 und Juni 2010 in der Schweiz (*Schulthess Klinik Zürich*) erhoben wurden. Es ließen sich bei 69 Patienten mit einer PJI als häufigste Erreger mit 38 % Koagulase-negative Staphylokokken gefolgt von *S. aureus* mit 25 % feststellen. Es zeigt sich hier wiederum ein Verteilungsmuster, wie es Zimmerli und Trampuz beschreiben. Interessant ist eine retrospektive Studie aus dem Jahr 2014 von Aggarwal et al (2014). In dieser wird durch die Autoren die Erregerverteilung von PJIs zwischen zwei Endoprothetik-Referenzzentren in Deutschland (*HELIOS ENDO-Klinik Hamburg*, Germany) und den USA (*American Orthopaedic Surgery Center*, *The Rothman Institute of Orthopaedics*, Philadelphia, Pennsylvania, USA) im Zeitraum von 2000 bis 2011 verglichen. In diesem Zeitraum wurden in Hamburg 898 Fälle von PJIs detektiert, in Philadelphia 772. Es zeigt sich eine signifikant unterschiedliche Erregerverteilung bei den häufigsten pathogenen Erregern. Folgendes Verteilungsmuster wurde durch Aggarwal et al (2014) festgestellt: *HELIOS ENDO-Klinik Hamburg* versus *The Rothman Institute Philadelphia*: Koagulase-negative Staphylokokken (39,3 vs. 20,2 %), *S. aureus* (13,0 vs. 31,0 %), Streptokokken (6,5 vs. 5,8 %), Enterokokken (7,0 vs. 3,9 %), Anaerobier (9,0 vs. 0,9 %), Pilze (0,3 vs. 2,3 %), Mykobakterien (0 vs. 0,6 %), multibakteriell (3,4 vs. 7,4 %), Kultur negativ (16,1 vs. 15,8 %), sowie andere Erreger (0,9 vs. 5,4 %). Die Autoren leiten aus dieser

Verteilungsdifferenz daher die Frage ab, ob es generelle Unterschiede im gesamten Handlungsalgorithmus zwischen einzelnen Kliniken gibt, die diesen Unterschied erklären könnten. Dabei wäre beispielsweise das perioperative Setting und das konkrete chirurgische Vorgehen denkbar. Dies ist bei einer deutlich höheren Virulenz von *S. aureus* gegenüber Koagulase-negativen Staphylokokken eine nicht zu unterschätzende Frage. Denn durch *S. aureus* hervorgerufene PJIs haben ein wesentlich schlechteres Outcome (Tetrycz et al 2010).

Um PJIs zu verstehen und eine suffiziente Therapie durchführen zu können, sind Kenntnisse bezüglich der Pathogenese unerlässlich. Zwei wesentliche, auf zellulärer Ebene ablaufende Mechanismen spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Zum einen interagiert ein in den Körper eingebrachtes Implantat in negativem Maße mit der lokalen, körpereigenen Immunabwehr (Zimmerli 2015, Zimmerli & Sendi 2011) und zum anderen besitzen gewisse Bakterien die Möglichkeit der Ausbildung eines Biofilms, um sich vor äußeren Einflüssen zu schützen (Costerton et al 1999, Donlan 2002, Donlan & Costerton 2002, Gristina & Costerton 1984, Gristina & Costerton 1985, Gristina et al 1987, Gristina et al 1976).

Im Gegensatz zu vitalen Transplantaten, wie sie beispielsweise im Rahmen einer Organtransplantation in den Körper eingebracht werden, werden künstliche Implantate vom menschlichen Körper nicht abgestoßen. Dennoch findet eine Immunreaktion statt, die einerseits die Integrität des Implantates fördern muss, aber andererseits PJIs in hohem Maße begünstigt (Zimmerli & Sendi 2011).

Zimmerli (2015) beschreibt diesen Prozess in seinem Buch *Bone and Joint Infections: From Microbiology to Diagnostics and Treatment* wie folgt: Ein wesentlicher Bestandteil der humoralen Immunabwehr sind Granulozyten. Ihre Aufgabe ist es, Bakterien zu zerstören und Fremdkörper durch Phagozytose zu zersetzen (Verhoef 1991). Ist der zu phagozytierende Fremdkörper zu groß, kommt es unter Interaktion mit der Fremdkörperoberfläche zur sogenannten *frustranen Phagozytose*, die einen Granulozytendefekt hervorruft (Klock & Stossel 1977, Wright & Gallin 1979). Dieser führt dazu, dass die Granulozyten nicht mehr in der Lage sind eine regelhafte Phagozytose durchzuführen, Bakterien suffizient zu zerstören und Sauerstoffradikale zu exprimieren (Zimmerli et al 1984, Zimmerli et al 1982). *In vitro* Experimente lassen vermuten, dass der Defekt auf die Interaktion mit der nicht phagozytierbaren Implantatoberfläche oder alternativ Verschleißpartikeln des Implantates zurückzuführen ist. Vermutlich

degranulieren die Granulozyten dabei teilweise und verlieren dadurch ihre volle Funktionalität (Bernard et al 2005, Zimmerli et al 1984). Kaplan et al (1999) konnten zeigen, dass sich durch Fremdmaterial aktivierte neutrophile Granulozyten vermutlich zusätzlich selbst schädigen. Die von der ersten Granulozyten-Generation freigesetzten Defensine (Human-Neutrophile-Peptide – HNP) beeinträchtigen die nachfolgenden und neu hinzukommenden Neutrophilenpopulationen, indem sie die Freisetzung von Sauerstoffradikalen behindern und zu einer verringerten Phagozytoseleistung führen. Letztendlich führen diese Mechanismen dazu, dass Erreger, welche sich auf der Implantatoberfläche ansiedeln, durch eine eingeschränkt wirksame Immunabwehr nicht mehr suffizient bekämpft werden können.

Der andere bedeutende Mechanismus im Rahmen der Pathogenese von PJI ist die Fähigkeit von Bakterien einen Biofilm auszubilden. Zunächst ist hierbei zu erwähnen, dass sich um jedes in einen Körper eingebrachtes Fremdmaterial kurz nach Implantation eine Konditionierungsschicht aus wirtsspezifischen Adhäsionen wie Fibrinogen, Fibronectin, Laminin und Kollagen auf dessen Oberfläche bildet. Diese Schicht bietet frei flotierenden, planktonischen Bakterien die Möglichkeit der Adhärenz und damit der dauerhaften Ansiedelung (Darouiche 2004, Herrmann et al 1988, Lopes et al 1985, Vaudaux et al 1993). Ist diese Ansiedlung erfolgt, bildet sich ein Biofilm aus. Dieser wird von Donlan (2002) als Ansammlung mikrobieller Zellen definiert, die in einer Matrix aus hauptsächlich Polysacchariden eingeschlossen und irreversibel mit einer Oberfläche verbunden sind. Biofilme können sich auf einer Vielzahl von Oberflächen ausbilden und passen sich dabei spezifisch an die einzelnen Oberflächengegebenheiten an (Donlan 2002). Es hat sich gezeigt, dass sich einige Materialien besser eignen als andere. Die meisten Studien haben festgestellt, dass Erreger schneller an hydrophoben, unpolaren Oberflächen wie Teflon und andere Kunststoffe binden als an hydrophilen Materialien wie Glas oder Metallen (Bendinger et al 1993, Fletcher & Loeb 1979, Pringle & Fletcher 1983). Das Ausmaß der Besiedelung steigt mit zunehmender Oberflächenrauigkeit an. Auf Medizinprodukten bestehen Biofilme laut Donlan (2002) zumeist aus einem einzigen, kokkoiden Organismus und der sie umschließenden extrazellulären Polymermatrix aus Polysacchariden. Jede bakterielle Biofilmformation ist dabei einzigartig (Tolker-Nielsen & Molin 2000), weist aber gewisse Grundstrukturen auf. Stoodley et al (1997) haben diverse Kriterien definiert, die jeder Biofilmformation zugrunde liegen. Hierbei handelt es sich um einen dünnen Basisfilm, der von einer lückenhaften Monoschicht aus Zellen bis hin zu mehrschichtigen Ebenen reichen kann.

Den Großteil der Biofilmasse nimmt die extrazelluläre Polysaccharidpolymermatrix ein (Donlan 2002). Je nach zugrundeliegendem Erreger kann sich die spezifische Zusammensetzung der Matrix unterscheiden und andere Eigenschaften, wie beispielsweise eine stärkere Bindungskraft aufweisen (Flemming 2000, Hussain et al 1993, Sutherland 2001). Die extrazelluläre Polysaccharidpolymermatrix ist unter anderem auch für die Resistenz gegenüber Antibiotika verantwortlich. Durch direkte Bindung von antimikrobiell wirkenden Stoffen wird der Transport durch den Biofilm gehindert und somit die eingekapselten Erreger geschont (Donlan 2000). Insgesamt weisen Erreger, welche in Biofilmen vorliegen, eine weitaus höhere Resistenz gegenüber antimikrobiellen Stoffen auf als planktonische Bakterien (Ceri et al 1999). Neben dem schützenden Effekt der extrazellulären Polysaccharidpolymermatrix werden in der Literatur weitere Gründe diskutiert. Unter anderem wird vermutet, dass Erreger in Biofilmformationen eine verlangsamte Wachstumsrate aufweisen und in eine stationäre Wachstumsphase übergehen. Dieses könnte an einer nicht ausreichenden Versorgung mittels Stoffwechselsubstraten wie Glukose oder Sauerstoff liegen (Anderl et al 2003). Hier zeigt sich ein wesentlicher Resistenzmechanismus gegenüber einigen Antibiotikaklassen, da diese die Bakterien angreifen indem sie deren Wachstum hemmen. Des Weiteren liegen in einem Biofilm aufgrund der hohen Zelldichte weitaus bessere Voraussetzungen zum Austausch von Plasmiden zwischen den Zellen vor (Hausner & Wuertz 1999, Roberts et al 1999). Dadurch, dass Plasmide für Antibiotikaresistenzen codieren können, wird somit eine mögliche Übertragung von Resistenzen begünstigt (Donlan 2002). Ein weiterer resistenzfördernder Mechanismus ist das sogenannte *Quorum Sensing*. Über den Zell-zu-Zell Signalweg wird die Aktivierung von biofilmfördernden Genen in den einzelnen Zellen aktiviert und dadurch die Biofilmbildung vorangetrieben (Vuong et al 2003). Dieses führt wiederum zu einer höheren Resistenz.

Die Kombination aus Schwächung des Immunsystems und die bakterielle Fähigkeit der Ausbildung eines Biofilms können daher als Ursache dafür angesehen werden, dass bereits sehr geringe Inokulationsdosen (im Falle von *S. aureus* ist diese um den Faktor 100.000 niedriger als bei anderen Erregern (Zimmerli et al 1982)) ausreichen um PJI hervorgerufen und selbst gering virulente Erreger wie Koagulase-negative Staphylokokken für einen Großteil von PJI verantwortlich sind.

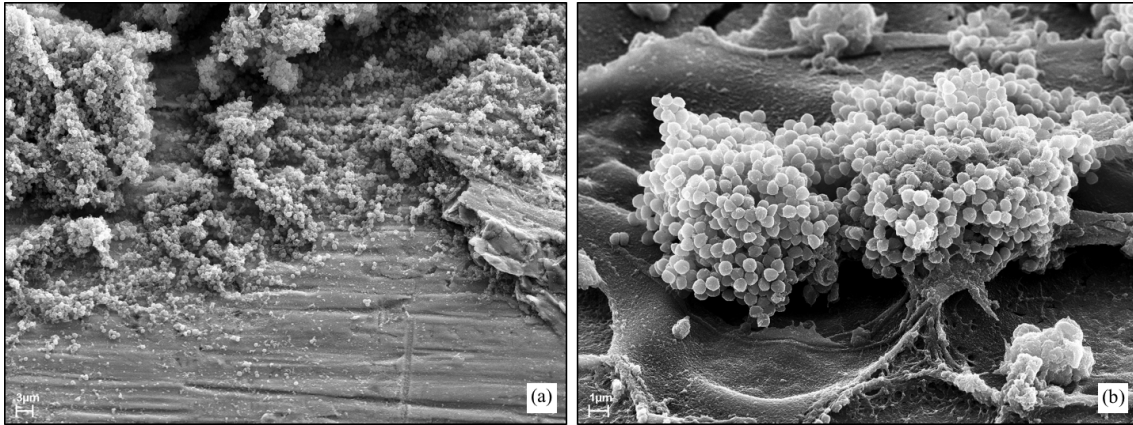


Abbildung 1 Biofilmformation auf einer metallischen Oberfläche. Es zeigt sich eine große Bakterienformation (a), bis mit zunehmender Vergrößerung einzelne kokkoide Bakterien (b) voneinander abgegrenzt werden können (Labor für experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Gießen).

1.2.3 Inzidenz und Risikofaktoren

Kapadia et al (2016) geben die Inzidenz für PJIs für Hüft-TEPs mit bis zu 1 % und für Knie-TEPs zwischen 1-2 % an. Die Datenlage in der Literatur diesbezüglich ist divergent. Im Bereich der Knie-TEP PJIs lassen sich weitestgehend übereinstimmende Zahlen finden. Hüft-TEP PJIs werden in einigen Studien mit einer höheren Inzidenz angegeben, worauf Kapadia et al (2016) bereits hinweisen. Pulido et al (2008) werteten Daten des Registers des *Rothman Institute of Orthopaedics* (Thomas Jefferson University Hospital, Philadelphia, PA, USA) im Zeitraum von Januar 2001 bis April 2016 aus. 9245 Patienten erhielten dort eine primäre Hüft- oder Knie-TEP. Es zeigte sich eine Gesamt-Inzidenz für ein PJI von 0,7 %. Diese verteilte sich mit 0,3 % auf Hüft-TEPs und mit 1,1 % auf Knie-TEPs. Der Großteil der PJIs, nämlich 65 %, traten im ersten Jahr nach Implantation auf. Ong et al (2009) und Kurtz et al (2010) werteten Daten des *Medicare 5 % national sample data set* (USA) für den Zeitraum Januar 1997 bis Dezember 2006 in Bezug auf die Inzidenz von PJIs mit frühem (< 2 Jahre nach Implantation) und verzögertem Beginn (2-10 Jahre nach Implantation) aus. Es zeigte sich bei 39.929 durchgeführten Hüft-TEPs 887 PJIs (Ong et al 2009). Dies ist über den gesamten Beobachtungszeitraum eine Inzidenz von 2,2 %. PJIs mit frühem Beginn (73,2 %) traten mit einer Inzidenz von 1,63 %, verzögerte Infektionen mit einer Inzidenz von 0,59 % auf. Kurtz et al (2010) ermittelten im Bereich der Knie-TEPs eine Inzidenz für PJIs mit frühem Beginn von 1,55 % und mit verzögertem Beginn von 0,46 %.

Wie unter 1.1.2 beschrieben, wurde in den vergangenen Jahren ein stetiger Anstieg von Hüft- und Knie-TEP Implantationen verzeichnet. Dementsprechend sind auch die Infektionszahlen angestiegen. Kurtz et al (2008) beschreiben nach Auswertung von Daten aus der *Nationwide Inpatient Sample (NIS) Database* der USA zwischen 1990 und 2004, dass sich in diesem Zeitintervall die Inzidenz einer PJI bezogen auf beide Prothesenarten ca. verdoppelt hat. Der Zusammenhang zwischen Infektionslast und Jahr ist hochsignifikant ($p < 0,0001$), wobei die Wahrscheinlichkeit einer Infektion jährlich mit einer Rate von fast 5 % zunahm. Insgesamt lag die Inzidenz einer PJI über den gesamten Zeitraum von 15 Jahren für die Hüft-TEPs im Mittel bei 0,88 % und für Knie-TEPs bei 0,92 %.

Betrachtet man die Revisionszahlen in Hinsicht auf die Inzidenz für eine Revision aufgrund einer PJI, so liefern Bozic et al (2010, 2009), Dale et al (2009) und Koh et al (2014) diverse Daten. Bozic et al (2010, 2009) haben jeweils für Hüft- und Knie-TEPs im Zeitraum Oktober 2005 bis Dezember 2006 die Revisionsdaten anhand der NIS-Database ausgewertet. Hier zeigte sich die Inzidenz für Hüft-TEP-Revisionen aufgrund einer PJI bei 14,8 % und für Knie-TEP-Revisionen bei 25,2 %. Bei deutlich abweichenden Werten stehen Hüft-TEP-Revisionen aufgrund einer PJI im Vergleich zum Knie erst an dritter Stelle. Die häufigste Ursache ist mit 22,5 % die Instabilität/Dislokation, gefolgt von der aseptischen Lockerung mit 16,1 %. Knie-TEP-Revisionen werden am häufigsten aufgrund von PJIs durchgeführt, gefolgt von der aseptischen Lockerung mit 16,1 %. Koh et al (2017) bestätigen diese Daten. Sie untersuchten anhand des *New Zealand Joint Registry* und individuellen Patientenakten die Daten von 11.134 primär durchgeführten Knie-TEPs im Zeitraum von 2000 bis 2015 in Neuseeland. Auch hier zeigte sich die PJI als häufigste Revisionsursache, gefolgt von der aseptischen Lockerung. Auch sie bestätigen die Inzidenz für eine PJI im Bereich einer Knie-TEP mit bis zu 2 %.

Dale et al (2009) haben sich in einer Studie mit der Revisions-Risikoentwicklung aufgrund von PJIs beschäftigt. Hierzu haben sie das *Norwegian Arthroplasty Register (NAR)* für den Zeitraum 1987 bis 2007 mit 97.344 durchgeführten Hüft-TEPs ausgewertet. 79.820 Personen wurden letztendlich in die Studie eingeschlossen, 614 Erstrevisionen wurden aufgrund einer PJI durchgeführt. Dale et al (2009) konnten feststellen, dass das Risiko eine Erstrevision aufgrund einer PJI stetig anstieg. Sie haben dafür den Zeitraum 1987 bis 1992 als Ausgangsperiode genommen. Im Vergleich dazu ist das Risiko einer Primärrevision aufgrund einer PJI für den Zeitraum 1993 bis 1997

1,3-mal höher, für den Zeitraum 1998 bis 2002 1,5-mal höher und für den Zeitraum 2003 bis 2007 3,0-mal höher gewesen.

Neben einem deutlichen Anstieg der Implantationszahlen zeigt sich in den letzten Jahren also auch ein Anstieg der Inzidenz für PJIs und der durchgeführten Revisionen aufgrund einer PJI.

Zur Prävention von PJIs ist es entscheidend, mögliche Risikofaktoren zu kennen und diese in die Operationsplanung miteinzubeziehen. Kunutsor et al (2016) werteten 66 Kohortenstudien (23 prospektive und 43 retrospektive), die sich mit den Risikofaktoren von PJIs beschäftigten, aus und fassten die Ergebnisse in einem Review-Artikel zusammen. Insgesamt wurden dabei Daten von 512.508 Patienten mit 8.026 PJIs betrachtet. Es zeigte sich jeweils vergleichend für Männer vs. Frauen und Raucher vs. Nichtraucher ein relatives Risiko (RR) von 1,36 (1,18–1,57) und 1,83 (1,24–2,70) (95 % Confidence Intervall – CI). Vergleiche des Body Mass Indexes mit BMI ≥ 30 vs. < 30 kg/m²; ≥ 35 vs. < 35 kg/m²; und ≥ 40 vs. < 40 kg/m² wiesen eine RR von jeweils 1,60 (1,29-1,99); 1,53 (1,22-1,92); bzw. 3,68 (2,25-6,01) auf. Fanden sich Diabetes, rheumatoide Arthritis, Depressionen, Steroid-Einnahme und frühere Gelenkoperationen in der Anamnese, so ist das Risiko für eine PJI ebenfalls erhöht. Einen Hinweis auf eine signifikante Assoziation von PJIs mit dem Alter ließ sich demgegenüber nicht feststellen. Ong et al (2009) und Dale et al (2009) konnten als weiteren Risikofaktor eine verlängerte Operationszeit detektieren. So fanden Ong et al (2009) heraus, dass das Infektionsrisiko bei Hüft-TEPs um 78 % ansteigt, sofern die Op-Zeit mehr als 210 min betrug, im Vergleich zu denjenigen Operationen mit einer Op-Zeit von weniger als 120 min. Dale et al (2009) stellten bereits ab einer Op-Zeit von mehr als 100 min ein erhöhtes Risiko für eine Revision aufgrund einer PJI fest. Darüber hinaus konnten sie außerdem ermitteln, dass sich das Risiko einer PJI signifikant erhöht, sofern Patienten perioperativ keine Antibiotikaphylaxe erhalten (RR von 1,6).

Demnach zeigt sich, dass bei der Operationsplanung Risikofaktoren korrekt erkannt und eingeschätzt werden müssen, um bereits präoperativ adäquat reagieren zu können.

1.2.4 Protheseninfektionen durch MRSA

Die durch Antibiotika-resistente Bakterien ausgehende Gefahr nimmt global stetig zu. In einem durch den *Wellcome Trust* und das britische *Department of Health* in Auftrag gegebenen und 2016 veröffentlichten Review (O'Neill 2016) wird die jährliche Todeszahl

aufgrund von resistenten Infektionen auf ca. 700.000 beziffert. Diese Zahl wird bis zum Jahr 2050 schätzungsweise auf zehn Millionen Tote pro Jahr ansteigen und gefährdet damit eine Wirtschaftsleistung von rund 100 Milliarden US-Dollar (O'Neill 2016). Zahlen für die USA beziffern aktuell ca. 19.000 jährliche Todesopfer und 360.000 Hospitalisierungen aufgrund von MRSA Infektionen, die insgesamt Kosten von ca. 3 - 4 Milliarden US-Dollar verursachen (Martens & Demain 2017). Für Europa belaufen sich die aktuellen MRSA-Infektion bedingten Todeszahlen auf ca. 25.000 Personen (Martens & Demain 2017). Die Autoren des O'Neill-Berichts sehen durch die massiv zunehmende Anzahl an Antibiotika resistenten Infektionen gut etablierte und als Standardbehandlung anzusehende medizinische Verfahren immer stärker gefährdet. Auch der künstliche Gelenkersatz wird hierbei erwähnt, bei dem im Falle einer MRSA-bedingten Infektion eine schnelle und suffiziente Therapie unverzichtbar ist.

1960 wurde der erste Methicillin-resistente *S. aureus* Stamm in Europa isoliert (Oliveira et al 2002). Seitdem konnten fünf hauptverantwortliche MRSA-Klone identifiziert werden, die fast 70 % der über 3000 MRSA-Isolate ausmachen. Diese wurden überwiegend in Krankenhäusern in Süd- und Osteuropa, Südamerika und den USA gewonnen (Oliveira et al 2002, Stefani & Varaldo 2003). Insgesamt zeigt sich für den europäischen Raum ein nord-süd Gradient mit einer zunehmenden Häufigkeitsverteilung von Norden (Skandinavien < 2 %) nach Süden (mediterrane Länder > 40 %) (Stefani & Varaldo 2003). Es sind die speziellen molekulargenetischen Eigenschaften der MRSA-Stämme, die eine suffiziente Behandlung erschweren. Der zugrundeliegende Resistenzmechanismus aller MRSA-Stämme wird durch das sogenannte *mecA* Gen bedingt, welches ursprünglich nicht in der *S. aureus* DNA vorkam und sich über die Zeit evolutionär entwickelt hat (Oliveira et al 2002). Dieses *mecA* Gen kodiert ein modifiziertes Penicillin-Bindeprotein (PBP2A), eine Transpeptidase, welche für die regelrechte Verknüpfung bestimmter Bausteine bei der Bakterienzellwandsynthese verantwortlich ist. Betalactam-Antibiotika sind nicht mehr bzw. nur noch eingeschränkt in der Lage, an dieses modifizierte Penicillin-Bindeprotein zu binden und die Zellwandsynthese und somit das gesamte Bakterienwachstum zu behindern (Oliveira et al 2002). Die Wirksamkeit dieser Antibiotikaklasse ist somit maßgeblich gehemmt.

Schaut man sich die in der Literatur vorhandene Datenlage für durch hochresistente Erreger hervorgerufene PJIs im Detail an, so lässt sich feststellen, dass im Verlauf der letzten Jahre eine Zunahme zu verzeichnen ist (Rosteius et al 2018, Zajonz et al 2016). Dies gilt allerdings besonders für Erreger wie Methicillin-resistente *Staphylococcus*

epidemicus (MRSE), extended-spectrum Beta-lactamasen (ESBL), Ampicillin-resistente *Enterococci* und Vancomycin-resistente *Enterococci* (VRE). So verweisen Rosteius et al (2018) und Zajonz et al (2016) in ihren Arbeiten auf eine tendenzielle Abnahme für MRSA-bedingte PJIs. Wang et al (2018) konnten nicht nur bei den MRSA-bedingten PJIs, sondern insgesamt einen Rückgang von PJIs in ihrer Studie feststellen (Wang et al 2018), was auf einen gegenläufigen Trend hindeuten würde.

Die Datenlage bezüglich der Inzidenz für durch MRSA hervorgerufene PJIs ist durchaus divergent und wird von Kapadia et al (2016) mit einer Spannweite von 12-23 % für alle PJIs in den USA angegeben. Lamagni (2014) berichtet für England in den Jahren 2010/2011 über einen MRSA Anteil von 20 %. Daten anderer Länder zeigen hiervon durchaus Abweichungen, die im Folgenden beleuchtet werden.

Das Kollektiv mit dem geringsten Anteil stellt Ravi et al (2016) mit einem Anteil von 2,8 %. Sie werteten Daten im Zeitraum von Januar 2006 bis Dezember 2008 aus drei tertiärversorgenden Krankenhäusern in Neuseeland aus. In den 35 detektierten PJIs war lediglich eine durch MRSA bedingt. Zeller et al (2018) evaluierten Daten im Zeitraum von Januar 2004 bis Dezember 2015 eines französischen Referenzzentrums für Knochen- und Gelenkinfektionen. Die Kohorte umfasste insgesamt 997 Patienten mit einer oder mehreren PJIs, von denen in 3,6 % der Fälle MRSA als pathogener Erreger nachgewiesen werden konnte. Triffault-Fillit et al (2019) konnten einen etwas höheren Anteil an MRSA-bedingten PJIs nachweisen. Von 511 dokumentierten Infektionen, welche in einem Zeitraum von 2011 bis 2016 in ihrer in Frankreich erhobenen Kohorte nachgewiesen wurden, wurden 26 (5,1 %) durch MRSA hervorgerufen. Wang et al (2018) und Tsai et al (2019) zeigen in ihren Arbeiten eine deutlich höhere Rate an MRSA-bedingten PJIs. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die beiden Kollektive aus Taiwan stammen und somit andere, ortsbedingte Grundvoraussetzungen vorlagen. Das Kollektiv von Wang et al (2018) umfasst 178 PJIs in einem Zeitraum von 2002 bis 2014. 16 (9 %) dieser Infektionen waren durch MRSA bedingt. Mit 10,5 % hat Tsai et al (2019) den größten Anteil an MRSA-bedingten PJIs vorzuweisen. In einem Zeitraum von 2006 - 2014 wurden 31 von insgesamt 294 nachgewiesenen PJIs durch MRSA verursacht.

Das besondere Problem der durch MRSA hervorgerufenen PJIs ist das deutlich höhere Maß an Behandlungsversagen (sofern eine Revisionsoperation stattgefunden hat, wird dies im angloamerikanischen Sprachraum als *failed revision* bezeichnet) trotz gezielter Therapiestrategien (siehe Kapitel 1.2.5). Die Kombination aus den in Kapitel 1.2.2 beschriebenen pathogenen Eigenschaften und der Betalactam-Antibiotikaresistenz

machen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* zu einem besonderen Gegenspieler im Kampf gegen Protheseninfektionen.

So konnten Soriano et al (2006) nachweisen, dass der einzige unabhängige Risikofaktor für das Therapieversagen bei PJIs eine Infektion mit MRSA ist ($p = 0,003$).

Kilgus et al (2002) werteten den Therapieerfolg 70 MRSA-bedingter Knie- bzw. Hüft-PJIs im Zeitraum von Mai 1997 bis März 2001 aus. Dabei galt die Behandlung als erfolgreich, wenn die Prothese entweder durch Spül- und Entlastungsverfahren allein oder nach Entfernung der infizierten Prothese und anschließender erfolgreicher Reimplantation erhalten werden konnte. Als Therapieversagen wurde die Notwendigkeit einer Arthrodesen, die Amputation der betroffenen Gliedmaße oder eine dauerhafte Exzisionsarthroplastik definiert. Es zeigte sich, dass im Bereich der Hüft-PJIs, hervorgerufen durch MRSA, lediglich ein Therapieerfolg bei 48 % zu verzeichnen war. Demgegenüber konnten PJIs von nicht resistenten Erregern in 89 % der Fälle erfolgreich saniert werden. Die Zahlen für Knie-PJIs sind deutlich signifikanter mit 89 % vs. 18 % (MRSA).

Auch Salgado et al (2007) untersuchten gezielt den Unterschied in Bezug auf Behandlungsversagen zwischen PJIs hervorgerufen durch MSSA im Vergleich zu MRSA. Sie werteten Daten zwischen Januar 1995 und Dezember 2004 von insgesamt 137 PJIs aus. 33 % dieser 137 PJIs wurden durch *S. aureus* hervorgerufen. Diese 33 % unterteilen sich in 24 % MSSA- und 9 % MRSA-bedingte PJIs. Letztendlich zeigte die Datenauswertung, dass eine PJI durch MRSA zu einem höheren Risiko eines Therapieversagens (Hazard Ratio, 9,2; 95 % Konfidenzintervall, 2,40 - 35,46) als bei MSSA führte.

Ebenso konnten Parvizi et al (2009) nachweisen, dass die Rate an Therapieversagen bei MRSA-bedingten PJIs höher ist. Sie untersuchten die Therapieresultate von insgesamt 127 Patienten in einem Zeitraum zwischen 1999 und 2006 im *Rothman Institute of Orthopaedics* (Thomas Jefferson University Hospital, Philadelphia, PA, USA). Es zeigte sich, dass ein chirurgisch durchgeführtes Debridement die Infektion lediglich in 37 % der Fälle kontrollieren bzw. sanieren konnte. Erst ein zwei-zeitiges Therapieregime mit einer Resektionsarthroplastik führte zu einer Sanierung bei 75 % der Hüft-TEP PJIs und bei 60 % der Knie-TEP PJIs. Kurd et al (2010) fassten einen Großteil der durch Parvizi et al (2009) bereits veröffentlichten Daten unter einer etwas anderer Fragestellung erneut zusammen. Sie konnten für das dann 102 Patienten umfassende Kollektiv die Aussage

treffen, dass bei einem *Two-Stage-Revision* Therapieversagen bei Knie-PJIs die Grundinfektion 3,37-mal häufiger durch MRSA hervorgerufen wurde.

Eine ebenfalls eingeschränkte Therapieerfolgsrate konnten auch Siddiqui et al (2013) in Bezug auf die Behandlung von MRSA-bedingten PJIs aufweisen. Sie ermittelten Daten, die vergleichbar mit Parvizi et al (2009) sind. So zeigte sich in ihrem Behandlungskollektiv von 12 Patienten, dass eine Revisions-Operation mit Debridement lediglich eine Erfolgsrate von 33 % aufweisen konnte. Erst das Vorgehen nach Two-Stage-Revision-Procedure brachte einen Behandlungserfolg von 88 %.

Neben der häufigeren Therapieversagensrate ist ebenfalls eine höhere Reinfektionsrate von bis zu 21 % bei Hüft- und 50 % bei Knie-PJIs durch MRSA in der Literatur beschrieben (Azzam et al 2009).

1.2.5 Diagnostik und Behandlungsstrategien

Um PJIs gezielt und erfolgsversprechend behandeln zu können, ist es zunächst unabdinglich, eine sichere Diagnose zu stellen. Je nach Klassifikation muss eine manifeste PJI beispielsweise von einer aseptischen Implantatkomplikation unterschieden werden (Otto-Lambertz et al 2017). Dabei ist eine zügige Diagnosestellung von erheblicher Bedeutung, da eine Verzögerung den kompletten Verlust des Implantates mit zum Teil weitreichenden Folgen für den Patienten bedeuten kann

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 erwähnt, haben diverse Fachgesellschaften (AAOS, MSIS, IDSA, SPILF) Handlungsrichtlinien verfasst, um im klinischen Alltag ein zuverlässiges und schnelles Diagnoseverfahren zu ermöglichen. Darüber hinaus finden sich in der Literatur eine Vielzahl an Arbeiten unterschiedlicher Autoren, die sich diesem Thema widmen.

Die Grundpfeiler aller aktuell empfohlenen Diagnoseschritte sind: (1) Erhebung der aktuellen *Klinik* und *Anamnese* seit Implantatimplantation, (2) Durchführung einer gezielten *Labordiagnostik* und *Bildgebung*, sowie (3) *Materialgewinnung* durch Gelenkpunktionen oder operatives Vorgehen zur mikrobiologischen und histopathologischen Aufarbeitung (Otto-Lambertz et al 2017).

PJIs präsentieren sich je nach Klassifikation (*Frühinfektion*, *verzögerte Infektion*, *Spätinfektion*, vgl. dazu Kapitel 1.2.1) divergent. Zeigt sich anamnestisch und klinisch der gerechtfertigte Verdacht auf eine PJI sollte zunächst eine gezielte Labordiagnostik erfolgen. Dabei liegt der Fokus auf den zwei infektspezifischen Laborparametern C-

reaktives Protein (CRP) und *Blutsenkungsgeschwindigkeit* (BSG) (Osmon et al 2013, Parvizi & Della Valle 2010, Parvizi et al 2011b, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zmistowski et al 2014). Als Grenzwert für eine *akute* Frühinfektion gilt ein CRP-Werte von mehr als 100 mg/l im Blutserum. Für die BSG konnte für *akute* Infektionen derzeit noch kein Grenzwert ermittelt werden. Für *chronische* PJI (*verzögerte Infektionen* und *Spätinfektionen*) ändern sich die Grenzwerte auf mehr als 10 mg/l für das CRP und eine BSG von mehr als 30 mm/h (Zmistowski et al 2014). Da diese Laborparameter zwar eine hohe Sensitivität, aber nur geringe Spezifität aufweisen, ist das Vorliegen einer PJI bei ausbleibender CRP- und BSG-Erhöhung zwar unwahrscheinlich, kann letztendlich aber nicht ausgeschlossen werden (Shahi et al 2017).

Shahi et al (2017) verweisen auf noch einen weiteren für die Diagnosefindung nützlichen Laborparameter. Sie konnten nachweisen, dass der *Leukozyte Esterase* (LE) Test im Urin bei Patienten mit nachgewiesener PJI im Vergleich zu CRP und BSG die beste *diagnostische odds ration* (DOR) bietet. Auch andere Autoren haben die LE als Diagnoseparameter beschrieben und deren Nutzen erläutert (Tarabichi et al 2017, Wyatt et al 2016). Parvizi et al (2018) haben die LE bereits in ihre 2018 veröffentlichten neuen Definitionskriterien für Knie- und Hüftinfektionen aufgenommen.

Liegt neben lokalen Infektionszeichen zusätzlich Fieber und somit der Verdacht auf eine Bakteriämie vor, sollten außerdem Blutkulturen gewonnen werden (Osmon et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010).

Als führendes bildgebendes Verfahren wird die Anfertigung von konventionellen Röntgenaufnahmen des betroffenen Gelenks in zwei Ebenen empfohlen (Osmon et al 2013, Parvizi & Della Valle 2010, Parvizi et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zmistowski et al 2014). Dabei liegt das Augenmerk auf den typischen radiologischen Infektzeichen mit *periprothetischen lytischen Läsionen*, *periostealer Auftreibung* bzw. *Knochenneubildung* sowie *Lockerungsräumen* zwischen Implantat und Knochen (Tigges et al 1994). Weiterführende radiologische Diagnostik wie die Computer- oder Magnetresonanztomographie (CT, MRT) wird nur in speziellen Fragestellungen und unter Beachtung der Kontraindikationen als notwendig erachtet. Dieses gilt ebenfalls für die ^{99m}Tc-Skelettszintigraphie und die Positronen-Emissionstomographie (PET) (Osmon et al 2013, Parvizi & Della Valle 2010, Parvizi et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zmistowski et al 2014).

Letztendlich gilt als diagnostischer Goldstandard zum sicheren Nachweis einer PJI die Gewinnung von Probematerial zur mikrobiologischen und histopathologischen

Aufarbeitung, um einen direkten Erregernachweis zu erhalten. Es stehen zum einen die Gelenkpunktion und zum anderen die Gewebeentnahme bei Diagnostik- oder Revisionseingriffen zur Verfügung (Osmon et al 2013, Parvizi & Della Valle 2010, Parvizi et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zmistowski et al 2014). Für diese Verfahren werden in der Literatur Werte von über 90 % für Sensitivität und Spezifität angegeben (Bauer et al 2006). Dabei ist zu beachten, dass eine Gelenkpunktion ohne die vorherige Infiltration von Lokalanästhetikum erfolgen sollte, um eine Ergebnisverfälschung durch den bakteriziden Effekt von diesem zu verhindern (Otto-Lambertz et al 2017).

Neben einem direkten Erregernachweis kann eine Gelenkpunktion zunächst auch eine Aussage bzgl. der Zellzahl und Zelldifferenzierung sowie Kristallopathie in der Synovialflüssigkeit liefern und somit über eine laborchemische Analyse weitere Hinweise auf eine womöglich vorliegende PJI aufzeigen (Osmon et al 2013, Parvizi & Della Valle 2010, Parvizi et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010). Als Grenzwerte für das Vorliegen einer *akuten* Frühinfektion gelten laut derzeitiger Empfehlungen eine Zellzahl von mehr als 10.000 Leukozyten/ μ l mit einem Differenzierungsgrad von mehr als 90 % polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten. Für *chronische* PJIs (*verzögerte Infektionen* und *Spätinfektionen*) belaufen sich die Grenzwerte auf mehr als 3000 Leukozyten/ μ l und einen Differenzierungsgrad von 80 % polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (Zmistowski et al 2014). Bei Diskrepanz zwischen Punktionsergebnis und sich bietender Klinik bzw. den Ergebnissen der Labordiagnostik sollte eine erneute Punktion durchgeführt bzw. eine operative Gewebegewinnung geplant werden (Parvizi & Della Valle 2010).

Wesentlich entscheidender ist aber der Erregernachweis. Hierfür sollte unter streng aseptischen Voraussetzungen ausreichend Material abpunktiert, bzw. bei einem operativen Eingriff zwischen drei und sechs Gewebeproben gewonnen werden. Das alleinige Vorliegen zweier positiver Proben mit ein und demselben pathogenen Erreger bestätigt definitionsgemäß eine PJI, wohingegen bereits eine Probe mit einem hochvirulenten Erreger wie *S. aureus* als Infektionsnachweis gewertet werden kann (Osmon et al 2013, Parvizi & Della Valle 2010, Parvizi et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zmistowski et al 2014). Zu beachten ist, dass zum Zeitpunkt der Punktion bzw. der Gewebeentnahme noch keine antibiotische Behandlung begonnen wurde oder diese mindestens zwei Wochen vorher pausiert wurde, um das Probenergebnis nicht zu verfälschen (Osmon et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse

de Langue et al 2010, Zimmerli 2004).

Ungeachtet der eben dargelegten Diagnostik gilt wie in Kapitel 1.2.1 bereits erwähnt als direkter Beweis für eine PJI das Vorliegen einer Gelenkfistel (Osmon et al 2013, Parvizi et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Workgroup Convened by the Musculoskeletal Infection 2011, Zmistowski et al 2014). Eine solche Gelenkfistel ist dabei in der Regel ein Zeichen einer chronischen Infektion im Sinne einer *verzögerten* oder *Spätinfektion* (Achermann et al 2014).

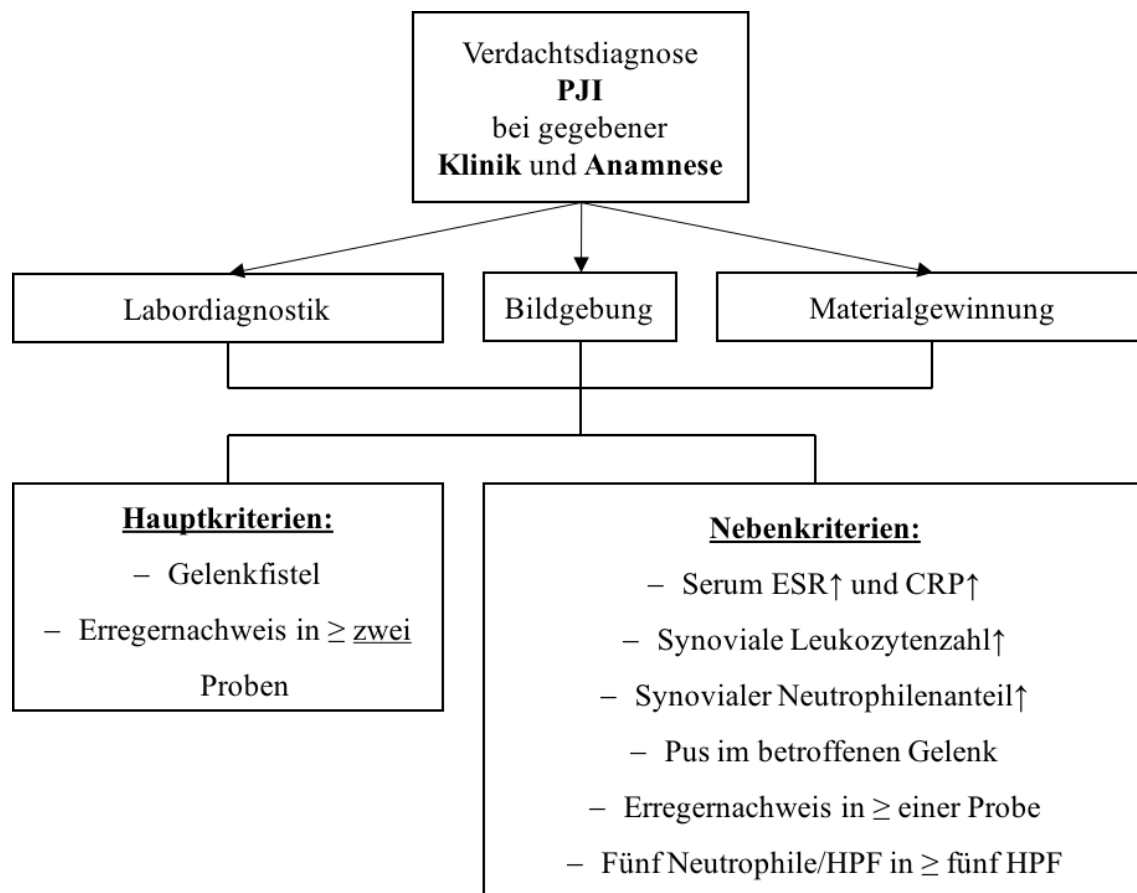


Abbildung 2 Vereinfachter Diagnosealgorithmus für PJIs. Eine PJI liegt definitionsgemäß dann vor, wenn eines der Hauptkriterien, oder vier der Nebenkriterien erfüllt sind (in Anlehnung an die Fachgesellschaftsempfehlungen (Osmon et al 2013, Parvizi et al 2011b, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010)).

Konnte die durchgeführte Diagnostik einen sicheren PJI Nachweis erbringen, muss sich zügig ein strategisch durchdachtes Therapiekonzept im Sinne der nachfolgenden Handlungsalgorithmen anschließen. Dabei kommt je nach nachgewiesener PJI-Klassifikation entweder ein Prothesenerhalt (*Frühinfektionen*) oder ein Prothesenausbau mit Wechsel (*Frühinfektionen, verzögerte Infektionen, Spätinfektion*) in Frage (Osmon et

al 2013, Parvizi et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zimmerli 2004). Neben der PJI-Klassifikation ist das zweite entscheidende Kriterium eine mögliche Implantatlockerung, die immer einen Prothesenausbau zur Folge haben sollte.

Liegt eine *Frühinfektion* (Symptombeginn < 3 Monate nach OP, sowie bestehende Symptome < 3 Wochen) ohne Implantatlockerung, mit gut behandelbarem Erregerspektrum und intaktem Weichteilgewebe ohne Fistelgang vor, kann ein prothesenerhaltender Therapieansatz mit ausgiebigem chirurgischen Débridement und zusätzlicher Antibiotikatherapie angestrebt werden. Bei diesem Verfahren sollte im Rahmen des Debridements ein Austausch nicht verankerter, modularer Prothesenteile (bsp. Hüftkopf oder Inlay) erfolgen, um ein optimales Eradikationsergebnis zu erzielen (Otto-Lambertz et al 2017, Sendi et al 2017, Triantafyllopoulos et al 2016). Die neben dem chirurgischen Vorgehen durchzuführende Antibiotikatherapie muss antibiogramgerecht mit einem möglichst knochengängigen Antibiotikum erfolgen. Sofern ein Nachweis von Staphylokokken oder einem anderen biofilmbildenden Erreger vorliegt, wird eine Kombinationstherapie mit einem biofilmaktiven Präparat wie bsp. Rifampicin empfohlen (Osmon et al 2013, Parvizi et al 2013, Saginur et al 2006, Sendi & Zimmerli 2017, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zimmerli 2004). Über die Dauer der Antibiotikagabe herrscht keine Einigkeit. Hier werden je nach Fachgesellschaft und Autor Zeiträume von sechs Wochen bis teilweise zu sechs Monaten diskutiert (Yen et al 2019). Es wird dazu geraten, zunächst mit einer intravenösen Gabe zu beginnen und diese bei klinisch gutem Ansprechen frühestens nach zwei Wochen auf eine orale Antibiotikum umzustellen, sofern dieses eine gute Bioverfügbarkeit und Knochengängigkeit aufweist (Osmon et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zimmerli 2004). Auch der Zeitpunkt der Umstellung wird kontrovers diskutiert. So raten Daver et al (2007) und Darley et al (2011) dazu, die Antibiotikatherapie möglichst frühzeitig zu oralisieren, um den Patienten mehr Unabhängigkeit und eine frühere Entlassung aus der Klinik bei gleichzeitiger Kostensenkung zu ermöglichen, da sie keinen Therapienachteil einer frühzeitigen Oralisierung gegenüber eine prolongierten i.v. Gabe nachweisen konnten. Li et al (2019) konnten sogar zeigen, dass eine komplett orale Applikation im Vergleich zur i.v. Gabe innerhalb der ersten sechs Wochen keine höhere Therapieversagensrate bei schweren orthopädischen Infektionen aufweist (*failure rate* 13.2 % oral vs. 14.6 % i.v.). Zu beachten ist dabei natürlich das gewählte Antibiotikum bzw. die gewählte

Antibiotikakombination mit deren Pharmakokinetik und die pathogenen Eigenschaften des zugrundeliegenden Erregers.

Sofern sich strikt an die aktuellen Diagnose- und Therapieempfehlungen gehalten wird, können mitunter sehr gute Behandlungsergebnisse im Rahmen prothesenerhaltender Strategien bei *Frühinfektionen* erzielt werden. Sendi et al (2017) haben eine Erfolgsrate von 91 % für Frühinfektionen bei Hüft-TEP-PJIs erzielen können. Dennoch zeigt sich in der Literatur eine erhebliche Spannweite der Erfolgsraten von 36 % bis 91 %, wie Triantafyllopoulos et al (2016) zusammenfassen.

Lässt sich in einer der im Rahmen des durchgeführten Debridements gewonnenen Proben ein schwer behandelbarer Erreger nachweisen (*small variant* Staphylokokken, Enterokokken, chinolonresistente *Pseudomonas aeruginosa*, alle multiresistenten Erreger/Rifampizinresistenz, Erreger ohne oral-bioverfügbares Antibiotikum) (Otto-Lambertz et al 2017), so ist ein Prothesenerhalt nicht sinnvoll und ein Umschwenken auf das nachfolgend dargelegte Therapiekonzept sollte erfolgen.

Wie bereits zuvor erwähnt, besteht dieses aus einem Prothesenausbau mit Wechsel. Es sollte dann zur Anwendung kommen, wenn eine *verzögerte Infektion* (Symptombeginn 3-24 Monate nach OP) oder *Spätinfektion* (Symptombeginn > 24 Monate nach OP) vorliegt bzw. wenn die aktuelle klinische Beschwerdesymptomatik länger als drei Wochen besteht. Als weitere Gründe gelten der Nachweis von schwer behandelbaren Erregern (siehe oben), eine Implantatlockerung oder das Vorhandensein von beschädigtem gelenksnahen Weichteilgewebe bzw. einem Fistelgang (*sinus tract*) (Bialecki et al 2019, Osmon et al 2013, Parvizi et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zimmerli 2004). Prinzipiell kann ein Prothesenausbau mit Wechsel nach zwei unterschiedlichen Strategien durchgeführt werden. Zum einen besteht die Möglichkeit des einzeitigen Wechsels (*One-Stage-Revision-Procedure*) mit Ausbau und Neuimplantation in gleicher Sitzung. Und zum anderen kommt ein zweizeitiger Wechsel (*Two-Stage-Revision-Procedure*) mit Ausbau, Spacerimplantation und Prothesenneuimplantation zu einem späteren Zeitpunkt infrage.

Der einzeitige Prothesenwechsel bietet sich dann an, wenn der pathogene Erreger bekannt ist, nicht zum Spektrum der schwer behandelbaren Erreger gehört, ein effektiv wirksames Antibiotikum zur Verfügung steht, der Patient nicht septisch ist und das gelenknahe Weichteilgewebe intakt und ohne Fistelgang vorliegt (Bialecki et al 2019, Kapadia et al 2016, Lichstein et al 2014, Osmon et al 2013, Parvizi et al 2013, Thakrar et al 2019,

Zimmerli 2004). Neben diesen strikten Patientenauswahlkriterien sind für eine erfolgreiche Durchführung einer *One-Stage-Revision-Procedure* ein intraoperativ aggressives Weichteildébridement mit ggf. sorgfältiger Entfernung aller alten Zementanteile mit ausgiebiger Spülung und Verwendung eines antibiotikabeladenen Zements für die Prothesenreimplantation von entscheidender Bedeutung (Gehrke et al 2013). Darüber hinaus muss im Anschluss an die Revisionsoperation zwingend eine Antibiotikatherapie erfolgen. Wie bereits zuvor erwähnt, werden Länge und Applikationsart in der Literatur kontrovers diskutiert (Yen et al 2019). Wird sich streng an das empfohlene Therapiekonzept gehalten, können Erfolgsraten zwischen 75-95 % erzielt werden (Bialecki et al 2019). Einzeitige Therapiekonzepte werden vornehmlich in Europa durchgeführt (Cooper & Della Valle 2013), weswegen ein Großteil der Daten aus der europäischen Literatur stammt (Bialecki et al 2019). In den USA hat sich vermehrt das zweizeitige Therapiekonzept durchgesetzt (Cooper & Della Valle 2013, Osmon et al 2013, Windsor 1991), obwohl die in der Literatur verfügbaren Daten vergleichbare Ergebnisse bzw. sogar eine potentielle Überlegenheit einer *One-Stage-Revision-Procedure* im Vergleich zur *Two-Stage-Revision-Procedure* darlegen, sofern die o.g. Voraussetzungen erfüllt sind (Bialecki et al 2019, Nagra et al 2016, Rowan et al 2018).

Ist bereits ein Kriterium für einen einzeitigen Wechsel nicht erfüllt, sollte ein zweizeitiges Therapieverfahren angestrebt werden (Bialecki et al 2019, Lichstein et al 2014, Osmon et al 2013, Parvizi et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zimmerli 2004), welches erstmalig 1983 durch Insall et al (1983) beschrieben wurde. Hierbei wird in einer initialen Operation (*Stage I*) die infizierte Prothese entfernt und wiederum ein aggressives Weichteildébridement mit ggf. sorgfältiger Entfernung aller alten Zementanteile, sowie ausgiebiger Spülung des Gelenks durchgeführt. Im Anschluss wird in den meisten Fällen empfohlen, einen Platzhalter, einen sogenannter *Spacer*, einzusetzen (Osmon et al 2013, Parvizi et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zimmerli 2004). *Spacer* sind meist auf Polymethylmethacrylat (PMMA)-Basis hergestellte Zementplatzhalter, die in ihrer Zusammensetzung auf das von Charnley (Charnley 1960) als Goldstandard etabliertem Prinzip des Einsatzes von PMMA-Knochenzement für den künstlichen Gelenkersatz beruhen. Dabei gibt es eine Vielzahl von unterschiedlichen Modellen, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll. Ein *Spacer* kann entweder mit dem entsprechenden Gelenk artikulieren oder statisch konfiguriert sein, was laut Voleti et al (2013) natürlich einen

Einfluss auf die Beweglichkeit der betroffenen Gliedmaße, aber weniger auf das spätere Resultat der Infektbekämpfung hat. Die Wahl der *Spacerart* hängt dabei von verschiedenen Kriterien wie dem infektbedingten Knochenverlust, dem Zustand der Weichteile, der Notwendigkeit der Gelenkbewegung, der Verfügbarkeit der verschiedenen *Spcaerarten* und der Auswahl an beigefügten Antibiotika ab (Voleti et al 2013). Neben der Gewährleistung des rudimentären Funktionserhalts kann und sollte ein *Spacer* zusätzlich als Antibiotikaapplikator zur lokalen Eradiktation dienen, indem ihm Antibiotika zugesetzt werden. Die Antibiotika müssen dabei hitzebeständig und gut wasserlöslich sein, um zum einen die exotherme Reaktion des Polymerisationsprozesses bei der Aushärtung des Zements zu überstehen und zum anderen gut in das umgebende Gewebe diffundieren zu können, um eine allmähliche Antibiotikafreisetzung zu ermöglichen und somit eine nachhaltige bakterizide Wirkung zu erzielen (Cooper & Della Valle 2013, Cui et al 2007). Cephalosporine, Daptomycin, Gentamicin, Tobramycin und Vncomycin sind dabei je nach zugrundeliegendem pathogenen Erreger die gebräuchlichsten Antibiotika (Cooper & Della Valle 2013, Cui et al 2007, Parvizi et al 2013). Um eine optimale Eradikation zu gewährleisten, sollte die im periprothetischen Gewebe erreichte Antibiotikakonzentration ausreichen, um eine PJI nach *Stage 1* mindestens sechs Wochen lang zu behandeln (Fink et al 2011). In der Literatur finden sich verschiedene Angaben für die optimale Dosierung, welche mitunter auf persönlichen Erfahrungen oder den wenigen Studien wie die von Lewis et al (2010) beruhen. Möglichkeiten zur Verbesserung des Wirkungsgrades können auf einer späten Zugabe des Antibiotikapulvers beim Anmischen des Zements beruhen (Amin et al 2012) oder durch die Verwendung eines hochviskosen Zementpräparats, das nachweislich über hervorragende Elutionseigenschaften verfügt, hervorgerufen werden (Penner et al 1999). Insgesamt lassen sich in der Literatur eine Vielzahl an Studien finden, die den positiven Effekt artikulierender und antibiotikafreisetzenden *Spacern* auf das Eradikationsoutcome bei PJIs bestätigen (Biring et al 2009, Castelli et al 2014, Cui et al 2007, Hofmann et al 2005).

Nach erfolgter *Stage 1* schließt sich im Intervall die Prothesenreimplantation an (*Stage 2*). Über den genauen Zeitpunkt der Durchführung von *Stage 2* herrscht in der Literatur keine Einigkeit und die einzelnen Fachgesellschaften konnten keine klare Empfehlung herausarbeiten (Lichstein et al 2014, Osmon et al 2013, Parvizi et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010). So werden je nach Autor und Studie Zeiträume von einigen Wochen bis zu mehreren Monaten angegeben. Als

Entscheidungskriterien spielen der zugrundeliegende Erreger, der Weichteil- und Knochenstatus sowie Patientenkonfition die maßgebliche Rolle. Zimmerli (2004) beschreibt eine mögliche Einteilung in *Two-Stage Exchange with short* (2-4 Wochen) und *Two-Stage Exchange with long interval* (6-8 Wochen) zwischen *Stage 1* und *Stage 2*. Dabei wird das *long interval* für PJIs mit schwer behandelbaren Erregern empfohlen. Zusätzlich zum chirurgischen Vorgehen sollte auch bei der *Two-Stage-Revision-Procedure* im Intervall und zum Teil darüber hinaus zwingend eine Antibiotikatherapie durchgeführt werden (Cooper & Della Valle 2013, Osmon et al 2013, Parvizi et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zimmerli 2004). Auch in diesem Fall werden die genaue Länge und Applikationsart in der Literatur kontrovers diskutiert (Yen et al 2019). Einige Autoren empfehlen bei einer schwerwiegenderen PJI mit *long interval* die Antibiotikagabe vor *Stage 2* mindestens zwei Wochen oder länger vorher ausgesetzt bzw. beendet zu haben um nach Reevaluation sicher in ein steriles Gelenk zu reimplantieren (Cooper & Della Valle 2013, Zimmerli 2004). Im Unterschied zur prothesenerhaltenden Therapie besteht bei der *Two-Stage-Revision Procedure* mit Biofilmbildnern als zugrundeliegenden pathogenen Erregern keine Empfehlung zur Rifampicin-Gabe, da man davon ausgeht, dass nach *Stage 1* alles Fremdmaterial entfernt wurde (Osmon et al 2013).

Cooper & Della Valle (2013) empfehlen außerdem die interdisziplinäre Patientenbetreuung durch Infektiologen, Internisten und Ernährungsmedizinern, um eine möglichst optimale Ausgangssituation bis zur *Stage 2* zu ermöglichen.

Mit einem zweizeitigen Prothesenwechsel lassen sich auf diese Art und Weise laut Kapadia et al (2016) in der Literatur Erfolgsraten von 65 % bis 100 % finden.

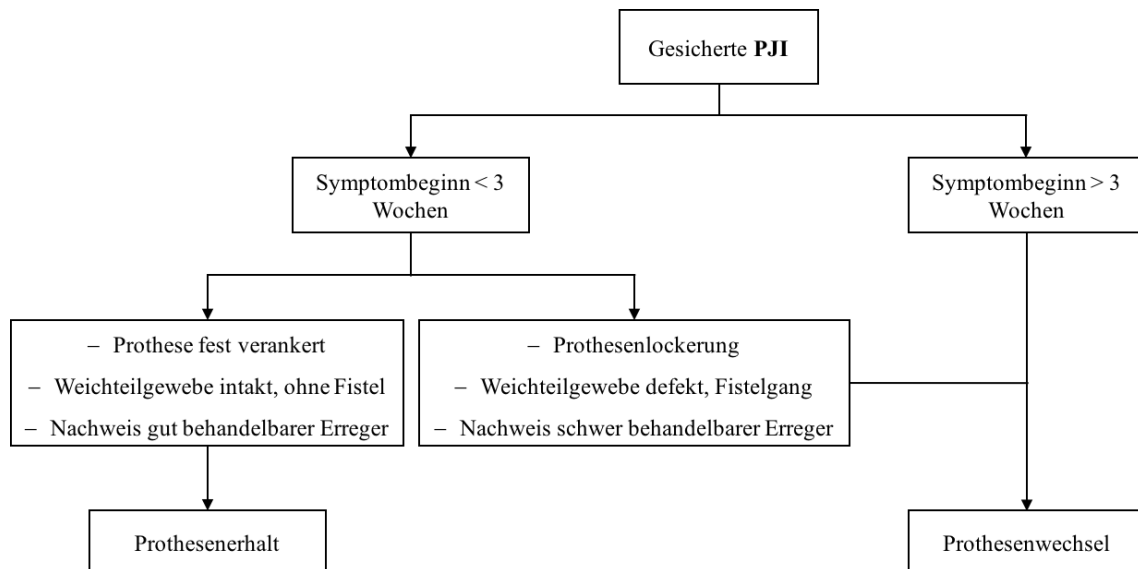


Abbildung 3 Vereinfachter Therapiealgorithmus für PJIs (in Anlehnung an die Fachgesellschaftsempfehlungen (Osmon et al 2013, Parvizi et al 2011b, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010)).

Zuletzt soll noch einmal auf die Therapie von MRSA-assoziierten PJIs im Speziellen eingegangen werden. Wie sich bereits aus den vorherigen Erörterungen entnehmen lässt, gehört MRSA zum Spektrum der schwer behandelbaren Erreger (Otto-Lambertz et al 2017). Demnach dient als Therapie-Goldstandard für MRSA-assoziierte PJIs die *Two-Stage-Revision Procedure* mit Prothesenausbau, Spacerimplantation, Antibiotikatherapie und Prothesenreimplantation zu einem späteren Zeitpunkt. Diesbezüglich herrscht in der Literatur weitestgehend Einigkeit. Als Standardantibiotika wird initial Vancomycin empfohlen. Die Intervallzeit sollte eher lang gehalten werden (Osmon et al 2013, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010, Zimmerli 2004). Allerdings konnten Lora-Tamayo et al (2013) in einer großen retrospektiven Multicenter Studie mit 345 Patienten zeigen, dass durchaus auch eine prothesenerhaltende Therapie bei MRSA-PJIs möglich ist und ein vergleichbares Outcome wie für MSSA-PJIs aufweist. Die Autoren konnten lediglich einen signifikanten Unterschied für den Zeitpunkt eines Behandlungsversagen nachweisen. Darüber hinaus verzichteten Zimmerli (2004) und Sendi et al (2006) im Rahmen von durch MRSA und *S. aureus* Small Colony Variants hervorgerufene PJIs auf die Implantation eines *Spacers* im Intervall, um keinen neuen Fremdkörper in das Gewebe einzubringen und somit die Gefahr der Reinfektion zu erhöhen.

1.2.6 Therapieversagen und Folgen

Protheseninfektionen haben für alle beteiligten Personen und Institutionen einen erheblichen Einfluss auf deren Leben bzw. deren aufzubringende Ressourcen und können im schlimmsten Fall zu einer lebenslangen Behinderung führen (Malizos 2017). Dies ist besonders dann der Fall, wenn der initiale Therapieversuch scheitert. Trotz vielversprechender und je nach zugrundeliegender Studie hoher Eradikationsraten von bis zu 100 %, wie Bialecki et al (2019), Kapadia et al (2016) und Triantafyllopoulos et al (2016) es jeweils für die einzelnen Revisionskonzepte zusammenfassen, finden sich in der Literatur auch eine Vielzahl an Arbeiten die von hohen Misserfolgsraten berichten. So geben Kubista et al (2012) eine Reinfektionsrate von 15,8 % nach erfolgter *Two-Stage-Revision Procedure* an. Als führende Ursache hierfür haben die Autoren ein chronisches Lymphödem und eine Revisionsoperation zwischen *Stage 1* und *Stage 2* herausgearbeitet. Auch Mortazavi et al (2011) berichtet über hohe Reinfektionsraten von 28 % nach *Two-Stage-Revision Procedure*. Dabei ermittelten sie als Hauptursachen für eine Reinfektion, wenn die initiale PJI ohne Erregernachweis vorlag, aufgrund eines Methicillin-resistenten Erregers hervorgerufen wurde oder eine verlängerte Operationszeit bei *Stage 2* benötigt wurde. Staats et al (2017) berichten über eine deutliche Verschlechterung des Therapieerfolgs, sofern nach der initialen *Two-Stage-Revision Procedure* eine Reinfektion auftritt. Aus ihrem 332 Patienten umfassenden Kollektiv entwickelten 44 Patienten eine Reinfektion. Bei diesen 44 Patienten folgen teils eine Vielzahl von weiteren Revisionseingriffen und es konnte lediglich in 52,3 % zum Ende des Beobachtungszeitraums nach 56,3 Monaten eine zufriedenstellende Prothesenreimplantation erfolgen. Bei den restlichen Patienten war noch immer entweder ein *Spacer* implantiert, es wurde eine Amputation oder Arthrodesse durchgeführt, es wurde eine Megaprothese eingesetzt oder es lag eine *Girdlstone Situation* (entsprechendes Gelenk ohne *Spacer* oder Prothese und somit funktionslos) vor. Wie auch Mortazavi et al (2011) herausgearbeitet haben, weisen besonders PJIs durch multiresistente Erreger wie MRSA ein erhöhtes Therapieversagen, häufig mit *failed Revision Procedures*, auf (vgl. hierzu Kapitel 1.2.4).

PJIs haben mit oder ohne Therapieversagen einen erheblichen Einfluss auf die Mortalität der betroffenen Patienten. Zmistowski et al (2013) verglichen die Daten ihrer Kohorte, indem sie die Mortalität von 436 PJI-Revisionen derer von 2342 aseptischen Revisionsoperationen nach einem und nach zwei Jahren gegenüberstellten. Dabei

ergaben sich Werte von 10,6 % vs. 2 % nach dem ersten und 13,6 % vs. 3,9 % nach dem zweiten Jahr. Auch Fischbacher & Borens (2019) und Gundtoft et al (2017) konnten ähnliche Zahlen herausarbeiten. Gundtoft et al (2017) werteten Daten eines sehr großen Patientenkollektivs aus. Sie verglichen 445 PJI-Revisionen jeweils mit 1350 aseptischen Revisionen und 66.709 Patienten ohne Revision. Hierbei ergab sich eine 1-Jahres-Mortalitätsrate von 8 % für PJI Patienten mit erfolgter Revision. Zudem konnten die Autoren nachweisen, dass Patienten mit PJI-Revision ein 1,87-fach höheres Mortalitätsrisiko im Vergleich zu den aseptischen Revisionspatienten und ein 2,18-fach höheres Mortalitätsrisiko im Vergleich zu denjenigen Patienten haben, die sich keiner Revisionsoperation unterziehen mussten. Waren Enterokokken für die PJI ursächlich, so erhöhte sich das Mortalitätsrisiko um das 3,1-fache im Vergleich zu allen anderen Erregern. Auch Fischbacher & Borens (2019) konnten in ihrem 363 Patienten umfassenden Kollektiv nachweisen, dass sich die Mortalität signifikant erhöhte, sofern als pathogener Erreger Enterokokken oder MRSA zugrunde liegt. Sie geben die 1-Jahres-Mortalität für Patienten mit PJI-Revisionsoperationen mit 5,5 % und nach zwei Jahren mit 7,3 % an.

Neben der erhöhten Mortalität sind Revisionsoperationen bei PJIs auch mit einer längeren Operationszeit und häufigeren Operationen, einem erhöhten Blutverlust, einer erhöhten Anzahl an Komplikationen sowie längeren und häufigeren Krankenhausaufenthalten vergesellschaftet, was sich letztendlich mit der höheren Mortalitätsrate rückkoppelt und zu einer signifikant höheren Auslastung der Krankenhaus- und Arztressourcen führt (Bozic & Ries 2005).

Die ökonomischen Folgen von PJIs sind ebenfalls beträchtlich und über die letzten Jahre immer weiter angestiegen (Brochin et al 2018, Darouiche 2004, Kurtz et al 2007b). So berichten Brochin et al (2018) für das Jahr 2013 über mittlere Kosten von 31.312 US-Dollar pro PJI Revisionsbehandlung. Dies bedeutet einen Anstieg um 14 % im Vergleich zum Jahr 2003. Betrachtet man diese Einzelkosten für alle jährlich durchgeführten PJI-bedingten Revisionsoperationen weltweit, ergibt sich eine immense Summe, welche in den kommenden Jahren vermutlich noch weiter steigen wird.

1.3 Ziel der Arbeit

Implantat-assoziierte Infektionen stellen eine enorme Herausforderung in der modernen Medizin dar. Dafür gibt es verschiedenste Gründe. Hierbei wird das therapeutische Vorgehen durch sogenannte *Problemkeime* wie MRSA erheblich erschwert. Die behandelnden Mediziner, aber insbesondere die betroffenen Patienten leiden erheblich unter dieser Problematik. Zur Erprobung und Entwicklung neuer Therapiestrategien sind klinisch relevante *in vivo* Infektionsmodelle von enormer Bedeutung. Diese existieren aber nicht in zufriedenstellendem Maße (Reizer et al 2015).

Daher ist das primäre Ziel dieser Arbeit die Etablierung eines neuen Tiermodells am Kaninchen, welches eine sogenannte *failed Two-Stage-Revision Procedure* bei Implantat-assoziierten MRSA-Infektionen simulieren soll. Das Hauptaugenmerk lag dabei unter anderem auf der Frage, ob das angewandte Studiendesign mit der langen Versuchsdauer von 84 Tagen und den insgesamt drei Operationsterminen für das Tier Kaninchen als ethisch vertretbar anzusehen ist und möglichst hohe Überlebensraten erzielt werden können. Entsprechend der Hauptproblematik von Implantat-assoziierten MRSA-Infektionen ist es ebenfalls Ziel dieser Arbeit, über den gesamten Versuchszeitraum, trotz stattgefundener Eradikation durch Débridement und einem mit Vancomycin beladenen PMMA-Spacer, möglichst hohe Reinfektionsraten in Form einer Osteomyelitis zu erzielen.

Zusätzlich sollte der optimale MRSA Stamm in optimaler Inokulationsdosis für hohe Reinfektionsraten ermittelt werden.

Dadurch soll dieses Modell für zukünftige *in vivo* Untersuchungen zur Entwicklung neuer Behandlungsmethoden von durch MRSA hervorgerufenen Implantat-assoziierten Osteomyelitiden nutzbar sein und somit einen Beitrag zum Kampf gegen das immer häufiger werdende Versagen von Gelenkersatzverfahren leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

- Adobe Photoshop CS6, 64bit	Fa. Adobe Systems Inc., San José, USA
- BactoSonic	Fa. BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, GER
- Digitale Fotoeinrichtung DC500	Fa. Leica Microsystems Ltd., Glattbrugg, CH
- Digitales-Röntgengerät XDR-3	Fa. VetZ GmbH, Isernhagen, GER
- Feinwaage BP-1200	Fa. Sartorius AG, Göttingen, GER
- Fotomikroskop Axioplan 2	Fa. Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, GER
-GraphPad PRISM 7	Fa. GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
- Heraeus Brutschrank	Fa. Thermofischer Scientific GmbH, Dreieich, GER
- iPhone 4s u. 5	Fa. Apple Inc., Cupertino, USA
- Leica IM 1000 v. 4.0	Fa. Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK
- Microsoft Excel 2011 u. 2016	Fa. Microsoft, Redmond, USA
- Paraffin-Einbettautomat TP1050	Fa. Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, GER
- Rotationsmikrotom 2155	Fa. Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, GER
- Sigmaplot 11.0	Fa. Systat Software GmbH, Erkrath, GER
- Spiral Bacterial Splatter	Fa. Topac, Cohasset, USA

- Vortex-Genie 2
Fa. Scientific Industries, Inc.,
Bohemia, USA
- Wägeplattform IS 34 EDE-H
Fa. Sartorius AG, Göttingen, GER
- Zeiss Axio Vision
Fa. Carl Zeiss Jena GmbH, Jena,
GER

2.1.2 Medikamente

- Atropinsulfat
Fa. Eifelfango GmbH & Co. KG,
Bad Neuenahr-Ahrweiler, GER
- Bepanthen-Augensalbe
Fa. Bayer AG, Leverkusen, GER
- Carprofen (Rimadyl[®])
Fa. Zoetis Deutschland GmbH,
Berlin, GER
- Isofluran
Fa. CP-Pharma Handelsgesellschaft
mbH, Burgdorf, GER
- Ketamin (10 %)
Fa. WTD, Garbsen, GER
- Medetomidini hydrochloridum (Domitor[®])
Fa. Pfizer GmbH, Berlin, GER
- T 61 (Embutramid, Mebezoniumiodid,
Tetracainhydrochlorid)
Fa. MSD Tiergesundheit,
Unterschleißheim, GER
- Vancomycin (PMMA-Spacer)
Fa. aap Implantate AG, Berlin, GER
Unterschleißheim, GER

2.1.3 OP-Materialien

- Abdecktuch
Fa. Mölnlycke Health Care GmbH,
Dusseldorf, GER
- Einwegskalpell
Fa. Feather CO. Ltd., Osaka, JPN
- Fadenschere
Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, GER
- Flachmeiel
Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, GER
- Hammer
Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, GER
- Handbohrer
Fa. Stryker GmbH & Co. KG,
Duisburg, GER
- Hautantiseptikum (Braunol[®])
Fa. B.Braun AG, Melsungen, GER

- Kanüle 20G (Ø 0,9mm)	Fa. B.Braun AG, Melsungen, GER
- Kanüle 25G (Ø 0,5mm)	Fa. B.Braun AG, Melsungen, GER
- Kirschner-Draht	
- Klammernahtgerät (Weck-Visistat® 35W)	Fa. Teleflex Ltd., Athlone, IRL
- Kompresse, steril	Fa. B.Braun AG, Melsungen, GER
- Lochtuch	Fa. Mölnlycke Health Care GmbH, Düsseldorf, GER
- Mundschutz	Fa. Mölnlycke Health Care GmbH, Düsseldorf, GER
- Nadelhalter	Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, GER
- Narkosegerät UniVet Porta Isuflorane	Fa. Groppler, Deggendorf, GER
- OP-Handschuhe	Fa. Mölnlycke Health Care GmbH, Düsseldorf, GER
- OP-Haube	Fa. Mölnlycke Health Care GmbH, Düsseldorf, GER
- OP-Kittel	Fa. Mölnlycke Health Care GmbH, Düsseldorf, GER
- OPSITE-Sprühverband	Fa. Smith & Nephew, Hamburg, GER
- Overholt-Klemme	Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, GER
- Pinzette, chirurgisch	Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, GER
- Präparierschere	Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, GER
- Rasierer für Labornager	Fa. Indulab AG, Gams, CH
- Säge, oszillierend	Fa. DePuySynthes – Johnson & Johnson Medical GmbH, Umkirch, GER
- Scharfer Löffel	Fa. Aesculap AG, Tuttlingen, GER
- Seitenschneider	Fa. DePuySynthes - Johnson&Johnson Medical GmbH, Umkirch, GER
- Spritze 10 ml	Fa. B.Braun AG, Melsungen, GER
- Spritze 1 ml	Fa. B.Braun AG, Melsungen, GER
- Spritze 5 ml	Fa. B.Braun AG, Melsungen, GER

- Tupfer, steril Fa. B.Braun AG, Melsungen, GER
- Vicryl-Nahtmaterial (4-0) Fa. Ethicon - Johnson&Johnson
Medical GmbH, Norderstedt, GER
- Wärmematte Fa. TCM, Hamburg, GER

2.1.4 Basismedien, Zusätze, Chemikalien, Kits, Labormaterialien

- Aceton Fa. Stockmeier Chemie GmbH &
Co. KG, Bielefeld, GER
- API® ID-Teststreifen Fa. bioMerieux, Marcy L'Etoile,
FRA
- Aqua dest. Laboreigener Anschluss
- BHI-Agarplatten Institut für Medizinische
Mikrobiologie, Gießen, GER
- BHI-Lösung Fa. OXOID Limited, Hants, UK
- Deckgläser Fa. R. Langenbrink GmbH,
Emmendingen, GER
- DePex Fa. SERVA Electrophoresis GmbH,
Heidelberg, GER
- di-Natriumtetraborat (Borax) Fa. Merck KGaA, Darmstadt, GER
- Drigalskispatel Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG,
Karlsruhe, GER
- Echtrotsalz (Fast Red TR Salt) Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen,
GER
- Einbettkassetten Fa. Leica Biosystems Nussloch
GmbH, Nussloch, GER
- Eisessig Fa. Merck KGaA, Darmstadt, GER
- Eosin G Fa. Merck KGaA, Darmstadt, GER
- Ethanol 70-100 % Fa. Stockmeier Chemie GmbH &
Co. KG, Bielefeld, GER
- Gram-color Färbeset Fa. Merck KGaA, Darmstadt, GER

- Greiner Tubes	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, GER
- Instant Hämatoxylin	Fa. Shandon Inc., Pittsburgh, USA
- Mayers Hämalaunlösung	Fa. Merck KGaA, Darmstadt, GER
- N-N-Dimethylformamid (DMF)	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, GER
- Na-Tartrat (di-Natriumtartrat-Dihydrat)	Fa. Merck KGaA, Darmstadt, GER
- NaCl (0,9%)	Fa. B.Braun AG, Melsungen, GER
- Naphthol-AS-TR-Phosphat	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, GER
- Natriumacetat	Fa. Merck KGaA, Darmstadt, GER
- Objektträger	Fa. R. Langenbrink GmbH, Emmendingen, GER
- Paraffin (Roti [®] -Plast)	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Ger
- PBS-Puffer	Fa. Biochrom GmbH, Berlin, GER
- Petrischalen-Drehtisch	Fa. schuett-biotec GmbH, Göttingen, GER
- Pipette 10-100 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, GER
- Pipette 100-1000 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, GER
- Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, GER
- Pyronin G	Fa. Merck KGaA, Darmstadt, GER
- Röhre 15 ml	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER
- Röhre 250 ml	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER
- Safe-Lock Tubes 2 ml	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, GER
- SafeSeal Reagiergefäße 1,5 ml	Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER
- <i>Staphylococcus aureus</i>	Institut für medizinische Mikrobiologie, JLU-Gießen, GER
- Titriplex III p.A.	Fa. Merck KGaA, Darmstadt, GER

- Toluidinblau O	Fa. Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster, GER
- Trizma Base	Fa. Merck KGaA, Darmstadt, GER
- Xylol	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, GER

2.1.5 Versuchstiere

Das Versuchsvorhaben wurde gemäß §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006 dem Landesamt für Verbraucherschutz des Freistaates Thüringen vorgelegt und am 22.11.2013 unter der Reg.-Nr. 14-003/13 von diesem genehmigt.

Als Versuchstiere dienten 12 ausgewachsene *New Zealand White Kaninchen* mit einem Körpergewicht zwischen 5200 g – 6000 g. Die Wahl dieser Gattung wurde aufgrund von positiven Ergebnissen aus vorherigen in der Literatur beschriebenen Versuchsvorhaben vorgenommen. Reizner et al. (2015) liefern hierzu einen systematischen Überblick.

Die artgerechte Aufzucht der Tiere fand bei Dipl. ing. agr. Roland Krieg, einem anerkannten Zuchtbetrieb für Kaninchen (Niederwünsch, Thüringen) statt. Aus diesem Betrieb wurden die Tiere bereits vier Wochen vor Versuchsbeginn bezogen und in der Tierklinik Bad Langensalza (Thüringen), dem Ort der Studiendurchführung, eingestallt. Die Haltung erfolgte in einem für Labortiere ausgestatteten klimatisierten Tierstall in Einzelkäfigen. Die Tiere erhielten zur Ernährung Mastfutter sowie Wasser ad libitum. Eine adäquate Versorgung und Betreuung der Tiere wurde für den gesamten Versuchszeitraum durch die Mitarbeiter der Tierklinik Bad Langensalza unter tierärztlicher Aufsicht gewährleistet.

2.1.6 Bakterien

Als Infektionsquelle für die in diesem Versuchsvorhaben induzierten Implantat-assoziierten Infektionen dienten zwei aus Patientenmaterial isolierte MRSA-Stämme. Dabei handelte es sich um den Stamm EDCC 5398 (Eugen Domann Culture Collection Nr. 5398, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen), welcher aus einer Wundinfektion isoliert wurde und um den Stamm EDCC 5443 (Eugen Domann Culture Collection Nr. 5443, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen), welcher aus der Nase eines Patienten mit Implantat-assoziierte Infektion isoliert wurde. Die

biochemische Charakterisierung der Stämme erfolgte durch den Analytischen-Profil-Index (API) (Fa. bioMerieux, Marcy L'Etoile, FRA) und Sequenzierung des 16S rDNA Gens, sowie spezifischem PCR Nachweis von *Enterotoxin G* und *I*, sowie *mecA*.

Zur Herstellung der für diesen Versuch genutzten Inokulationsdosen von 10^5 und 10^7 Colony Forming Units (CFUs) *S. aureus* mussten die beiden Bakterienstämme zunächst kultiviert werden. Dazu wurde in einem ersten Schritt für jeden Stamm eine Übernachtskultur angelegt. Von diesen Übernachtskulturen wurde jeweils eine Einzelkolonie der beiden Stämme in ein geeignetes Nährmedium (*brain heart infusion*, BHI) überführt und für 16 h bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Die so entstandenen Bakteriensuspensionen waren deutlich trüb. Sie wurden im Verhältnis 1:50 mit PBS-Puffer verdünnt und unter oben beschriebenen Verfahren erneut für 4 h inkubiert. Darauf folgte eine erneute Verdünnung mittels PBS-Puffer im Verhältnis 1:10 und das Ausplattieren auf BHI-Agarplatten. Für eine exakte Bestimmung und Auszählung der CFUs pro ml Bakteriensuspension (CFUs/ml) wurde die Ausplattierung der Suspensionen mittels eines Spiral Platers (Fa. Topac, Cohasset, USA) durchgeführt. Dieses Gerät sorgt für eine exakte Einhaltung der gewünschten Keimdichte pro ml Bakteriensuspension während des Auftragens auf die BHI-Agarplatten.

Um einen ausreichenden Bestand an final aufgearbeiteten Bakteriensuspensionen vorrätig zu haben, wurden pro Bakterienstamm und Inokulationsdosis jeweils zehn Proben in 2 ml Safe-Lock-Tubes vorbereitet. Das Volumen der einzelnen Proben betrug insgesamt 200 μl . In diesen 200 μl waren die jeweiligen Inokulationsdosen von 10^5 und 10^7 CFUs, welche in einem 20 μl umfassenden BHI/20% Glycerol Gemisch gelöst waren, enthalten. Bis zu ihrer Nutzung an Tag 0 wurden die Proben bei -80°C gelagert und dadurch haltbar gemacht.

2.1.7 Spacer

Zur Eradikation der primär induzierten K-Draht-assoziierten MRSA-Infektion dienten auf *Polymethylmethacrylat* (PMMA)-Basis hergestellte Zement-*Spacer* (Fa. aap Implantate AG, Berlin) (Abb. 4). Materialgrundlage eines jeden *Spacers* waren 40g BonOs[®] R (Fa. aap Implantate AG, Berlin). BonOs[®] R orientiert sich laut Herstellerangaben (<http://www.aap.de/de/produkte/biomaterialien/knochenzemente-und-accessoires/bonosrr-bonosrr-genta>) in seiner Zusammensetzung an dem von

Charnley (1960) als Goldstandard etablierten Prinzip des Einsatzes von PMMA-Knochenzement für den künstlichen Gelenkersatz. Die Herstellung des Zements fand unter Beimischung von 20 ml Monomer in einem Vakuummischsystem statt. Als aktiv wirksame Substanz wurde den 40 g BonOs[®] R 2g Vancomycin Hydrochlorid zugesetzt. Um eine Röntgensichtbarkeit zu gewährleisten, wurde außerdem Zirkondioxid beigemischt.

Zur Bestimmung der lokal wirksamen Menge an freigesetztem Vancomycin wurde ein Elutionsversuch durchgeführt. Dabei wurde von 5 Prüfkörpern (60 mm x 2 mm) über einen Zeitraum von 4 Tagen die Elution in 1,5 ml Phosphatpuffer (pH 7,4) bei einer Temperatur von 37° C ermittelt. Es fand ein täglicher Wechsel der Pufferlösung statt. Als Ergebnis konnte eine mittlere Freisetzung von 1568,8 µg ± 255,8 µg festgestellt werden. Demnach ist davon auszugehen, dass die in dieser Studie genutzten *Spacer* nach Implantierung in den tibialen Markraum über einen Zeitraum von vier Tagen lokal 1,569 mg Vancomycin freisetzen.

Der Elutionsversuch sowie die dazugehörige Datenerhebung wurde von der Firma aap Implantate AG, Berlin vorgenommen.

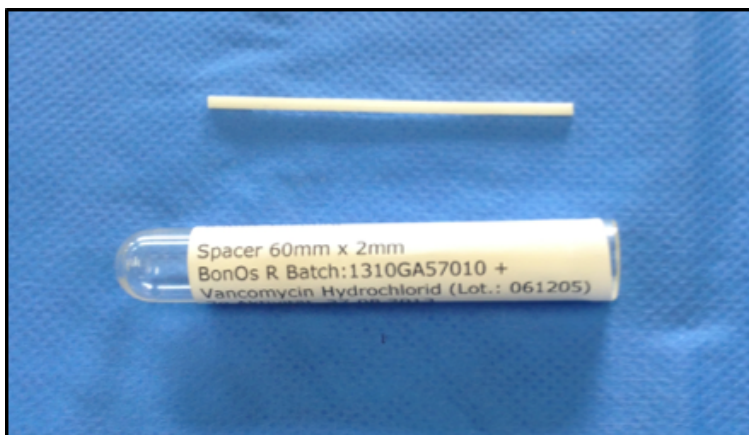


Abbildung 4 PMMA-Zement-*Spacer* (Fa. aap Implantate AG, Berlin).

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

Die für diese Studie genutzten zwölf Versuchstiere wurden randomisiert auf vier Gruppen verteilt. Daraus ergab sich eine Größe von jeweils drei Tieren pro Gruppe. Im Folgenden wurde jeder Gruppe aus zwei unterschiedlichen MRSA-Stämmen ein Stamm in einer bestimmten Bakterienkonzentration zugeordnet (Tab. 1). Gruppe I: 10^5 CFUs EDCC 5443; Gruppe II: 10^7 CFUs EDCC 5443; Gruppe III: 10^5 CFUs EDCC 5398; Gruppe IV: 10^7 CFUs EDCC 5398.

	10^5 CFUs	10^7 CFUs	Total
EDCC 5443	Gruppe I 3	Gruppe II 3	6
EDCC 5398	Gruppe III 3	Gruppe IV 3	6
Total	6	6	12

Tabelle 1 Studiendesign mit Anzahl der Tiere pro Bakterienstamm und Konzentration

Das gesamte Versuchsvorhaben wurde auf einen Zeitraum von 84 Tagen terminiert. Vier Operationstermine in einem jeweiligen Abstand von 28 Tagen wurden festgelegt (Abb. 5): *Initial Surgery* (Tag 0), Revision 1 (Tag 28, **Stage 1**), Revision 2 (Tag 56, **Stage 2**) und *Final Evaluation* (Tag 84). Am letzten Operationstermin wurden die Tiere euthanasiert und die linke Tibia wurde zur weiteren Aufarbeitung und Auswertung unter sterilen Bedingungen entnommen.

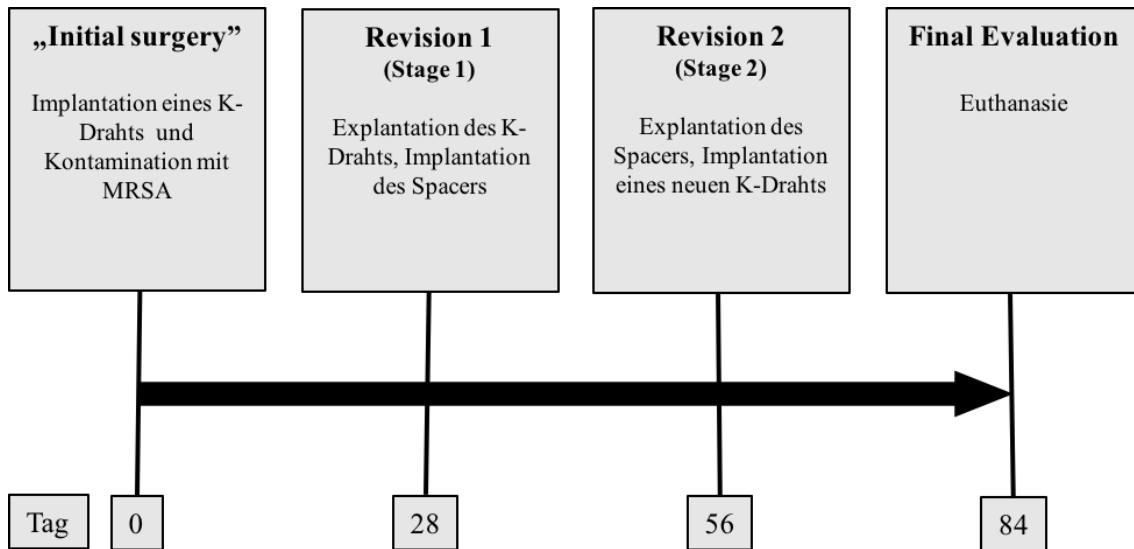


Abbildung 5 Zeitplan für das Versuchsvorhaben.

2.2.2 Operationstechnik

Alle Operationen wurden unter sterilen Bedingungen und in Allgemeinanästhesie (Ketamin (35 mg/kg KG), Domitor® (0,25 mg/kg KG), Atropin (0,05 mg/kg KG), Isofluran (0,3-0,6 Vol. %)) durchgeführt. Die fachgerechte Durchführung der Anästhesie unterlag jeweils der Aufsicht einer Tierärztin und entsprechend geschultem Tierpflegepersonal (Abb. 6).

Vor jeder Operation wurde der linke Hinterlauf im Bereich des Operationsfeldes rasiert und mit Povidon-Iod-Lösung (10 %ig) desinfiziert. Darauf folgte die sterile Abdeckung mittels eines Lochtuches (Abb. 6 (b) und 7 (a)).

Im Anschluss wurde am ersten Operationstag (Tag 0, *Initial Surgery*) eine Inzision von ca. 1-2 cm über der Tuberositas tibia mittels eines Einwegskalpells der Größe 11 getätigt (Abb. 7 (b) und (c)). Das darunterliegende Ligamentum patella wurde dargestellt und per Skalpell und Overholt-Klemme längs gespalten (Abb. 7 (d)). Mit Hilfe eines 2 mm Handbohrers wurde im folgenden Operationsschritt der tibiale Markraum eröffnet (Abb. 7 (e)). Anschließend wurde ein Kirschner-Draht mit einem Diameter von 2 mm antegrad in den Markraum eingebracht und bis zum distalen knöchernen Widerstand vorgeschoben (Abb. 7 (f)). Das überstehende, proximale K-Draht Ende wurde auf Höhe der Tuberositas tibiae mittels eines Seitenscheiders gekürzt (Abb. 7 (g)). Im nächsten Schritt wurde der Markraum gemäß der Randomisierungstabelle mit 0,1 ml NaCl Lösung und dem sich darin befindenden Bakterienstamm in bestimmter Konzentration (EDCC 5443 10^5 oder

10^7 und EDCC 5398 10^5 oder 10^7) beimpft (Abb. 7 (h)). Wie bei jedem Operationstermin fand zum Ende der *Initial Surgery* ein schichtweiser Wundverschluss statt (Abb. 7 (i)). Nach Naht des Peritendineums der Patellasehne mit 4-0 Vicrylfaden erfolgte der Hautverschluss ebenfalls mit 4-0 Vicrylfaden in Einzelknopftechnik. Als Wundversiegelung wurde ein OPSITE-Sprühverband aufgebracht. Die durchschnittliche Operationslänge der *Initial Surgery* betrug 25 min. Nach abgeschlossener Operation wurden die Tiere bis zum Wiedererlangen des vollen Bewusstseins in einer warmen (Rotlicht) und leicht kontrollierbaren Umgebung gehalten. Im Anschluss erfolgte die Unterbringung in den ursprünglichen Käfigen, in denen die täglich durch eine Veterinärmedizinerin durchgeführte Begutachtung der Tiere stattfand. Jedes Tier erhielt postoperativ als Schmerzmedikation für 10-14 Tage Carprofen (4 mg/kg KG s.c.).

Am zweiten Operationstermin (Tag 28, Revision 1, **Stage 1**) erfolgte die erneute Inzision im Bereich der alten Narbe an der Tuberositas tibiae (Abb. 8 (a) und (b)). Nach erneuter Durchtrennung des Ligamentum Patella wurde der eingebrachte K-Draht aufgesucht und mithilfe einer Overholt-Klemme gefasst und entfernt (Abb. 8 (c) und (d)). Dieser wurde sofort auf einer sterilen Agar-BHI-Platte ausgerollt und im Anschluss asserviert (Abb. 8 (e)). Es folgte die Spülung, Debridierung und erneute Spülung des tibialen Markraums mit einem 2 mm Handbohrer und 20 ml NaCl-Lösung (0,9 %ig) (Abb. 8 (f), (g) und (h)). Im Anschluss wurde ein mit Vancomycin beladener Zement-*Spacer* (PMMA) antegrad in den tibialen Markraum eingebracht und bis zum distalen, knöchernen Widerstand vorgeschoben (Abb. 8 (i) und (j)). Der schichtweise Wundverschluss und die operative Nachsorge erfolgte wie an Operationstag 1. Die mittlere Operationslänge an Operationstag 2 belief sich auf 33 min.

Das allgemeine und vorbereitende sowie das chirurgische Vorgehen am dritten Operationstermin (Tag 56, Revision 2, **Stage 2**) entsprachen bis zur Darstellung des eingebrachten *Spacers* OP Tag 1 und 2. Der *Spacer* wurde ebenfalls mittels einer Overholt-Klemme entfernt und direkt danach auf einer sterilen Agar-BHI-Platte ausgerollt und im Anschluss asserviert. Nach erneuter Debridierung und Spülung des tibialen Markraums mittels eines 2 mm Handbohrers und 20 ml NaCl-Lösung (0,9 %ig) wurde ein neuer K-Draht mit einem Durchmesser von 2 mm in den tibialen Markraum eingebracht. Der schichtweise Wundverschluss und die operative Nachsorge entsprachen Operationstag 1 und 2. Aufgrund von teilweise schwieriger *Spacer*darstellung und Entfernung wurde eine durchschnittliche Operationslänge von 44 min benötigt.

Am letzten Operationstermin (Day 84, *Final Evaluation*) erfolgte die Euthanasie der Versuchstiere unter Narkose (Ketamin (35 mg/kg KG), Domitor® (0,25 mg/kg KG)) und anschließender intrakardialer Injektion von 6 ml T 61 (Embutramid, Mebezoniumiodid, Tetracainhydrochlorid) durch eine Tierärztin der Tierklinik Bad Langensalza. Nach Freipräparation von sämtlichen muskulären und ligamentären Strukturen wurden die Tibiae im angrenzenden Knie- und Sprunggelenk exartikuliert und unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Tibiae wurden zur mikrobiologischen und histologischen Aufarbeitung mittels einer oszillierenden Säge in zwei Hälften gespalten. Zuvor wurde der K-Draht unter sterilen Bedingungen entnommen und auf einer sterilen Agar-BHI-Platte ausgerollt und im Anschluss asserviert.

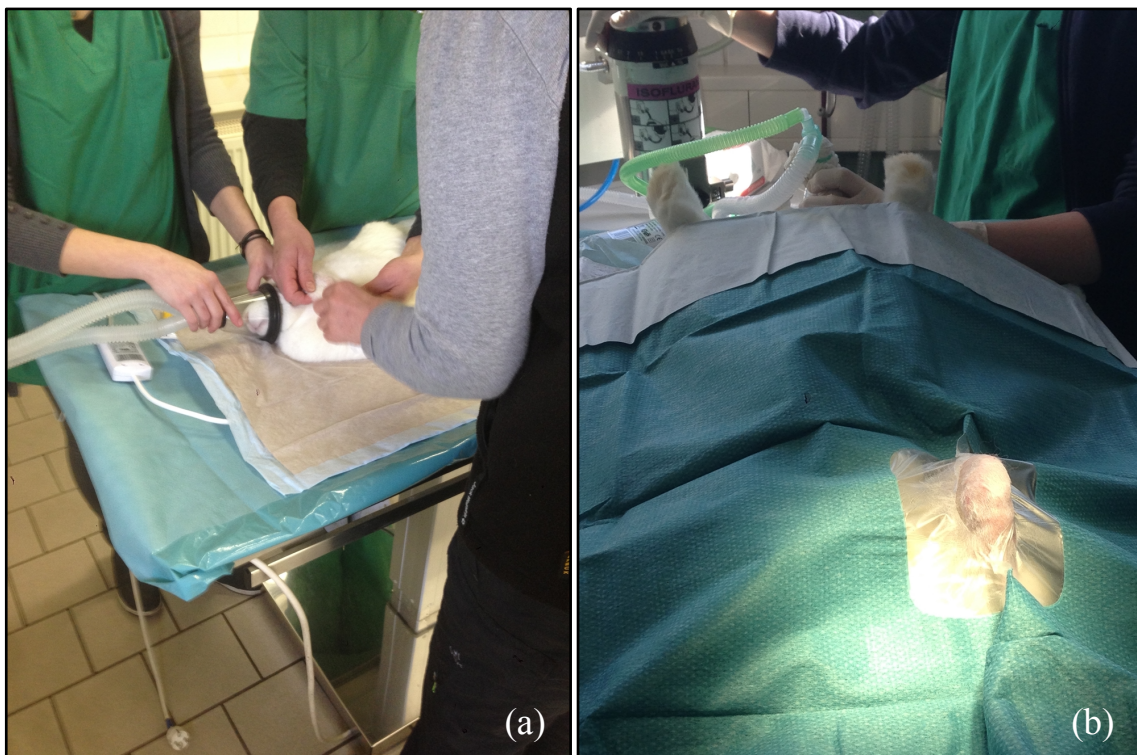


Abbildung 6 Präoperative Vorbereitungen (für jedes Tier in gleicher Art und Weise durchgeführt). Anästhesieeinleitung durch eine Tierärztin und ihr Team (a). Rückenlagerung des Versuchstiers mit steriler Abdeckung mittels Lochtuch zur Aussparung des OP-Gebiets am linken Hinterlauf (b).

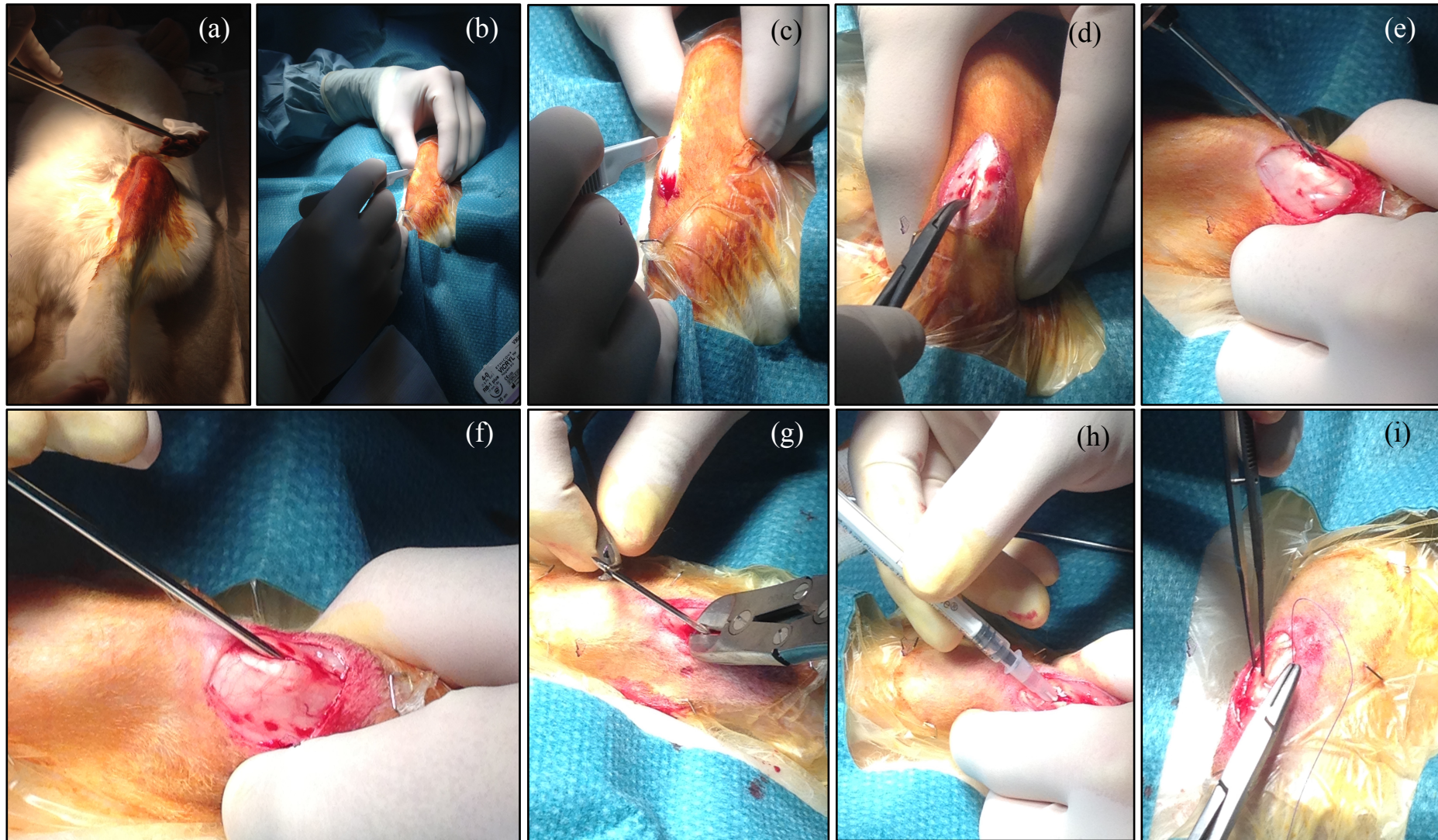


Abbildung 7 Operationstechnik Tag 0 (*Initial surgery*). Präoperative Vorbereitung des auf dem Rücken liegenden und bereits narkotisierten Versuchstieres. Nach Enthaarung des Op-Feldes folgt die Desinfektion mittels Povidon-Iodlösung (10 %) (a). Inzision an dem steril abgedeckten linken Hinterlauf über der Tuberositas Tibia per Einwegskalpell Größe 11 (b)(c). Eröffnung des tibialen Markraums mit einem 2 mm Handbohrer nach Darstellung und Spaltung des Ligamentum Patella (d)(e). Kürzung des K-Drahts mit einer Kneifzange nach antegrader Einbringung und Vorschub bis zum distalen knöchernen Ende (f)(g). Beimpfung des tibialen Markraums und dem darin liegenden K-Draht mit dem für das Tier vorgesehenen Bakterienstamm in entsprechend vorgesehener Inokulationsdosis mittels einer 1 ml Spritze (h). Schichtweiser Wundverschluss mit 4-0 Vicrylfaden (i).

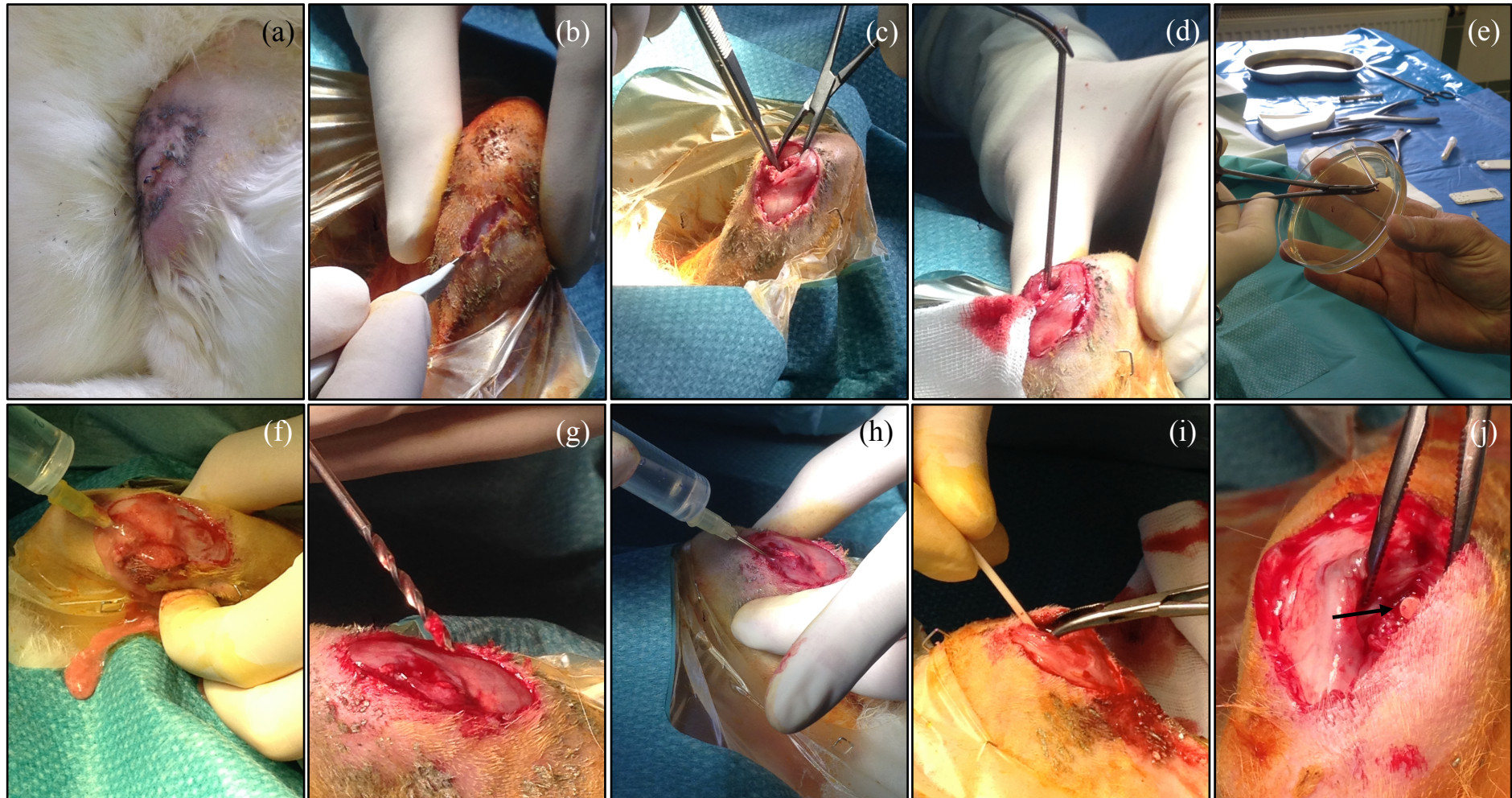


Abbildung 8 Operationstechnik Tag 28 (Revision 1, *Stage 1*). Aufsuchen des implantierten K-Drahts nach erneuter Inzision mittels eines Einwegskalpellts Größe 11 im Bereich der alten Narbe (a)(b)(c). Entfernung des K-Drahts mit Hilfe einer Overholt-Klemme (d). Ausrollen des steril entnommenen K-Drahts auf einer BHI-Agarplatte (e). Zunächst Spülung des tibialen Markraums mit 20 ml NaCl-Lösung (0,9 %ig) (f) und anschließendes Debridierung mittels eines 2 mm Handbohrers (g) sowie erneuter Spülung des tibialen Markraums mit 20 ml NaCl-Lösung (0,9 %ig) (h). Einbringen des mit Vancomycin beladenen PMMA-Spacers in den tibialen Markraum (i) und Vorschub des Spacers bis zum Anschlag, sodass dieser vollständig im Markraum eingebracht ist (Pfeil) (j).

2.2.3 Postoperatives Röntgen

Nach erfolgreicher Operation (Tag 0, Tag 28, Tag 56) wurde direkt im Anschluss eine postoperative Röntgenaufnahme im seitlichen Strahlengang zur Lagekontrolle des eingebrachten Implantats (K-Draht oder *Spacer*) im tibialen Markraum durchgeführt. Dazu wurde das noch narkotisierte Tier nach Entfernung der sterilen Operationsabdeckung auf der während der Operation genutzten Wärmematte in Seitenlage gebracht und unter den linken Hinterlauf wurde eine Röntgenkassette geschoben. Im Abstand von 25-30 cm zwischen Röntgengerät und Röntgenkassette wurde bei einer Spannung von 42 kV und einer Stromstärke von 1,7 mA mittels eines portablen Hochfrequenz-Röntgengeräts (XDR-3, VetZ GmbH, Isernhagen) eine Röntgenaufnahme angefertigt. Das Röntgenbild wurden direkt digitalisiert und konnte so umgehend befundet werden.

Alle im Raum anwesenden Personen trugen die arbeitsrechtlich vorgeschriebenen Röntgenschutzwesten und Dosimeter.

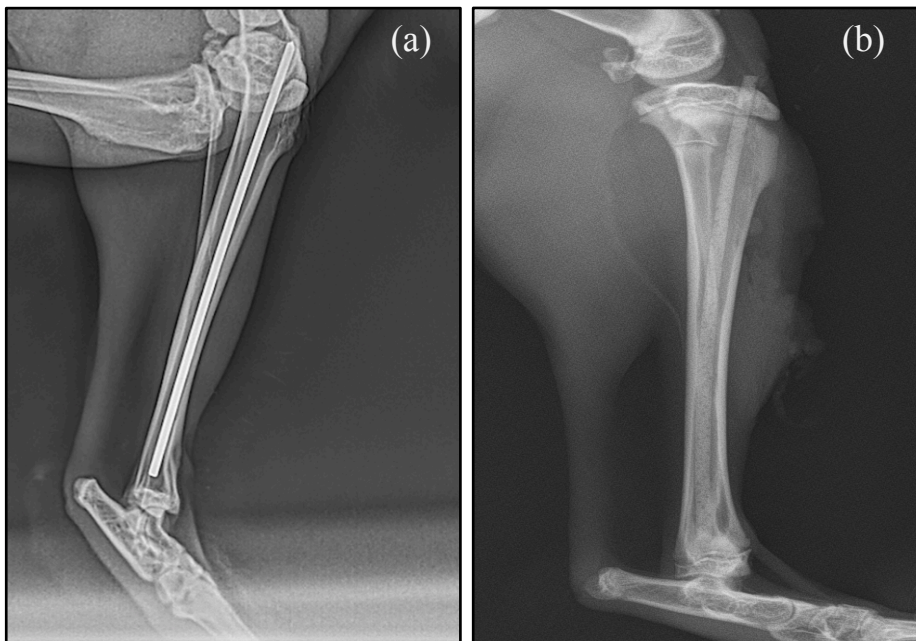


Abbildung 9 Postoperative Röntgenaufnahme im seitlichen Strahlengang zur Lagekontrolle des intramedullär liegenden Implantats. Korrekte Lage des K-Drahts an Tag 0 (a), sowie korrekte Lage des *Spacers* an Tag 28 (b).

2.2.4 Klinische Begutachtung

Alle Versuchstiere wurden über den gesamten Studienzeitraum von 84 Tagen täglich von einer Tierärztin gesehen. Anhand eines *Scoresheets* (siehe Anhang) wurde der Gesundheitszustand und das Befinden der Tiere beurteilt und dokumentiert. Die einzelnen Kriterien zur Bewertung des tierischen Wohls waren Futter-/Wasseraufnahme, Verhalten, Aussehen, Gewicht, Temperatur, Bein/Wunde und Belastung des Hinterlaufs. Als Abbruchkriterien zum Schutz der Tiere wurden folgende Kriterien festgelegt: Systemische Infektion (Sepsis) mit einer Körpertemperatur von $> 42,5^{\circ}\text{C}$, persistierende Blutung der Wunde, Gewichtsverlust $> 20\%$ innerhalb von 3 Tagen, Fraktur der operierten Extremität, Wundheilungsstörungen und Nahtdehiszenz, Rektumprolaps sowie Automutilation.

Darüber hinaus wurde an allen Operationsterminen sowie am Tag der Euthanasie besonderes Augenmerk auf mögliche Infektionszeichen am linken Hinterlauf und im Operationsgebiet gelegt. Dazu wurde an den OP-Tagen 2 und 3 (*Stage 1* und *Stage 2*) neben den klassischen Zeichen einer Infektion wie Rötung und Schwellung der Weichteile besonders auf Abszessformationen, Fisteln und Eiterdrainage geachtet. Ggfls. fand eine Säuberung bzw. Ausräumung und Abszessspaltung statt. Am Tag der Euthanasie wurde bei der sterilen Entnahme der Tibiae das angrenzende Kniegelenk und das obere Sprunggelenk (OSG) auf eventuelle Mitbeeinträchtigung begutachtet. Alle Auffälligkeiten wurden fotografisch und schriftlich dokumentiert.

2.2.5 Gewichtsentwicklung

Tägliche Gewichtskontrollen dienten zur Überwachung des tierlichen Wohls. Die Tiere wurden auf einer geeichten Wägeplattform (IS 34 EDE-H, Fa. Sartorius AG, Göttingen) mit dazugehöriger Digitalanzeige gewogen. Als Eckpunkte und entscheidende Bewertungskriterien des Allgemeinwohls und des Infektionsstatus der Tiere wurde das Gewicht an den Operationstagen (Tag 0, Tag 28, Tag 54, Tag 84) unmittelbar präoperativ genommen und graphisch ausgewertet. Um den Effekt der an Tag 0 induzierten Infektion im Vergleich zu Tag 28 und Tag 84 statistisch bewerten zu können, wurde der arithmetische Mittelwert der Körpergewichte an den Operationstagen für die Gesamtheit

der Tiere und für jede einzelne Gruppe ermittelt und durch einen Student'schen t-Test mit Signifikanzniveau $p < 0,05$ analysiert.

2.2.6 Radiologische Beurteilung am Tag der Euthanasie

An Tag 84 wurde vor der Entnahme der Tibiae letztmalig ein Röntgenbild im seitlichen Strahlengang angefertigt. Die Bildaufnahme erfolgte äquivalent zu den postoperativen Aufnahmen. Ziel dieser Röntgenaufnahmen war die Detektion radiologischer Zeichen einer Osteomyelitis. Die festgelegten Bewertungskriterien waren lytische Läsionen und periostale Auftreibungen bzw. periostale Knochenneubildung.

2.2.7 Mikrobiologie

Die an den jeweiligen Operationsterminen unter sterilen Bedingungen explantierten Implantate (Tag 28: K-Draht, Tag 54: *Spacer*, Tag 84: K-Draht) wurden auf BHI-Agarplatten ausgerollt (Abb. 8, Operationstechnik Tag 28, (c)). Die an Tag 84 des Versuchsvorhabens explantierten K-Drähte wurden vor dem Ausrollen mit Hilfe eines Seitenschneiders halbiert. Der Nachweis von bakteriellem Kulturwachstum nach einer Inkubation des Nährmediums von 18 Stunden bei 37° C wurde als Zeichen der Kolonisierung des Implantats und dementsprechend als Infektion gewertet. Es wurde eine quantitative Unterscheidung der gewachsenen Bakterienkolonien getroffen (Tab. 2, Abb. 10), womit auf die Stärke der Infektion rückgeschlossen werden konnte.

Stärke der Besiedelung	Nicht besiedelt (0)	Leicht besiedelt (+)	Stark besiedelt (++)
Anzahl Bakterienkolonien pro BHI-Agarplatte	0-5	6-50	51- ≥ 500

Tabelle 2 Quantitative Bewertung Bakterienwachstum auf BHI-Agarplatten durch ausgerollte Implantate an den Tagen 28, 54 und 84

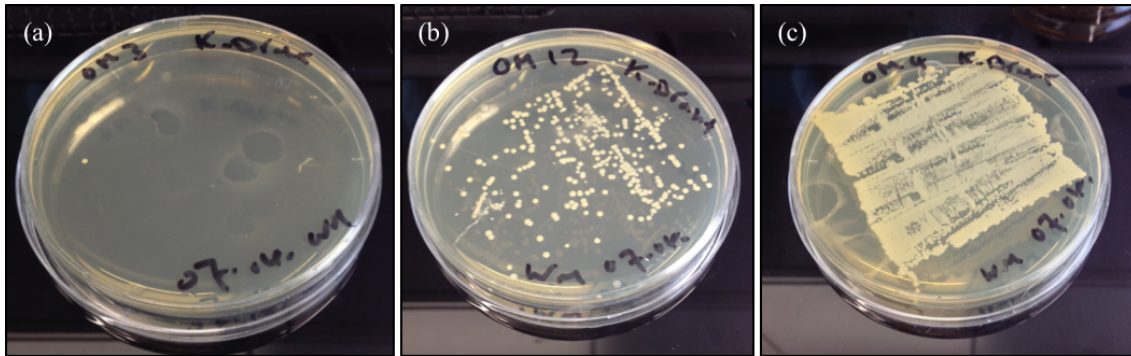


Abbildung 10 Beispiele bebrüteter BHI-Agarplatten für die drei unterschiedenen quantitativen Bewertungskriterien. Bild (a) zeigt eine *nicht besiedelte* (0) BHI-Agarplatte. Bild (b) eine *leicht besiedelte* (+) und Bild (c) eine *stark besiedelte* (++) BHI-Agarplatte.

Wie bereits erwähnt, wurden die an Tag 84 explantierten K-Drähte halbiert. Diente die eine Hälfte zum Ausrollen auf BHI-Agarplatten, wurde die andere K-Draht-Hälfte in ein mit 10 ml PBS-Puffer gefülltes Greiner Röhrchen gebracht und daraufhin für 1 min lang mittels eines Vortex-Genie 2 (Fa. Scientific Industries, Inc., Bohemia) durchmischt. Anschließend wurde die Probe mit dem Ziel, den bakteriellen Biofilm, der sich auf dem Implantat angesiedelten Bakterien aufzubrechen, in ein Ultraschallbad (BactoSonic, Fa. BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin) überführt und dort für 5 min mit Ultraschallwellen (sogenanntes *sonikeiren*) behandelt. Das daraus entstandene sogenannte *Sonikat* (Verdünnung 0) wurde dann ebenfalls 1 min mit dem Vortex-Genie 2 durchmischt, bevor es in den Verhältnissen 1:10 und 1:100 verdünnt wurde. Für die Verdünnung 1:10 wurden 50 μ l der Verdünnung 0 in 450 μ l frischen PBS-Puffer pipettiert und durchmischt (Verdünnung 1). Aus Verdünnung 1 wurden erneut 50 μ l in 450 μ l frischen PBS-Puffer pipettiert und durchmischt, so dass eine Verdünnung von 1:100 (Verdünnung 2) entstand. Aus jeder der drei Verdünnungen (0,1,2) wurden daraufhin 50 μ l auf jeweils zwei BHI-Agarplatten auspipettiert und per Drigalskispatel ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 18 h bei 37° C wurde die Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien gezählt und pro Verdünnung der Mittelwert gebildet. Die so ermittelten Werte der Bakterienlast in CFUs pro Draht wurden mittels des Programms Sigmaplot 11.0 (Fa. Systat Software GmbH, Erkrath) in logarithmischer Form graphisch dargestellt.



Abbildung 11 Ultraschallbad BactoSonic im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Fa. BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin).

Neben dem Infektionsnachweis durch die Kolonisierung der explantierten K-Drähte wurde noch ein weiterer Aspekt für die mikrobiologische Auswertung herangezogen. Nachdem die steril entnommenen Tibiae mittels einer oszillierenden Säge median in zwei Hälften gespalten worden waren (Abb. 12 (a)), wurde die mediale Hälfte für die histologische Aufarbeitung vorbereitet, wohingegen der laterale Teil für die mikrobiologische Bestimmung der Bakterienlast in CFUs pro Gramm Knochenmark (CFUs/g *bone marrow*) genutzt wurde. Dafür wurde mit Hilfe eines scharfen Löffels der tibiale Markraum ausgeräumt und der so gewonnene Debris gewogen (Abb. 12 (a) und (b)).

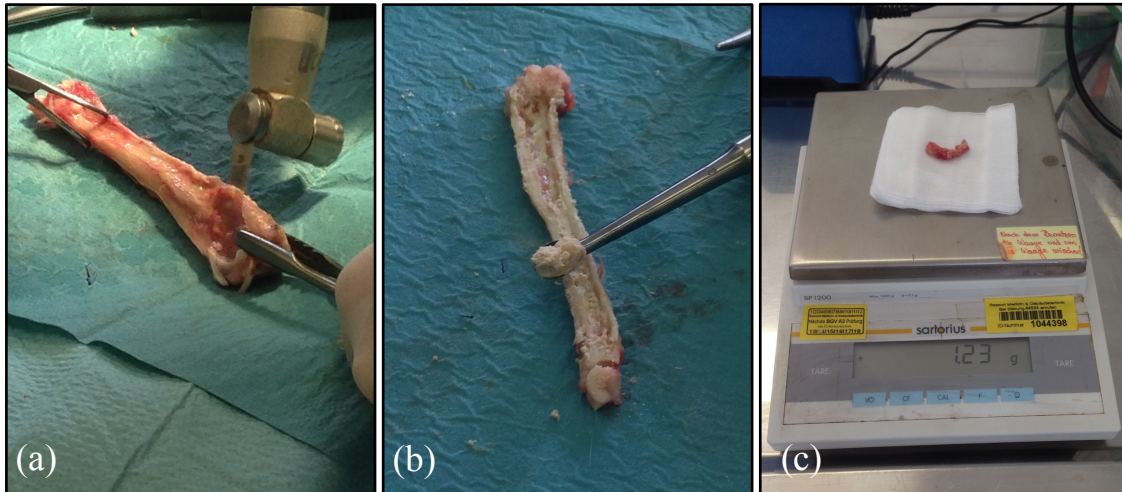


Abbildung 12 Spaltung einer steril entnommenen Tibia mittels oszillierender Säge (a). Ausschaben der lateralen Tibia-Hälfte zur Gewinnung von purulentem Knochenmark (roter Pfeil) zur Bestimmung der Bakterienlast (b). Wiegen des mittels scharfen Löffels gewonnenem Markrauminhalts (c) (Fa. Sartorius AG, Göttingen).

Das gewonnene Material wurde anschließend in ein mit 5 ml PBS gefülltes Greiner Röhrchen gefüllt und für 1 min mittels eines Vortex-Genie 2 (Fa. Scientific Industries, Inc., Bohemia) durchmischt (Verdünnung 0). Dieser so entstandenen Suspension wurden äquivalent zu den Arbeitsschritten der Bestimmung der CFUs/Draht, 50 μ l entnommen und in 450 μ l frischen PBS-Puffer pipettiert, wodurch ein Verdünnungsverhältnis von 1:10 (Verdünnung 1) entstand. Um ein Verdünnungsverhältnis von 1:100 zu erzeugen wurden 50 μ l aus Verdünnung 1 entnommen und in 450 μ l frischen PBS-Puffer pipettiert (Verdünnung 2). Aus allen drei Verdünnungen (0,1,2) wurden mittels einer Pipette 50 μ l entnommen und auf jeweils zwei BHI-Agarplatten auspipettiert und per Drigalskispatel ausplattiert. Auch hier wurde nach einer Inkubationszeit von 18 h bei 37° C die Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien gezählt und pro Verdünnung der Mittelwert gebildet. Um die Anzahl der CFUs pro Gramm entnommenem Knochenmark (CFUs/g *bone marrow*) zu erhalten, musste der ermittelte Mittelwert noch durch die anfänglich gewogene Masse dividiert werden. Anschließend konnten die so bestimmten Werte durch das Programm Sigmaplot 11.0 (Fa. Systat Software GmbH, Erkrath) in logarithmischer Form graphisch dargestellt werden.

2.2.8 Histologie

Für die histologische Auswertung wurden die medialen Hälften der Tibiae aufgearbeitet. Dazu wurden die steril entnommenen Tibiahälften für 4 Tage in 4 %iger Paraformaldehydlösung nach Lilli im Kühlschrank fixiert, bevor sie im nächsten Schritt entkalkt werden konnten. Für die Entkalkung der knöchernen Proben wurden diese für 40 Tage in EDTA-Lösung (3,4 % Tris-Base (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) + 10 % Triplex III (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) in Aqua dest. gelöst) eingelegt. Jeden zweiten Tag fand ein Wechsel der EDTA-Lösung statt. Nach erfolgreicher Entkalkung wurden die Proben für eine Stunde unter fließendem Leitungswasser abgespült. Zur kurzzeitigen Lagerung bis zur unmittelbaren Einbettung wurden die Proben in 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,2-7,4) im Kühlschrank untergebracht. Die Einbettung der Proben erfolgte mittels des Leica-Paraffin-Einbettautomaten TP 1050 (Fa. Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch) nach nachfolgendem Protokoll (Tab. 3).

Lösung	Dauer	Temperatur
70 % Ethanol	2.00 h	Raum Temperatur (RT)
80 % Ethanol	2.30 h	RT
96 % Ethanol	2.00 h	RT
100 % Ethanol	9.00 h	RT
Xylol	2.30 h	RT
Paraffin	2.00 h	58° C

Tabelle 3 Protokoll zur Paraffineinbettung mittels des Leica-Paraffin-Einbettautomaten TP1050

Der für die histologische Auswertung vorgesehene Interessenbereich wurde auf 15-20 mm messende Längsschnitte aus dem mittleren diaphysären Abschnitt der entnommenen medialen Tibiae festgelegt. Daraufhin wurden 5 µm dicke Längsschnitte von den Paraffinblöcken abgetragen und auf Objektträger aufgezogen. Zum Schneiden wurde ein Rotationsmikrotom der Fa. Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, genutzt. Für etwaige Nachfärbungen oder ein Tieferschneiden der Proben sowie zur Dokumentation wurden die Paraffinblöcke asserviert.

Zur Darstellung verschiedener Strukturen wurden folgende Färbungen genutzt: Hämalaun-Eosin (HE-Färbung), Toluidinblau O-Färbung (TB-Färbung), die Gram-Färbung und die TRAP-Färbung (Tartrat Resistente Saure Phosphatase). Die jeweiligen

Färbungen wurden anhand der nachfolgenden Protokolle im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Universitätsklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt (Tab.4, 5 und 6).

	<u>HE-Färbung</u>		<u>TB-Färbung</u>	
	Lösung	Dauer	Lösung	Dauer
Entparaffinieren	Xylol 1	5 min	Xylol 1	5 min
	Xylol2	5 min	Xylol2	5 min
Absteigende Alkoholreihe	100 % Ethanol	2-5 min	100 % Ethanol	2-5 min
	96 % Ethanol	2-5 min	96 % Ethanol	2-5 min
	70 % Ethanol	2-5 min	70 % Ethanol	2-5 min
	Aqua dest.	2-5 min	Aqua dest.	2-5 min
Färbung	Mayers Hämalan (Kernfärbung)	3-6 min	Toluidinblau O (1+1 mit Aqua dest.)	10 sec- 1 min
	Aqua dest.	abspülen		
	fließendes Leitungswasser	10 min		
	Aqua dest.	abspülen	Aqua dest.	abspülen
	1 % Eosinlösung (Bindegewebsfärbung)	30 sec-2 min		
	Aqua dest.	55 sec-1 min		
Aufsteigende Alkoholreihe	70 % Ethanol	2-5 min	70 % Ethanol	Ca. 1-2 min
	96 % Ethanol	2-5 min	96 % Ethanol	Ca. 1-2 min
	100 % Ethanol	Ca. 1-2 min	100 % Ethanol	Ca. 1-2 min
	Xylol 2	5 min	Xylol 1	5 min
	Xylol 2	5 min	Xylol 2	5 min
Eindeckeln mit DePex				

Tabelle 4 Färbeprotokolle HE- und TB-Färbung (alle Schritte bei RT)

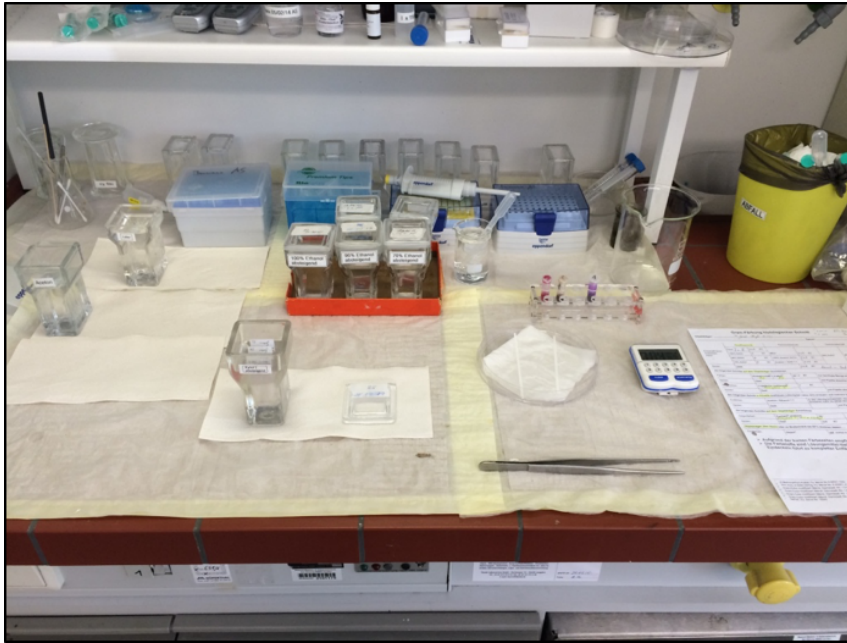


Abbildung 13 Arbeitsplatz unter einem Abzug zum Färben der Paraffin-Schnitte im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie Gießen. Zu sehen ist das Beispiel einer Gram-Färbereihe.

		<u>Gram-Färbung</u>	
		Lösung	Dauer
Entparaffinieren		Xylol 1	5 min
		Xylol2	5 min
		100 % Ethanol	5 min
		96 % Ethanol	5 min
		70 % Ethanol	5 min
		Aqua dest.	3 x 5 min
Färben		Kristallviolett + Puffer	30 sec
		Aqua dest.	spülen
Stabilisieren		Lugolsche Lösung	1 min
		Aqua dest.	spülen
Entfärben		Aceton/Ethanol 1:1	In der Lösung schwenken bis keine blauen Schlieren mehr zu sehen sind
		Aqua dest.	spülen
Gegenfärben		Fuchsin verdünnt	30 sec
		Aqua dest.	3 x 5 min
Objektträger über Nacht bei RT trocknen lassen			
Eindeckeln mit DePex			

Tabelle 5 Färbeprotokoll Gram-Färbung (alle Schritte bei RT)

TRAP-Färbung		
	Lösung	Dauer
Entparaffinieren	Xylol	2x 5min
	100 % Ethanol	5 min
	96 % Ethanol	5min
	70 % Ethanol	5min
	Aqua. Dest.	2x 5 min
Spülen	0,1 M Na-Acetatpuffer pH 5,2	10 min
Färben	Färbelösung 1 ¹ + Färbelösung 2 ²	12 min – 30 min (bis 2 h) in feuchter Kammer bei 37° C inkubieren
Spülen	Aqua. Dest	3x 5 min
Gegenfärben (Kernfärbung)	Hämatoxylin (filtrieren)	10 sec – 2 min
	Aqua. Dest	abspülen
	Leitungswasser	10 min
Spülen	Aqua. Dest.	5 min
Eindecklen	Kaisers Glyceringelantine (zuvor im Wasserbad verflüssigen)	

Tabelle 6 Färbeprotokoll TRAP-Färbung (Tartrat Resistente Saure Phosphatase) (alle Schritte, sofern nicht anders angegeben, bei RT). ¹ 35 mg Naphtol-AS-Phosphat gelöst in 125 µl N-N-Dimethylformamid. ² 57,5 mg Na-Tartrat gelöst in 1 ml 0,1M Na-Acetat pH 5,2, gemischt mit 35 mg Echtrotsalz gelöst in 1 ml 0,1M Na-Acetat pH 5,2

Ziel der unterschiedlichen Färbungen war die differenzierte Darstellung verschiedener Strukturen, um Infektionszeichen und deren Folgen veranschaulichen zu können. Durch die HE-Färbung wurden Zellkerne blau, Muskulatur rot, Bindegewebe hellrot und Erythrozyten leuchtend rot angefärbt. In der hier vorliegenden Arbeit diente sie zum Nachweis und zur Darstellung von zellreichen Gewebeformationen wie Entzündungs-, Abszess- und Granulationsgewebe. Durch die TB-Färbung wurde mineralisierte Hartgewebmatrix ungefärbt bis blassblau dargestellt, Zellen und Weichteile präsentierten sich unterschiedlich blau, Knorpelmatrix und Mastzellen metachromatisch rotviolett und verkalkte Knorpelmatrix dunkelblau. Aus diesem Grund wurde sie zur Darstellung und Bewertung chondrogener und ossärer Strukturen verwendet. Gramgefärbte Schnitte dienten in dieser Studie zur Darstellung und zum Nachweis von einzelnen oder in Haufen zusammenliegenden grampositiven, Koagulase-positiven *S. aureus* Bakterien. Als zusätzliche Färbemethode wurde die TRAP-Färbung angewandt. Durch sie wurden phagozitierende Zellen, im Speziellen Tartrat-resistente Osteoklasten

und Makrophagen, leuchtend rot angefärbt. Die Färbung sollte so zusätzlich die infektionsbedingten ossären Umbauvorgänge verdeutlichen und außerdem Makrophagen als Entzündungszellen aufzeigen.

Als histologische Zeichen einer Osteomyelitis wurden die folgenden Kriterien angesehen (Adler 2004, Lito 2015):

- **Auflockerung der kortikalen Knochenintegrität mit sub- und periostealer Knochenneubildung**
- **Knochennekroseherde mit Osteozyten- freien Knochenlakunen und Knochensequesterbildung**
- **Abszessformationen im Markraum oder in kortikalen Spalträumen**
- **Infiltration von Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen, mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen**
- **Nachweis von bakterieller Ansiedlung**

Zunächst wurden alle gefärbten Paraffin-Schnitte auf diese Osteomyelitis-Zeichen hin untersucht und beurteilt. Um nun eine individuelle Aussage bezüglich des Schweregrades einer potentiell vorliegenden Infektion für jedes Tier treffen zu können, wurde im Folgenden ein vereinfachter semiquantitativer Bewertungsscore für diese Studie entwickelt. Dieser Score entstand durch Vereinfachung und in Anlehnung an die von Smeltzer et al (1997) und Tiemann et al (2014) publizierten und etablierten Bewertungsscores. Dabei wurde jeder Färbung eines der oben genannten Bewertungskriterien zugeordnet. Diese Zuordnung wurde anhand der jeweiligen Färbecharakteristika der einzelnen Gewebe getroffen. Tabelle 7 zeigt die jeweilige Zuordnung.

<u>Färbung:</u>	HE-Färbung	TB-Färbung	Gram-Färbung
<u>Einteilungskriterium:</u>	Abszessformationen	Periostale Knochenneubildung	Bakterielle Ansiedlung

Tabelle 7 Zuordnung der Osteomyelitis Einteilungskriterien zu den entsprechenden Färbungen

Nun wurden die einzelnen Schnitte entsprechend der Tabelle 8 nach den Einteilungskriterien ausgewertet. Das konkrete Vorgehen hierbei wird in den

Abbildungen 14, 15 und 16 beschreiben. Jedem Kriterium wurde je nach Schwere des Vorkommens ein Wert von 0-3 zugeordnet (Tab. 8). Die Auswertung fand mit einem Axioshop 2 plus Mikroskop (Fa. Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, GER) im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen statt. Pro Tier und Färbung wurde je ein Schnitt ausgewertet.

Einteilungskriterien				
Periostale Knochenneubildung (TB-Färbung)	keine	einseitig wenig	einseitig viel, oder beidseitig wenig	beidseitig viel
Abszessformation (HE-Färbung)	keine	kleiner Abszess im Markraum <i>oder</i> kleine Abszessformationen in kortikalen Spalträumen	großer Abszess in Markraum <i>oder</i> kleiner Abszess im Markraum mit Abszessformationen in kortikalen Spalträumen	sehr großer Abszess im Markraum <i>oder</i> großer Abszess im Markraum und Abszessformationen in kortikalen Spalträumen
Bakterielle Ansiedlung (Gram-Färbung)	keine	über 1/3 der Fläche des Schnitts verteilt zu finden	über 2/3 der Fläche des Schnitts verteilt zu finden	über die gesamte Fläche des Schnitts verteilt zu finden
Wert	0	1	2	3

Tabelle 8 Einteilungskriterien für die einzelnen Färbungen anhand der Ausprägung des zu untersuchenden Parameters und die dazugehörige Werte-Zuordnung

Die so jedem Schnitt zugeteilten Werte wurden addiert und die Summe ergab die abschließende Beurteilung für das jeweilige Tier (Tab. 9).

	Keine Anzeichen einer Osteomyelitis	Schwache chronische Osteomyelitis	Manifeste chronische Osteomyelitis
Summe Einteilungskriterien	0-2	3-5	≥6

Tabelle 9 Abschließende Beurteilung entsprechend der Summe der einzelnen Einteilungskriterien

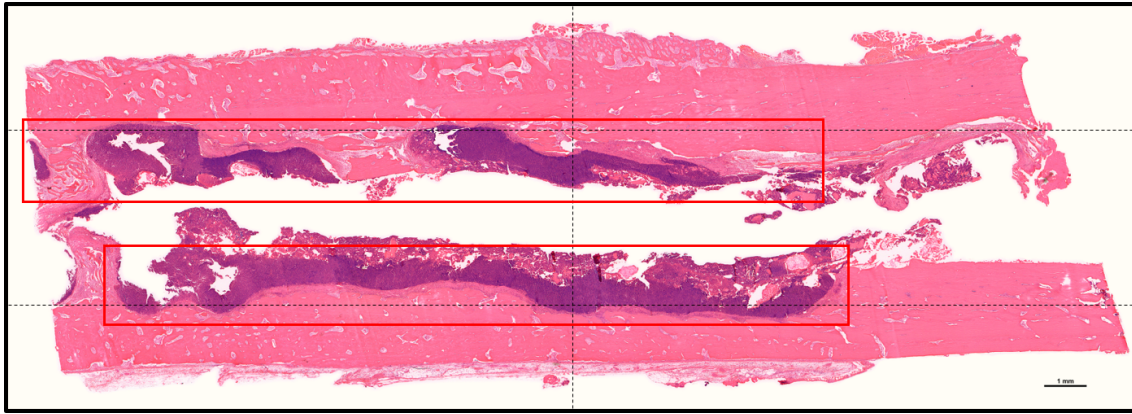


Abbildung 14 Übersichtsaufnahme HE, 2,5x. Einteilung der Schnitte mittels Hilfslinien in insgesamt sechs Sektoren. In Längsrichtung wurden die Schnitte halbiert, quer gedrittelt.

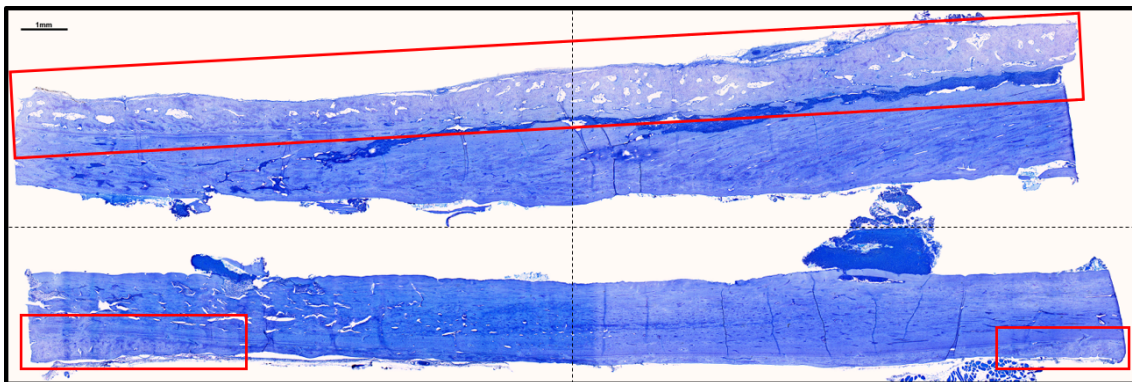


Abbildung 15 Übersichtsaufnahme TB, 2,5x. Einteilung der Schnitte mittels Hilfslinien in insgesamt vier Sektoren. Die Schnitte wurden jeweils in Längs- und Querausrichtung halbiert.

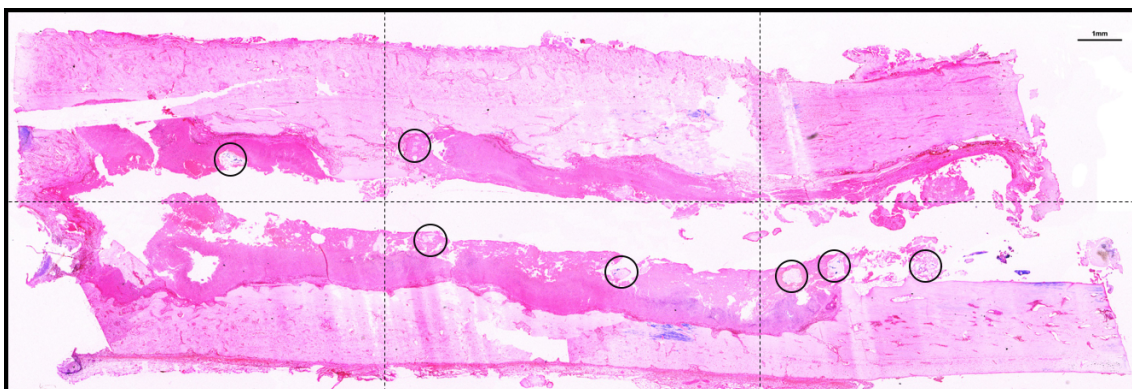


Abbildung 16 Übersichtsaufnahme Gram, 2,5x. Einteilung der Schnitte mittels Hilfslinien in insgesamt sechs Sektoren.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Begutachtung

Elf der zwölf Versuchstiere überlebten den gesamten Beobachtungszeitraum von 84 Tagen. Lediglich das Tier Nr. 6 (Gruppe II) musste am zehnten Tag nach der initialen Operation (Tag 0) aufgrund erheblicher Lahmheit, sehr schlechtem Allgemeinbefinden und fehlender Futteraufnahme im Rahmen der Abbruchkriterien euthanasiert werden (intrakardiale Injektion von T61 nach vorausgegangener Narkose mit Metomidin 0,25 mg/kg KG i.m. und Ketamin 10 % 35 mg/kg KG i.m.). Alle anderen Tiere wiesen die typischen Belastungsmerkmale einer langen Studiendauer mit hohem operativem Stress auf. Diese waren allerdings im ethisch vertretbaren Bereich der im *Scoresheet* festgelegten Kriterien. Dementsprechend konnte in diesem Versuchsvorhaben über den gesamten Zeitraum von 84 Tagen eine Überlebensrate von 91,7 % erzielt werden.

Im Folgenden soll im Einzelnen auf die klinische Situation an den jeweiligen Operationsterminen eingegangen werden. Während der ersten Revisionsoperation (Tag 28) präsentierten sich alle Tiere mit einer periartikulären Schwellung am linken Kniegelenk. Bei jedem der elf Tiere wurde ein deutlicher eitriger Ausfluss während des Debridements und der Spülung des tibialen Markraums festgestellt (Abb. 17 (b) und (c)). Beides wurde als klares Zeichen einer Infektion gewertet. Die OP-Narben an sich präsentierten sich reizfrei und gut verheilt (Abb. 17 (a)).

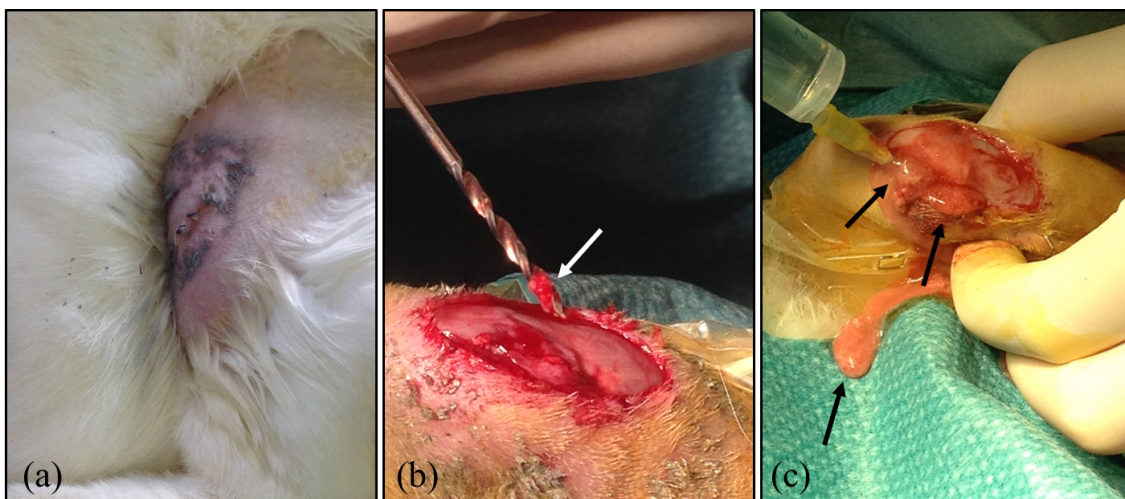


Abbildung 17 Klinische Beurteilung an Tag 28 (Revision 1, *Stage I*). Initiale OP-Narben mit Wundheilung per primam (a). Deutlich eitriger Debris (weißer Pfeil) (b), sowie massiver eitriger Ausfluss (schwarze Pfeile) (c) bei Spülung der Wunde.

Auch am zweiten Operationstermin (Tag 54) zeigten sich die OP-Narben aller Tiere unauffällig. Bei den Tieren Nr. 7 - III, 11 - III und 12 - IV wurde ein leichter subcutaner Abszess festgestellt, welcher intraoperativ saniert wurde. Kaninchen Nr. 8 - IV bot ein geschwollenes Kniegelenk, aus dem sich intraoperativ Pyarthros entleerte. Auch hier wurde eine Sanierung vorgenommen. Während der Spülung der tibialen Markräume entleerte sich erneut eitriger Ausfluss, der sich allerdings deutlich klarer als an Tag 28 präsentierte.

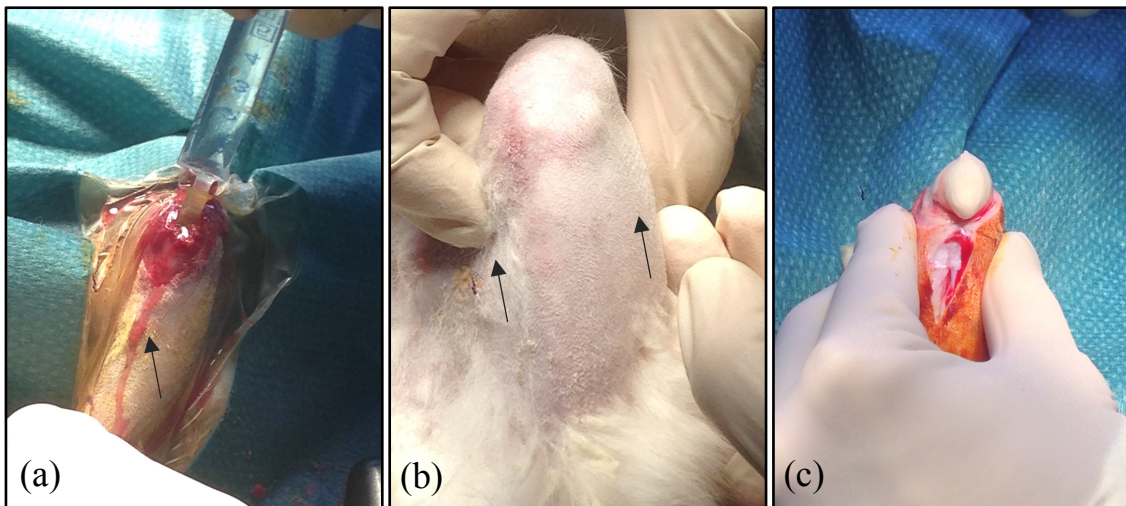


Abbildung 18 Klinische Beurteilung an Tag 54 (Revision 2, *Stage 2*). Leicht eitrig tingierte Spülflüssigkeit (Pfeil) (a). Deutlich klarer als an Tag 28 (vgl. Abb. 17 (c)). Subcutane, periartikuläre Kniegelenksschwellung (Pfeile) (b). Intraoperative Pyarthros-Entleerung aus Kniegelenk Tier Nr. 8 (c).

Deutliche Zeichen einer sich zum Endzeitpunkt des Versuchs etablierten Infektion ließen sich am letzten Operationstermin (Tag 84) feststellen. Fünf der elf Kaninchen (Tier Nr. 3 - III, 5 - I, 7 - III, 8 - IV und 11 - III) wiesen einen Gelenkerguss mit Kapselverdickung und Synovialitis sowie Pyarthrosenleerung auf. Das Tier Nr. 1-I litt unter einem Abszess mit Fistelgang von der distalen Unterschenkelmuskulatur bis in das angrenzende OSG. Darüber hinaus zeigte sich in allen elf eröffneten tibialen Markräumen ein purulentes Erscheinungsbild des Knochenmarks. Abbildung 21 zeigt beispielhaft die vorgefundenen Markräume mit zum Teil kompletter eitriger Umwandlung des Markrauminhalts. Makroskopisch konnte so zum Endzeitpunkt des Versuchsvorhabens auf eine chronifizierte Infektion geschlossen werden.

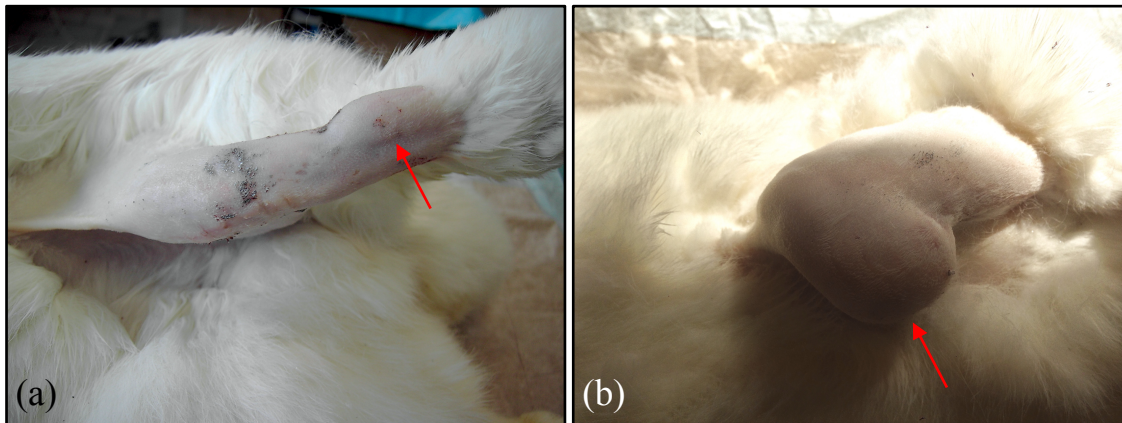


Abbildung 19 Präoperative klinische Beurteilung an Tag 84. Deutliche prätibiale Schwellung am operierten linken Hinterlauf (roter Pfeil) (a). Massive, ventral liegende periartikuläre Schwellung am operierten linken Hinterlauf (roter Pfeil) (b).

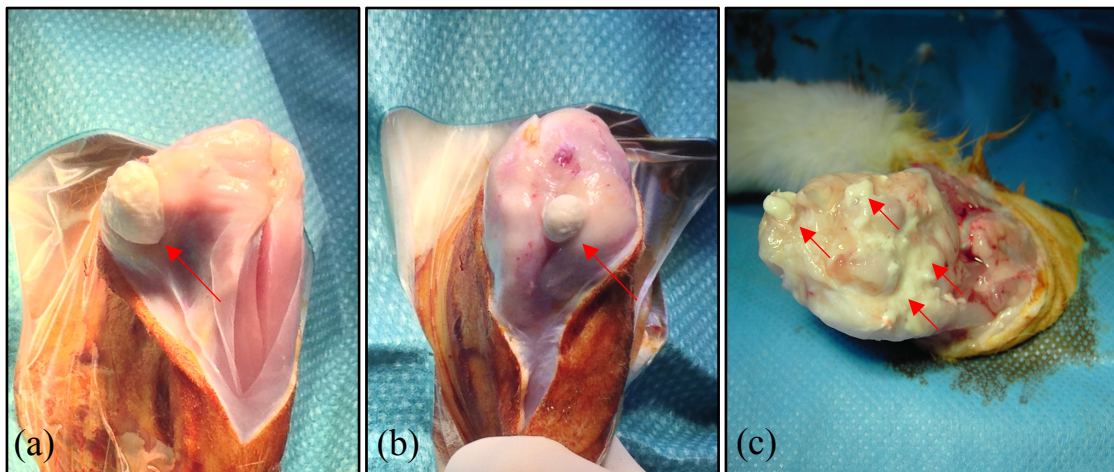


Abbildung 20 Intraoperative, klinische Kniegelenksbeurteilung an Tag 84. Massive Pyarthrosentleerung (roter Pfeil) im Bereich des medialen Kniegelenkes unter Mitbeteiligung der Muskulatur (a). Pyarthrosentleerung aus subcutaner Weichteilgewebeschicht oberhalb des Kniegelenkes (roter Pfeil) (b). Exartikulierter Hinterlauf mit Blick auf den proximalen Gelenkanteil (c). Deutlichen Eiterrauflagerungen (rote Pfeile) (c).

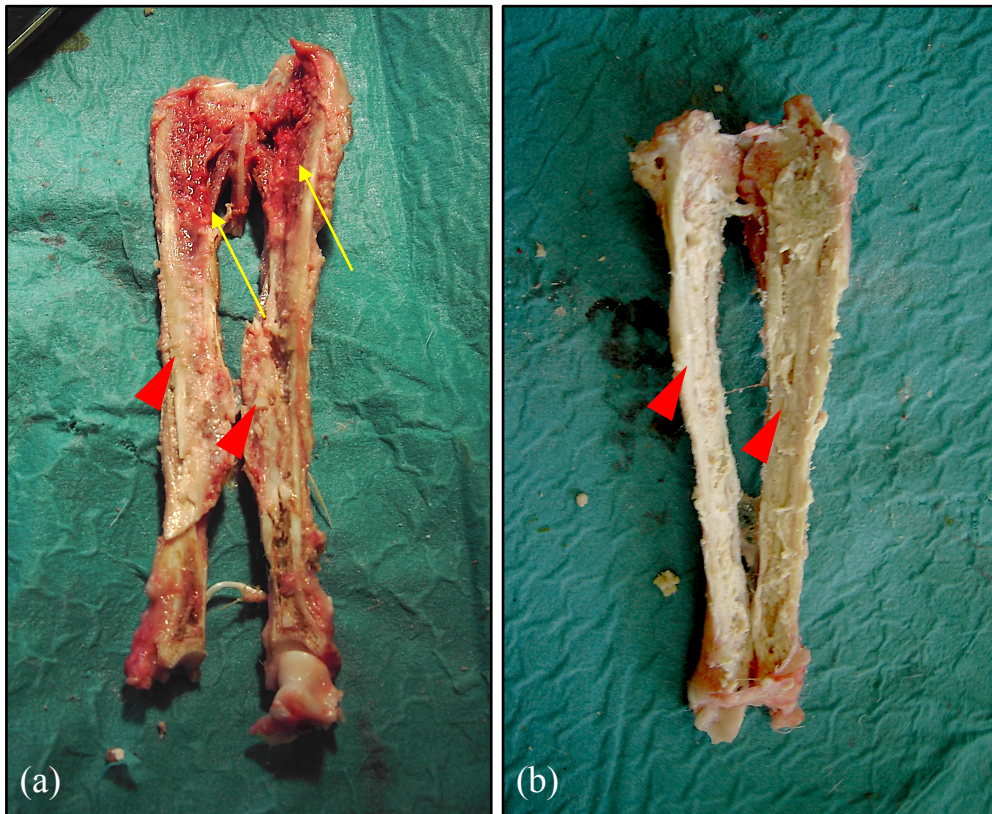


Abbildung 21 Klinische Beurteilung der gespaltenen Tibiae an Tag 84. Reste von rotem, infektfreiem Knochenmark im Meta- und Diaphysenbereich der proximalen Tibia (gelbe Pfeile). Dagegen im Diaphysenbereich purulentes Knochenmark als Zeichen einer Infektion (rote Pfeilköpfe) (a). Tibialer Markraum gänzlich mit infektbedingt purulentem Knochenmark gefüllt (rote Pfeilköpfe) (b).

3.2 Gewichtsentwicklung

Abbildung 22 zeigt die Körpergewichtsentwicklung der Versuchstiere über den gesamten Versuchszeitraum durch präoperative Gewichtskontrollen an den Tagen 0, 28, 54 und 84. Es wurde eine graphische Darstellung in Form von Liniendiagrammen gewählt. Aufgrund vorzeitiger Euthanasie wurde Tier Nr. 6 in keiner der Auswertungen berücksichtigt. Abbildung 22 (a) stellt die Gewichtsentwicklung für jedes Tier im Einzelnen dar. Die Abbildung 22 (b) zeigt das Gewicht der Tiere als arithmetischen Mittelwert pro Gruppe und Messzeitpunkt und die Abbildung 22 (c) das Gewicht aller Tiere als arithmetischen Mittelwert pro Messzeitpunkt.

Für die Gesamtheit der Versuchstiere konnte in dem Zeitraum von Tag 0-28 (Abb. 22 (c)), der die erste postoperative Phase nach Induktion der Infektion umfasst, eine signifikante Körpergewichtsreduktion festgestellt werden ($p < 0,0001$). Im Mittel verloren die Tiere 14 % ihres Ausgangsgewichts. Diese signifikante Gewichtsreduktion für das erste Messintervall zeigte sich ebenfalls in drei von vier einzeln betrachteten Gruppen.

Gruppe I ($p = 0,031$), III ($p = 0,0088$) und IV ($p = 0,0153$) erreichten einen Wert unterhalb des festgelegten Signifikanzniveaus von $p < 0,05$. Gruppe II lag mit einem Wert von $p = 0,0635$ lediglich geringfügig über diesem. Betrachtet man die graphisch dargestellte Gewichtsentwicklung der Gruppe II, zeigt sich allerdings eine identisch fallende Tendenz wie in den anderen Gruppen (Abb. 22 (b)). Darüber hinaus ist Gruppe II mit einem Gewichtsverlust von 18 % innerhalb der ersten 28 Tage diejenige Gruppe, deren Tiere im Mittel am stärksten an Gewicht verloren. Die fehlende Signifikanz für Gruppe II ist auf den Stichprobenumfang von $n = 2$ zurückzuführen. Obwohl sich für den restlichen Beobachtungszeitraum von Tag 28-84 im Großteil der Fälle eine Gewichtszunahme feststellen ließ (Abb. 22 (a) - (c)), war diese weder für die Gesamtheit der Tiere noch für eine einzeln betrachtete Gruppe signifikant. Das Körpergewicht stieg im Mittel für alle Tiere bis Tag 84 trotz zweier weiterer Operationen wieder um 4,2 % an.

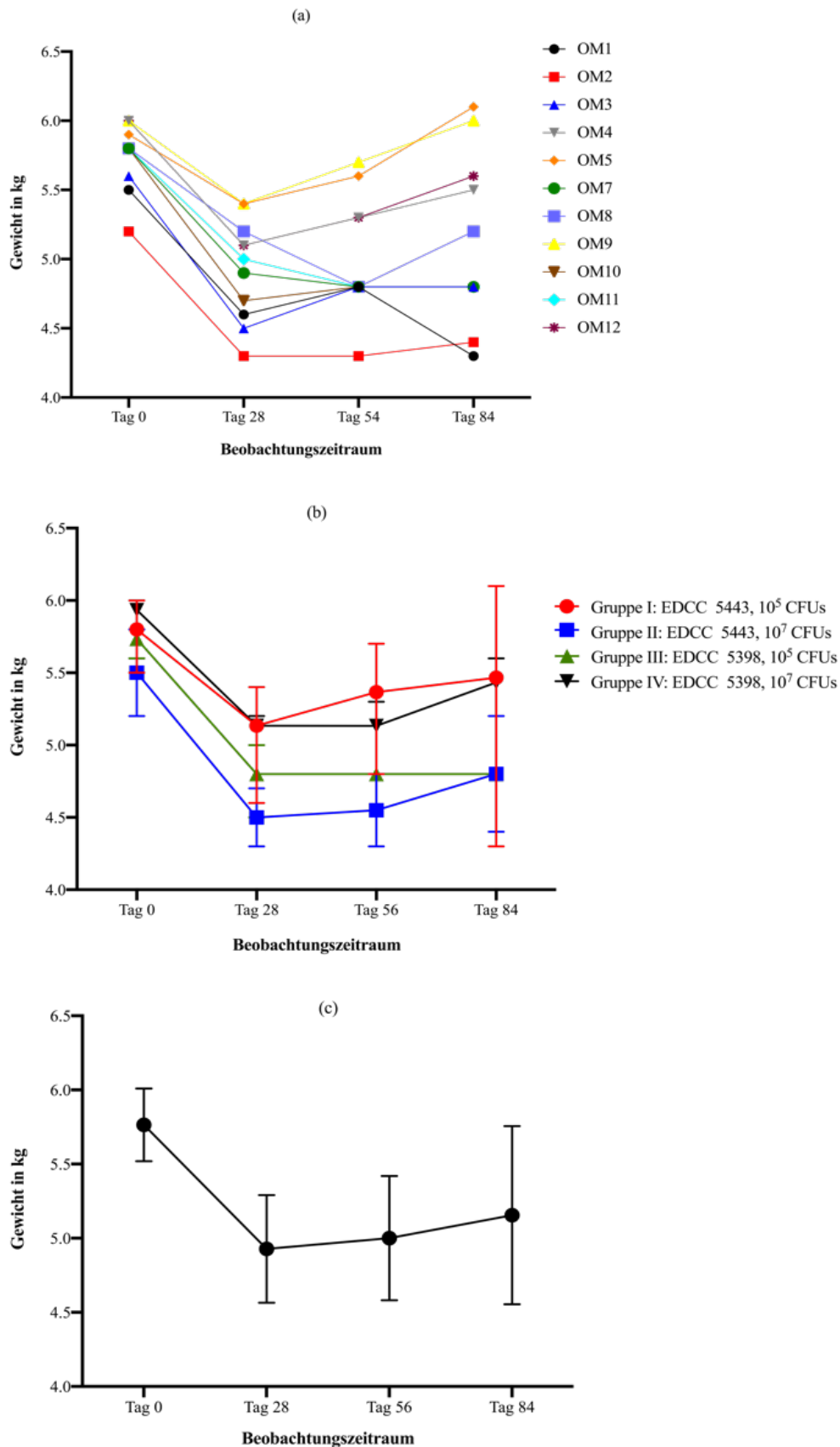


Abbildung 22 Körpergewichtsentwicklung für den Versuchszeitraum von 84 Tagen. Gewichtsentwicklung für jedes Tier im Einzelnen pro Messzeitpunkt (a). Gewicht der Tiere als arithmetischer Mittelwert pro Gruppe und Messzeitpunkt (b). Gewicht aller Tiere als arithmetischer Mittelwert pro Messzeitpunkt (c). (a), (b) und (c) jeweils ohne Berücksichtigung von Tier Nr. 6.

3.3 Radiologische Beurteilung am Tag der Euthanasie

Zehn der elf Kaninchen wiesen an Tag 84 radiologische Zeichen einer chronischen Osteomyelitis auf. Die Ausprägung der einzelnen Parameter lytische Läsionen und periostale Auftreibungen bzw. periostale Knochenneubildung ließ sich in verschiedenem Maße feststellen. Teilweise war die gesamte kortikale Integrität der Tibia aufgelockert, teilweise nur einzelne Abschnitte oder Sektionen. Ein einheitliches Bild nach qualitativen sowie quantitativen Überlegungen ergab sich innerhalb der einzelnen Gruppen nicht. So wiesen zwar alle Tiere der Gruppen II, III und IV radiologische Merkmale einer chronischen Osteomyelitis auf, dieses allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. In Gruppe I konnten bei Tier Nr. 5 keine radiologischen Hinweise auf eine Infektion gefunden werden konnten. Die Lage aller implantierter K-Drähte war regelgerecht im tibialen Markraum zu verorten. Keines der Implantate wies eine be- oder überlastungsbedingte Verformung oder einen Bruch auf.

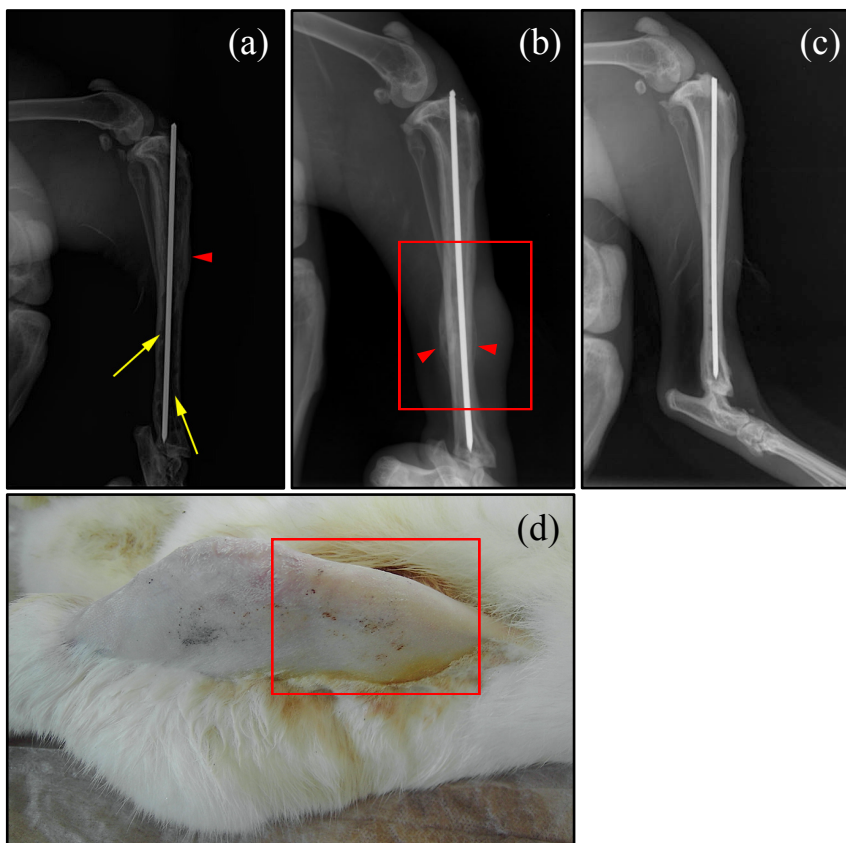


Abbildung 23 Radiologische Beurteilung an Tag 84. Deutliche Zeichen einer Osteomyelitis mit lytischen Läsionen (gelbe Pfeile) und perisotaler Knochenauftreibung bzw. peristaler Knochenneubildung (a). Massive kortikale Auftreibung (rote Pfeilköpfe) mit erkennbarer Weichteilschwellung (roter Kasten) (b). (d) zeigt das dazugehörige klinische Erscheinungsbild. Normwertige Röntgenkontrolle des Tieres ohne radiologische Zeichen einer Osteomyelitis (c).

3.4 Histologie

Die angefertigten Paraffinschnitte wiesen histomorphologisch zum Teil deutliche Zeichen eines chronischen Infektgeschehens im Sinne einer Osteomyelitis auf. Die entsprechenden Kriterien konnten anschaulich in den unterschiedlichen Färbungen dargestellt werden (Abb. 24–27).

Es ließen sich massive kortikale Osteolysen mit erheblichem Verlust der kortikalen Integrität finden (Abb. 24 (c) und (d), 27 (a), (b) und (c)). In der TRAP-Färbung konnte eindrucksvoll gezeigt werden, wie Osteoklasten für einen massiven „Knochenfraß“ im osteomyelitischen Knochen sorgen (Abb. 27 (b) und (d)). Dabei erstreckten sich in diesen Bereichen zum Teil enorme periosteale Knochenneubildungsabschnitte (Abb. 24 (c) und 27 (a)). Vereinzelt ließ sich dort sogar die notwendige Angiogenese mit der Ausbildung kleinster Gefäße detektieren (Abb. 24 (d)).

Periostale Knochenneubildung konnten auch an anderer Stelle bei noch intakter Kortikalis gefunden werden (Abb. 25 (a), (b) und (c)). Die ossären Veränderungen wurden zum Großteil durch Infiltration von Entzündungszellen wie Lymphozyten, Plasmazellen, vielkernige Riesenzellen und Makrophagen begleitet. Ein solches inflammatorisches Granulationsgewebe mit Abszessformationen wurde dabei unter anderem in kortikalen Spalträumen und in den tibialen Markräumen festgestellt (Abb. 24 (a)-(d)). Innerhalb der Markräume präsentierte es sich häufig mit Knochenmarksnekrosen, die mit einer massiven Ansammlung von Granulationsgewebe und Abszessformationen einhergeht. (Abb. 24 (a) und (b)). Auch Knochensequester in unterschiedlicher Größe fanden sich in diesen Markraumregionen (Abb. 24 (a), 25 (d) und 27 (c)), häufig mit engem räumlichen Bezug zur aufgehobenen kortikalen Integrität. Dabei versucht der entzündete Knochen, die einzelnen Sequester unmittelbar durch Osteoklasten abzubauen (Abb. 27 (c)).

Insbesondere in Bereichen mit nekrotischem Knochenmark und innerhalb Knochensequester- interner Spalträume konnten vermehrt Ansammlungen von in Haufen liegenden Bakterienkolonien ausgemacht werden (Abb. 26 (a)-(d)). Die kokkoiden Ansammlungen ließen sich also in den Bereichen finden, in denen das Gewebe bereits durch die vorliegende Infektion angegriffen und teilweise zerstört worden war.

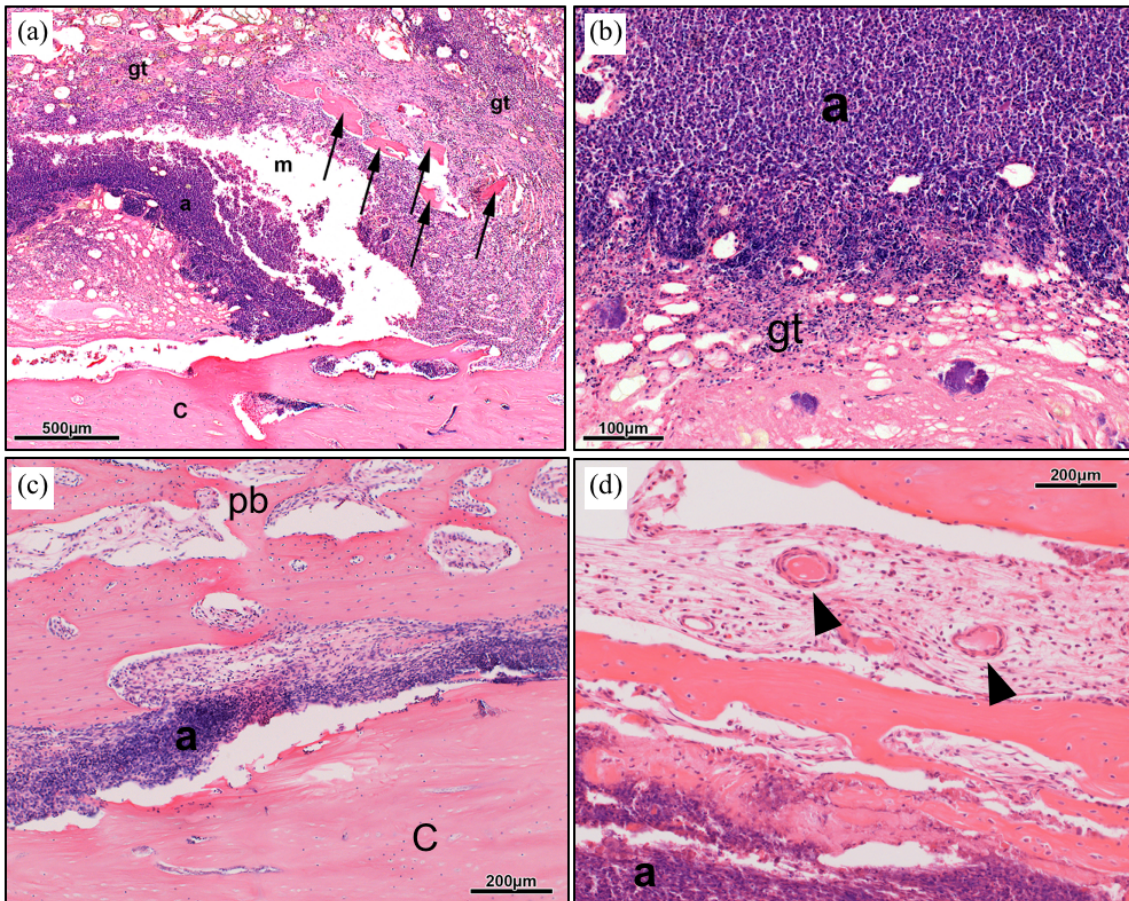


Abbildung 24 Histologische Analyse der an Tag 84 entnommen Tibiae in *HE* in verschiedenen Vergrößerungen. Es zeigen sich massive Ansammlungen von Abzessformationen (**a**) und Granulationsgewebe (**gt**) die sich teils im Markraum (a, b) und teils in kortikalen Spalträumen (c, d) befinden. Darüber hinaus lassen sich Knochensequester (a, Pfeile) und periostale Knochenneubildung (pb) nachweisen. In einzelnen Bereichen konnte Angiogenese (Pfeilköpfe) detektiert werden.

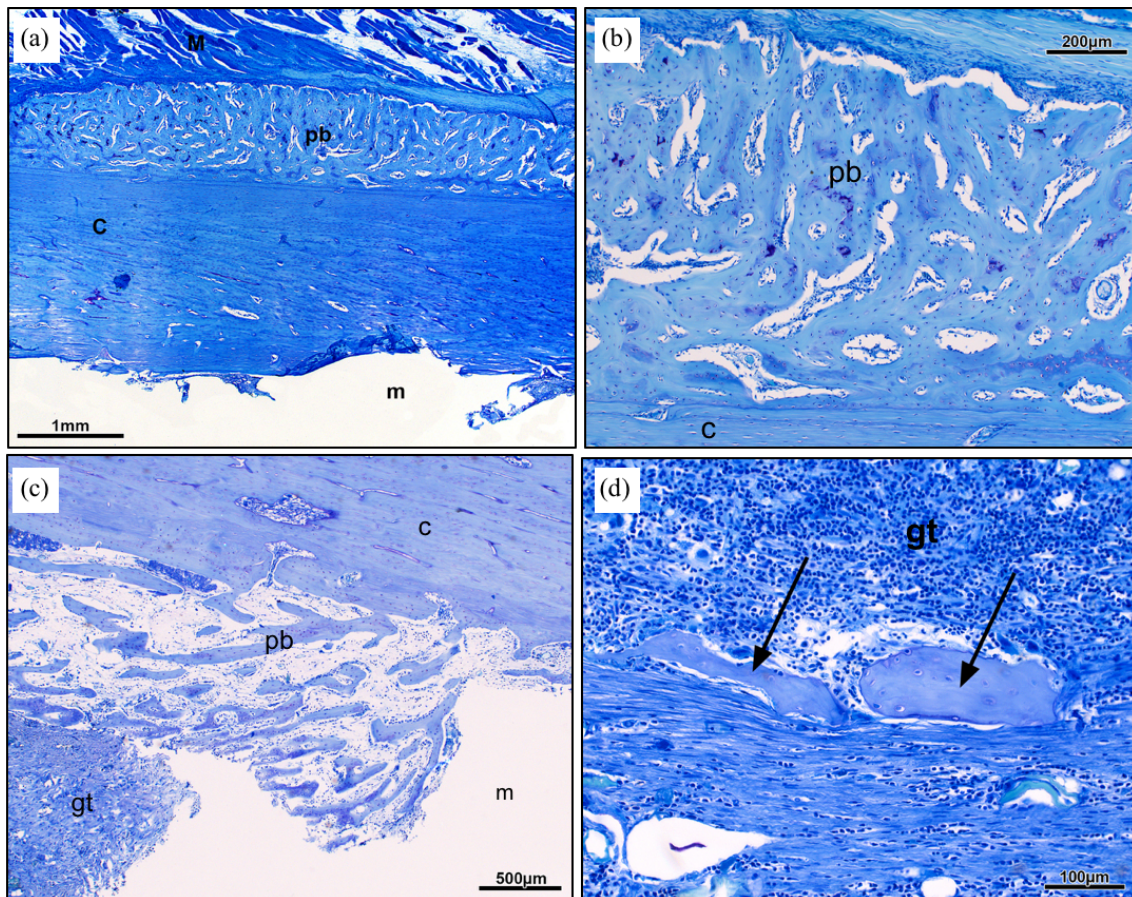


Abbildung 25 Histologisch Analyse der an Tag 84 entnommenen Tibiae in *TB* in verschiedenen Vergrößerungen. Es zeigen sich zum Teil langstreckige periostale Knochenneubildungen (pb), die sich entweder an der äußeren Kortikalis (C) in Verbindung zur umgebenden Muskulatur (M) (a, b) entwickelt haben oder in den Markraum (m) (c) reichen. Im Granulationsgewebe (gt) lassen sich eine Vielzahl von Knochensequestern (Pfeile) (d) finden.

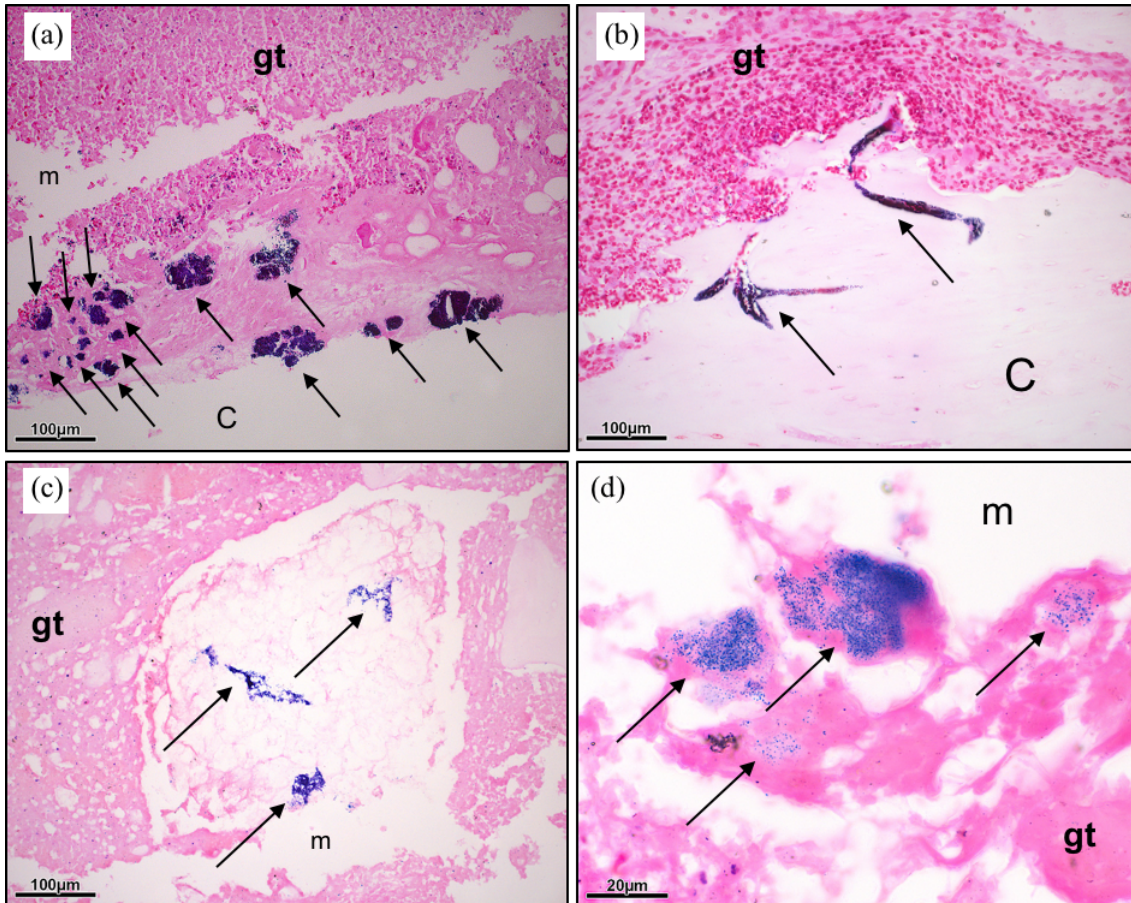


Abbildung 26 Histologisch Analyse der an Tag 84 entnommenen Tibiae in Gram-Färbung in verschiedenen Vergrößerungen. Kokkoide Ansammlungen von Bakterienformationen (Pfeile) finden sich besonders im mit Granulationsgewebe(gt) durchsetzten nekrotischen Knochenmark im Markraum (m) (a, c, d) und im Bereich ossärer Läsionen der destruierten Kortikalis (C) (b).

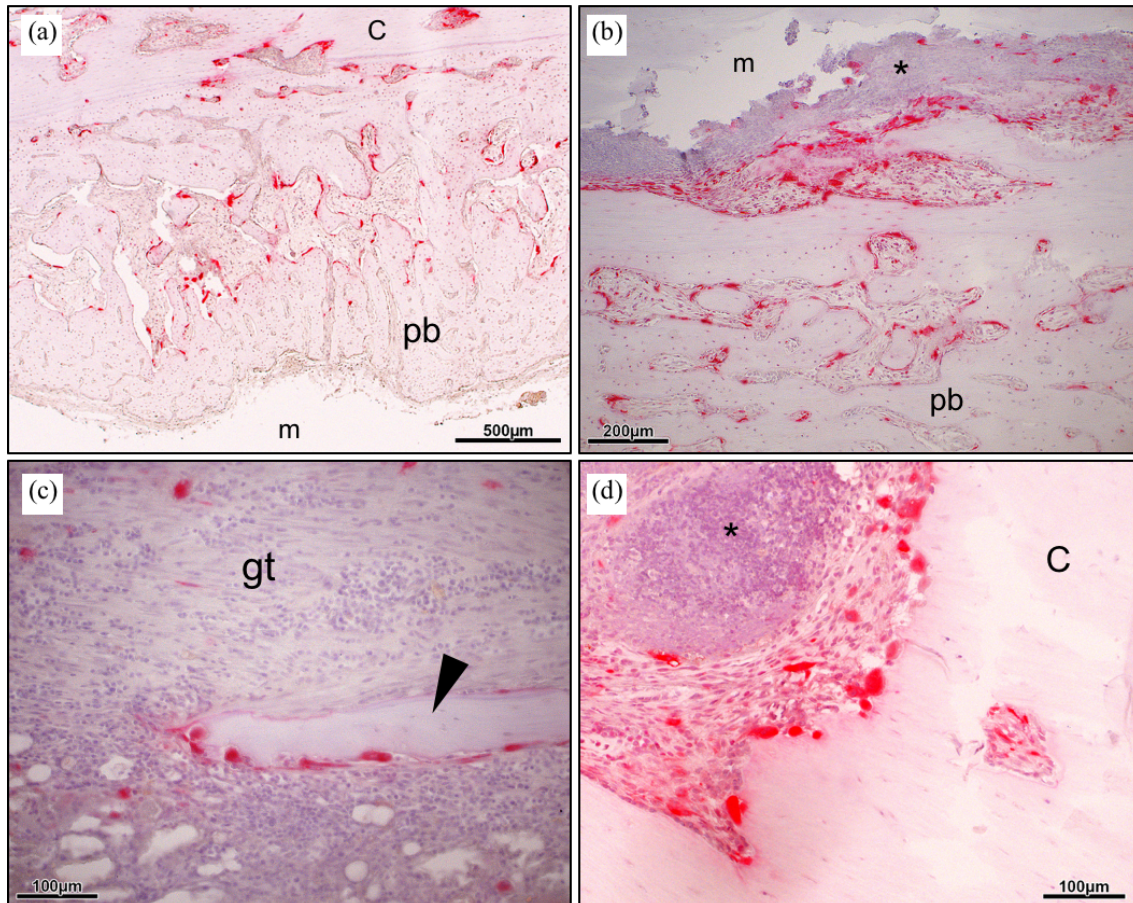


Abbildung 27 Histologisch Analyse der an Tag 84 entnommenen Tibiae in TRAP-Färbung in verschiedenen Vergrößerungen. Die in der TRAP-Färbung leuchtend rot angefärbten Tatrat-resistenten Makrophagen und Osteoklasten verweisen eindrucksvoll auf die stattfindenden Umbauprozesse im entzündeten Knochen. So lassen sie sich in großer Anzahl im Bereich der angegriffenen Kortikalis (C) (a,b, c) und der periostalen Knochenneubildung (pt) (a, b) finden. Außerdem sind sie für den Abbau von Knochensequester (Pfeilkopf) zuständig. Im Bereich der sich auflösenden kortikalen Integrität finden sich Abzessformationen (*) (b,d). m steht für Markraum.

Unter den ausgewerteten Paraffin-Schnitten gab es allerdings auch solche, die keine oder nur geringe Infektionszeichen aufwiesen. Im Folgenden wird auf die detaillierte Auswertung im Rahmen des für diese Studie entwickelten semiquantitativen Bewertungsscores eingegangen. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der histologischen Auswertung anhand des Scores. Es werden die für jedes Tier ermittelte Summe der Einzelkriterien und die sich daraus ergebende Einteilung des Schweregrads dargestellt. Wie sich bereits bei den anderen Auswertungsmethoden zeigte, lässt sich auch hier erneut ein variables und insgesamt uneinheitliches Bild innerhalb der einzelnen Gruppen finden. Lediglich in Gruppe II zeigte die Auswertung ein homogenes Ergebnis. Beide Tiere präsentierten histologisch keine ausreichenden Anzeichen, um von einer chronischen Osteomyelitis ausgehen zu können. In Gruppe III wiesen zwar alle Schnitte histomorphologische Hinweise auf eine chronische Osteomyelitis auf, doch ergaben sich

in der Summe Unterschiede in der Stärke der vorhandenen Entzündung. Für die Gruppen I und IV wurde ein komplett uneinheitliches Bild festgestellt.

Gruppe	Tier	Histologie an Tag 84	
		Summe Einzelkriterien	Ergebnis
I	1	9	Manifeste chronische Osteomyelitis
	5	0	Keine Anzeichen
	9	4	Schwache Osteomyelitis
II	2	2	Keine Anzeichen
	6	-	-
	10	1	Keine Anzeichen
III	3	5	Schwache Osteomyelitis
	7	7	Manifeste chronische Osteomyelitis
	11	6	Manifeste chronische Osteomyelitis
IV	4	8	Manifeste chronische Osteomyelitis
	8	2	Keine Anzeichen
	12	1	Keine Anzeichen

Tabelle 10 Ergebnisse des semiquantitativen Bewertungsscores

Vergleicht man die histologischen Ergebnisse mit den anderen Auswertungsmethoden, findet man keine einheitliche Korrelation. Zeigen beispielsweise alle Tiere aus Gruppe III histomorphologische Zeichen einer Osteomyelitis und dementsprechend einer Infektion, konnte mikrobiologisch für diese Gruppe lediglich eine Reinfektionsrate von 66 % festgestellt werden (Tab. 11). Auch innerhalb der anderen Gruppen und zwischen den anderen Auswertungsmethoden lassen sich Differenzen erkennen.

3.5 Mikrobiologie

Die mikrobiologische Auswertung der an Tag 28 entnommenen K-Drähte durch Ausrollen auf BHI-Agarplatten und nachfolgender Inkubation dieser ergab in allen Fällen (100 %) ein positives Kulturwachstum (Tab. 11). Zehn von elf BHI-Agarplatten wiesen eine starke Besiedelung auf, eine Platte eine leichte (Abb. 28 (*)). Für die an Tag 54 entnommenen *Spacer* konnte bei sieben von elf Implantaten ein Bakterienwachstum nachgewiesen werden (Tab. 11). Das Bild, welches sich hierbei bot, variierte deutlich stärker als das an Tag 28. So gab es drei starke Besiedelungen, vier leichte und viermal

keine. Diese Variation bezieht sich auch auf die gruppeninternen Ergebnisse. So fand sich nur bei den Implantaten/*Spacern* der beiden verbliebenen Tiere aus Gruppe II ein einheitliches Bild einer leichten Besiedelung. An Tag 84 wurden die an Tag 54 eingesetzten K-Drähte auf BHI-Platten ausgerollt. Hierbei ergab sich in neun von elf Fällen ein positives Kulturwachstum (Tab. 11 und Abb 28). Die gruppeninternen Variationen, welche bereits an Tag 54 festgestellt werden konnten, traten auch zu diesem Zeitpunkt wieder auf. Dabei gab es allerdings eine andere Verteilung, so dass sich nun ein einheitliches Bild in Gruppe I mit einer durchgehend leichten Besiedelung bot und Gruppe IV zumindest in allen Fällen ein positives, wenn auch unterschiedlich starkes Wachstum zeigte.

<u>Gruppe</u>	Tier Nr.	Besiedelung	Tag 28	Besiedelung	Tag 56	Besiedelung	Tag 84
I	1	++	100%	++	33%	+	100%
	5	++		0		+	
	9	+		0		+	
II	2	++	100%	+	100%	0	50%
	6	-		-		-	
	10	++		+		+	
III	3	++	100%	0	66%	0	66%
	7	++		+		++	
	11	++		++		++	
IV	4	++	100%	++	66%	++	100%
	8	++		++		++	
	12	++		0		+	

Tabelle 11 Roll-Out-Ergebnisse an den Tagen 28, 54 und 84

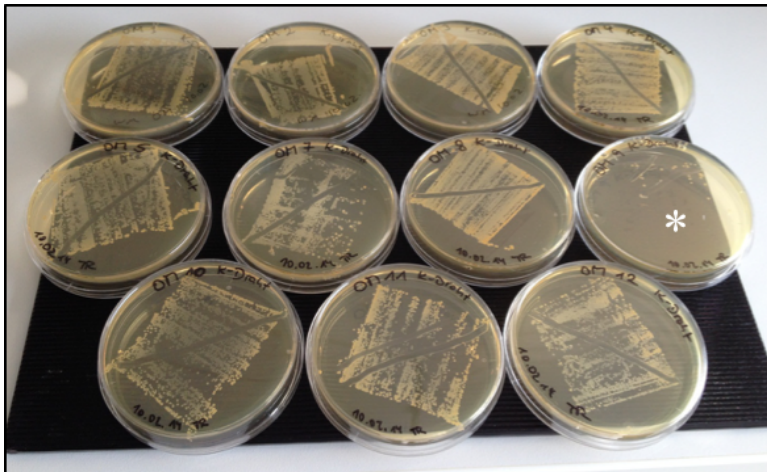


Abbildung 28 Bebrütete BHI-Agarplatten nach Ausrollen der initial implantierten K-Drähte an Tag 28. Lediglich OM 9 (*) zeigt eine leichte Besiedelung, wohin gegen alle anderen BHI-Agarplatten stark besiedelt sind.

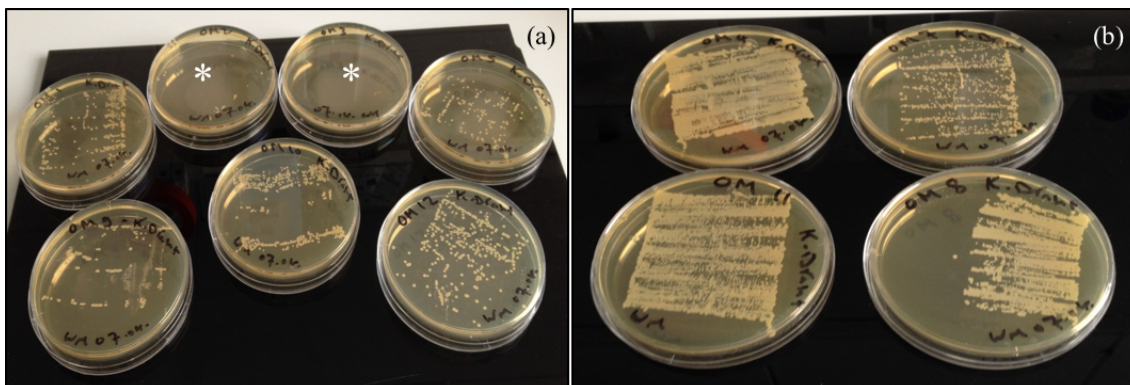


Abbildung 29 Bebrütete BHI-Agarplatten nach Ausrollen der erneut implantierten K-Drähte an Tag 84. Zwei Platten weisen kein Wachstum auf ((a)(*)), die restlichen eine leichte (a) bis starke (b) Besiedelung.

Neben dem sogenannten Roll-Out der einzelnen K-Drähte wurde außerdem die Anzahl der CFUs pro g Knochenmark und pro Draht an Tag 84 durch *Sonication* und Ausplattieren des Knochenmarkinhaltes bestimmt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind grafisch in Abbildung 30 dargestellt. Dabei fällt auf, dass die mikrobiologischen Ergebnisse der Tiere Nr. 4-IV, 8-IV und 11-III untereinander korrelieren. So weisen alle drei Tiere an Tag 84 in allen mikrobiologischen Auswertungsmethoden einen hohen Wert an CFUs auf. Ebenso zeigen die Ergebnisse von Tier Nr. 7-III ein nahezu einheitliches Bild. Allerdings ergibt sich erneut ein variierendes Bild innerhalb der einzelnen Gruppen. So kann in keiner Gruppe ein einheitliches Verhalten der CFU-Last durch die Bestimmung der *Bacterial Load* des Knochenmarkes und der *Sonication* festgestellt werden.

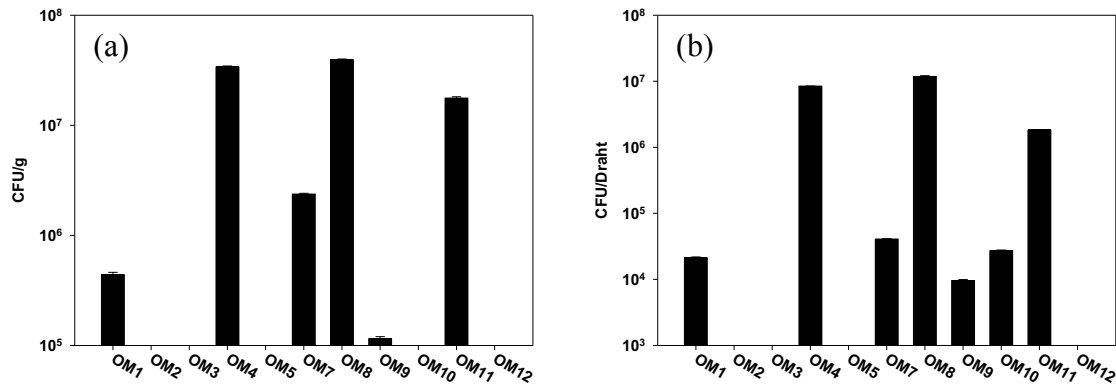


Abbildung 30 Grafische Darstellung der CFUs pro Gramm Knochenmark (a) und pro K-Draht (b) an Tag 84 des Versuchsvorhabens.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das in dieser Studie vorgestellte Tiermodell zur Simulation einer *Two-Stage-Revision Procedure* bei Implantat-assoziierten MRSA Infektionen führt zu einer hohen Überlebensrate mit klinisch eindeutigen Zeichen einer Infektchronifizierung nach 84 Tagen. Trotz des langen Versuchszeitraums von vier Monaten mit hohem operativem Stress unter anspruchsvoller Operationstechnik und großer infektiöser Belastung konnte eine Überlebensrate von 91,7 % erzielt werden. Lediglich ein Tier musste aufgrund erheblicher Lahmheit, sehr schlechtem Allgemeinbefinden und fehlender Futteraufnahme vorzeitig euthanasiert werden. Die induzierte Infektion beschränkte sich stets auf die operierte Extremität, ohne dass gravierende systemische Komplikationen bei den Tieren beobachtet wurden. Das klinische Erscheinungsbild innerhalb der ersten 28 Tage korreliert mit der tierlichen Körpergewichtsentwicklung. Die deutliche Gewichtsreduktion der Tiere sowie eine leicht verringerte Futteraufnahme und eine teilweise eingeschränkte Aktivität bei verminderter Reaktion sprechen für eine erfolgreiche Induktion einer akuten Infektion. Dies wird durch die mikrobiologischen Ergebnisse an Tag 28 bestätigt. Es wurden für jede Gruppe Infektionsraten von 100 % erzielt. Durch Debridement und Spülung des tibialen Markraums während der Revision 1 (*Stage 1*) an Tag 28, sowie die Implantierung eines mit Vancomycin beladenen PMMA-*Spacers* konnte die Infektion bis zum Tag 54 teilweise eradiziert werden. Das Maximum lag dabei bei einer Rate von 66 % in Gruppe I. Klinisch erholten sich die Tiere ab Tag 28 allmählich. Die negative Körpergewichtsentwicklung der Kaninchen konnte gestoppt werden und das an Tag 54 (Revision 2, *Stage 2*) während der Operation durchgeführte

Debridement und die Spülung brachten weniger eitrig tingierten Ausfluss hervor. Für die Ergebnisse an Tag 84 zum Ende des Versuchsvorhabens ergab sich ein variables Bild. Zeigten sich klinisch bei allen Tieren zum Teil deutliche Infektionszeichen, konnte diese Eindeutigkeit nicht pauschal auf die anderen Auswertungsmethoden übertragen werden. So ergaben sich innerhalb der einzelnen Gruppen teilweise klare Ergebnisunterscheide pro Methode. Auch konnten teilweise unterschiedliche Ergebnisse pro Tier und Methode festgestellt werden. Betrachtet man die Auswertungsmethoden an Tag 84 in ihrer Gesamtheit lässt sich feststellen, dass es vor allem offensichtliche klinische und gewichtsbedingte Hinweise auf eine Chronifizierung der primär an Tag 0 induzierten Infektion gibt. Dies ist für alle Gruppen anzunehmen. Auch die Tatsache, dass bei zehn von elf Tieren radiologische Zeichen einer chronischen Osteomyelitis festgestellt werden konnten, unterstützt diese Ergebnisse. Mikrobiologisch konnten durch das Roll-Out der K-Drähte in den Gruppen I und IV Reinfektionsraten von 100 % bestätigt werden. Gruppe II und III hingegen wiesen Reinfektionsraten von 50 % und 66 % auf. Vergleicht man die mikrobiologischen Ergebnisse des Roll-Outs mit den anhand des semiquantitativen Bewertungsscores ermittelten histologischen Ergebnissen, zeigen sich für jede Gruppe unterschiedliche Ergebnisse. So ließ sich lediglich in Gruppe III histologisch bei allen Tieren Zeichen einer chronischen Osteomyelitis feststellen. Gruppe I zeigte in 66 % der Fälle chronische Osteomyelitiszeichen, Gruppe IV in 33 % und Gruppe II in 0 %.

Die bakterielle Belastung des Knochenmarks (1×10^5 CFU/g bis 5×10^7 CFU/g und 1×10^4 CFU/g) und der K-Drähte (*Sonication*) (1×10^4 CFU/wire bis 1×10^7 CFU/wire) an Tag 84 weisen untereinander nahezu übereinstimmende Ergebnisse auf. So lässt sich nur bei einem Tier der Gruppe II eine Abweichung feststellen. Bei diesem konnte im Knochenmark kein positiver Nachweis erbracht werden, wohingegen die *Sonication* eine bakterielle Belastung des K-Drahtes zeigte. Im Vergleich zu den anderen Auswertungsmethoden zeigt sich besonders zum Roll-Out bei den stark belasteten Proben eine komplette Übereinstimmung.

Gruppe	Tier Nr.	Mikrobiologie								Klinische Beurteilung		
		Roll out					Bone Marrow Content (in CFU/g)	Sonication (in CFU/Draht)	Revision 1	Revision 2	Final Evaluation	
		Revision 1	Revision 1 – K-Draht Besiedlung	Revision 2 (Spacer)	Revision 2 – Eradikationsrate	Final Evaluation	Final Evaluation – Reinfektionsrate	Final Evaluation				Final Evaluation
I - EDCC 5443 10 ⁵	1	++		++		+		5x10 ⁵	3x10 ⁴	ausgeprägte lokale Infektion	leichte lokale Infektion	Abszess + Fistel
	5	++	100%	0	66%	+	100%	0	0	ausgeprägte lokale Infektion	leichte lokale Infektion	Pyathros
	9	+		0		+		1x10 ⁵	1x10 ⁴	ausgeprägte lokale Infektion	leichte lokale Infektion	purulenter Markraum
II - EDCC 5443 10 ⁷	2	++		+		0		0	0	ausgeprägte lokale Infektion	leichte lokale Infektion	purulenter Markraum
	6	-	100%	-	0%	-	50%	-	-	-	-	-
	10	++		+		+		0	5x10 ⁴	ausgeprägte lokale Infektion	leichte lokale Infektion	purulenter Markraum
III - EDCC 5398 10 ⁵	3	++		0		0		0	0	ausgeprägte lokale Infektion	leichte lokale Infektion	Pyathros
	7	++	100%	+	33%	++	66%	5x10 ⁶	6x10 ⁴	ausgeprägte lokale Infektion	leichte lokale Infektion + subkutaner Abszess	Pyathros
	11	++		++		++		2x10 ⁷	5x10 ⁶	ausgeprägte lokale Infektion	leichte lokale Infektion + subkutaner Abszess	Pyathros
IV - EDCC 5398 10 ⁷	4	++		+		++		5x10 ⁷	1x10 ⁷	ausgeprägte lokale Infektion	leichte lokale Infektion	purulenter Markraum
	8	++	100%	++	33%	++	100%	5x10 ⁷	1x10 ⁷	ausgeprägte lokale Infektion	Pyathros	Pyathros
	12	++		0		+		0	0	ausgeprägte lokale Infektion	leichte lokale Infektion + subkutaner Abszess	purulenter Markraum
Gruppe	Tier Nr.	Gewicht (in kg)				Histologie				Radiologie		
		Initial Surgery	Revision 1	Revision 2	Final Evaluation	Abzessformation	Periostale Knochenneubildung	Bakterienansiedlungen	Summe	Lytische Läsionen	Periostale Knochenneubildung	
						Final Evaluation	Final Evaluation	Final Evaluation		Final Evaluation	Final Evaluation	
I - EDCC 5443 10 ⁵	1	5,5	4,6	4,8	4,3	3	3	3	9 = manifeste chronische Osteomyelitis	ja	ja	
	5	5,9	5,4	5,6	6,1	0	0	0	0 = keine Osteomyelitis	nein	nein	
	9	6	5,4	5,7	6	1	3	0	4 = schwache Osteomyelitis	ja	ja	
II - EDCC 5443 10 ⁷	2	5,2	4,3	4,3	4,4	0	2	0	2 = keine Osteomyelitis	ja	ja	
	6	5,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	10	5,8	4,7	4,8	5,2	0	1	0	1 = keine Osteomyelitis	ja	ja	
III - EDCC 5398 10 ⁵	3	5,6	4,5	4,8	4,8	2	3	0	5 = schwache Osteomyelitis	ja	ja	
	7	5,8	4,9	4,8	4,8	3	2	2	7 = manifeste chronische Osteomyelitis	ja	ja	
	11	5,8	5	4,8	4,8	2	2	2	6 = manifeste chronische Osteomyelitis	ja	ja	
IV - EDCC 5398 10 ⁷	4	6	5,1	5,3	5,5	3	3	2	8 = manifeste chronische Osteomyelitis	ja	ja	
	8	5,8	5,2	4,8	5,2	1	0	1	2 = keine Osteomyelitis	ja	ja	
	12	6	5,1	5,3	5,6	0	0	1	1 = keine Osteomyelitis	ja	ja	

Tabelle 12 Zusammenfassung aller erhobenen Ergebnisse des Versuchsvorhabens

4 Diskussion

4.1 Grundlegendes

Die moderne Medizin bietet einem Großteil der Menschheit herausragende Möglichkeiten, um ihr alltägliches Leben trotz Krankheit problemlos oder zumindest deutlich angenehmer zu gestalten. Ein Teil hierzu tragen unter anderem die Orthopädie und Traumatologie bei. In den letzten knapp 100 Jahren wurden auf diesem Gebiet enorme Entwicklungen vorgenommen, die mitunter zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität der Patienten oder zu einer Rückführung ins normale Leben führten. Hierzu zählen unter anderem der künstliche Gelenkersatz oder auch die gezielte Frakturheilung durch Osteosyntheseverfahren. So wird der totale Hüftgelenkersatz mitunter als *Die Operation des zwanzigsten Jahrhunderts* (Learmonth et al 2007) betitelt und die Patientenzufriedenheit nach endoprothetischen Eingriffen ist mit 80 bis 100% im Allgemeinen sehr hoch (Kahlenberg et al 2018, Robertson et al 2000). Darüber hinaus kann die gezielte Endoprothetik trotz initial hoher Kosten eine deutliche Entlastung der Gesundheitssysteme erbringen, da sich die Folgeausgaben deutlich reduzieren (Koenig et al 2016, Ruiz et al 2013).

Kommt es allerdings zu einer Infektion des genutzten Implantats, so stellt dies eine besondere Herausforderung für alle beteiligten Personen dar. Neben dem Patienten, dem im schlimmsten Falle erhebliche Folgen für sein weiteres Leben drohen, sind auch die behandelnden Ärzte und Institutionen mit einem hohen Ressourcenaufwand in die Therapie eingespannt (Malizos 2017). Die Problematik wird insbesondere dann verstärkt, wenn die Infektion einen schwer behandelbaren Erreger wie MRSA als Ursache aufweist. Tritt eine solche Implantat-assoziierte MRSA Infektion auf, gilt als derzeitiger Therapiestandard noch immer der zweizeitige Prothesenwechsel mit Implantatausbau, ausgiebigem Debridement, *Spacer*implantation und Implantatreimplantation zu einem späteren Zeitpunkt (Cooper & Della Valle 2013, Metsmakers et al 2018). Aufgrund der zugrundeliegenden Pathogenese mit Biofilmbildung und Antibiotikaresistenz weisen Therapieveruche Implantat-assoziiierter MRSA Infektionen allerdings ein deutlich schlechteres Resultat mit relativ höherer Versagensrate (*failed revision*) als diejenigen Infektionen auf, die durch normsensitive Erreger hervorgerufen wurden (Cochran et al 2016, Kilgus et al 2002). Das Risiko einer Amputation oder einer dauerhaften Entfernung

ohne Wiedereinsetzen eines neuen Implantats ist hoch. Der Verlust an gesundheitsbezogener Lebensqualität des Patienten ist signifikant.

Die Medizin ist daher auf präklinische Modelle angewiesen, die die aktuelle klinische Situation möglichst realitätsnah simulieren um neue Behandlungsstrategien entwickeln zu können. Hierzu zählen noch immer Tiermodelle, auch wenn diese im Sinne der 3R Prinzipien auf ein Minimum reduziert werden sollten (Griffin et al 2014, Russell & Burch 1959, Zurlo et al 1996).

Moriarty et al (2017) haben ein Großtiermodell entwickelt, welches eine *failed Two-Stage-Revision Procedure* für MRSA assoziierte Implantatinfektionen simuliert. Zu Beginn der Arbeit für diese Studie war jedoch noch kein Kleintiermodell etabliert, welches ein zweistufiges Revisionsverfahren im Sinne einer *failed revision* geeignet nachahmt (Reizer et al 2015). Kleintiermodelle sind kostengünstiger, logistisch leichter umzusetzen und können so als Vorbereitung für mögliche Großtiermodelle bzw. generell als gut umsetzbare *in vivo* Modelle dienen.

Daher war das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit die Etablierung eines neuen Kleintiermodells zur Simulation eines zweizeitigen Prothesenwechsels bei Implantat-assoziierten MRSA-Infektionen im Sinne einer *failed revision* um weitere *in vivo*-Tests zu ermöglichen und so neue Strategien im Kampf gegen MRSA-bedingter PJIs zu entwickeln. Dafür wurde ein bereits von Alt et al (2006) bestehendes Infektionsmodell weiterentwickelt, in welchem eine implantatbezogene Osteomyelitis innerhalb von vier Wochen zuverlässig etabliert werden konnte. Hauptaugenmerk lag dabei unter anderem auf der Frage, ob das gewählte Studiendesign für die Tiere ethisch vertretbar ist.

Sekundärziel war die Identifikation des optimalen Erregerstammes und der optimalen Inokulationsdosis zur sicheren Etablierung einer Reinfektion. Hierzu wurden zwei unterschiedliche MRSA-Stämme (EDCC 5398 - Eugen Domann Culture Collection Nr. 5398, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen und EDCC 5443 -Eugen Domann Culture Collection Nr. 5443, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen) in je zwei unterschiedlichen Inokulationsdosen (10^5 und 10^7 CFUs) getestet.

4.2 Entwickeltes Tiermodell und erzielte Ergebnisse

Wissenschaftliches Arbeiten mit Tieren unterliegt bestimmten Voraussetzungen und ist sowohl gesetzlich (Dt. Tierschutzgesetz vom 18. Mai 2006) als auch ethisch an gewisse

Regeln gebunden, die den Schutz der Tiere zum Ziel haben. 1959 veröffentlichten William Russel und Rex Burch in ihrem Buch *The Principles of Humane Experimental Technique* (Russell & Burch 1959) grundlegende Überlegungen und Verhaltensanweisungen, wie auf ethische Art und Weise mit Versuchstieren umzugehen sei. Dabei standen drei Punkte, die sogenannten *3Rs*, im Mittelpunkt. Diese gelten bis heute (Griffin et al 2014, Zurlo et al 1996). Es sind: Ersatz (engl. *Replacement*), Reduzierung (engl. *Reduction*) und Verfeinerung (engl. *Refinement*). Anhand dieser Handlungsanweisung soll gewährleistet werden, dass lediglich die notwendigste Anzahl an Versuchstieren unter ethisch vertretbaren Bedingungen für wissenschaftliche Zwecke genutzt und eine stetige Entwicklung von Alternativen vorangetrieben wird. Zudem fassten Cali et al (2016) gewisse Voraussetzungen zusammen, die ein klinisch relevantes PJI-Infektionsmodell am Tier erfüllen sollten. Hierauf wird in Kapitel 4.4 noch detailliert eingegangen.

Den gesetzlichen (Genehmigung des Versuchsvorhabens gemäß §8, Absatz 1 des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006 durch das Landesamt für Verbraucherschutz des Freistaates Thüringen unter der Reg.-Nr. 14-003/13) und ethischen Prinzipien (*3Rs*) folgend, entwickelten wir ein bereits bestehendes Tiermodell (Alt et al 2006), welches die für unsere Zwecke notwendigen Grundvoraussetzungen mit vielversprechenden Ergebnissen lieferte, weiter. Alt et al (2006) etablierten in ihrer Studie ein Kleintiermodell, in welchem sie *New Zealand White Kaninchen* verschieden beschichtete K-Drähte in den rechten tibialen Markraum implantierten und mit *S. aureus* beimpften. Ziel der Arbeit war es, unterschiedliche Beschichtungen auf ihr Eradikationsvermögen zu testen. Die Tiere wurden nach 28 Tagen euthanasiert und auf Infektionszeichen untersucht. In der Kontrollgruppe mit Implantaten ohne antimikrobielle Beschichtung ließ sich in sieben von acht Tieren eine chronische Infektion feststellen.

Darauf aufbauend haben wir das Studiendesign von Alt et al (2006) zu dem in Kapitel 2.2.1 beschriebenen erweitert und konnten so das hier vorliegende Kleintiermodell (Brunotte et al 2019) etablieren. Es ist das erste Kleintiermodell, das den aktuellen klinischen Goldstandard eines zweizeitigen Prothesenwechsels im Sinne einer *failed revision* imitiert. Dabei ist besonders hervorzuheben, dass der zeitliche Ablauf mit initialer Operation, Revision mit *Spacer*implantation nach 28 Tagen, erneutem Debridement und Implantatreimplantation nach weiteren 28 Tagen der klinischen Realität sehr nahekommt.

Insgesamt konnte mit dem vorliegenden Studiendesign trotz komplexem chirurgischen

Vorgehen und einem vergleichsweise langen Beobachtungszeitraum von insgesamt 84 Tagen eine Überlebensrate von 91,7 % (11 von 12 Tieren) erzielt werden. Besonders die drei operativen Eingriffe stellten dabei für die Versuchstiere eine hohe Belastung dar. Allerdings kann unter Berücksichtigung der Gewichtsentwicklung sowie der hohen Überlebensrate über den gesamten Beobachtungszeitraum die Belastung und der Stress für die Versuchstiere in diesem anspruchsvollen Infektionsmodell als ethisch vertretbar angesehen werden. Die Gewichtsabnahme aller Kaninchen innerhalb der ersten 28 Tage (*Initial Surgery* bis *Revision 1*) ist am ehesten auf eine schwere akute Infektion des jeweils operierten und infizierten linken Hinterlaufs zurückzuführen. Die schwere akute Infektion konnte durch die klinische Beurteilung bei *Revision 1* bestätigt werden. Bei allen Versuchstieren zeigte sich eine Schwellung des Knies und der Schienbeinregion mit teilweise Pusentleerung während der Revisionsoperation als Zeichen eines akuten Infektgeschehens. Die Infektion beschränkte sich dabei stets auf die operierte Extremität. Systemische Infektionszeichen im Sinne von Fieber, Tachykardie und Tachypnoe (Cecconi et al 2018) traten nicht auf. Auch die mikrobiologischen Ergebnisse der nach *Revision 1* auf BHI-Agarplatten ausgerollten K-Drähte lieferten Infektionsraten von 100 % und bestätigten somit das Vorliegen einer akuten Infektion. Die jeweilige Anordnung und Farbe der Bakterienkolonien auf den BHI-Agarplatten sprachen gegen eine Fremdkontamination. Daher können nur die beiden eingesetzten MRSA-Stämme für die Induktion der Infektion verantwortlich gemacht werden. Zudem verhinderte das Arbeiten unter streng sterilen Operationsbedingungen mit ausschließlicher Nutzung von Materialien aus der Humanmedizin eine die Studie gefährdende Fremdkontamination mit unbekanntem sekundären Erregern.

Die meisten Tiere gewannen nach *Revision 1* wieder an Gewicht bzw. hielten dieses und verloren auch im weiteren Versuchsverlauf nicht erneut daran. Dieses lässt auf eine erfolgreiche Eradikation oder zumindest Unterdrückung des akuten Infektgeschehens mit Umwandlung in eine chronische Infektion schließen. Zudem zeigen die mikrobiologischen Ergebnisse nach *Revision 2* mit Eradikationsraten von bis zu 66 % (Gruppe I) die Unterdrückung der akuten Problematik.

Die mikrobiologischen Ergebnisse mit positivem Bakterienkulturwachstum der K-Draht-Rollouts an Tag 84 zeigten eine Gesamtreinfektionsrate von 81,8 % (9 von 11 Tieren). In Gruppe I und IV betrug die Reinfektionsrate 100 %. Diese mikrobiologischen Analysen bestätigten ein zuverlässiges Scheitern der Revision des zweizeitigen Verfahrens, welches im Sinne einer *failed Revision* eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit war.

Radiologische Anzeichen einer chronischen Osteomyelitis bei 10 von 11 Tieren nach 84 Tagen unterstreichen die angestrebte erfolgreiche Induktion eines chronischen Infektionsgeschehen. Die bakterielle Belastung des Knochenmarks (1×10^5 CFU/g bis 5×10^7 CFU/g und 1×10^4 CFU/g) und der K-Drähte (*Sonication*) (1×10^4 CFU/wire bis 1×10^7 CFU/wire) an Tag 84 deuteten darauf hin, dass im Laufe des Beobachtungszeitraums durch die chirurgische Behandlung ein Wechsel von einer akuten zu einer chronischen Infektion stattgefunden hatte.

Allerdings lieferten die mikrobiologischen Ergebnisse und die histologische Auswertung zwischen den einzelnen Gruppen teilweise unterschiedliche Ergebnisse. Eine mögliche Erklärung für diese Problematik ist die Tatsache, dass für die histologische Aufarbeitung und Auswertung lediglich ein 15-20 mm messender Längsschnitt aus dem mittleren, diaphysären Teil der entnommenen medialen Tibiae aufgearbeitet wurde. Dieser eine Abschnitt bietet keinen vollständigen Überblick über das infektiöse Geschehen in der gesamten Tibia. So ist es hochwahrscheinlich, dass infizierte Tibiassegmente nicht histologisch aufgearbeitet wurden und somit keine Berücksichtigung in der abschließenden Auswertung finden konnten. Dennoch zeigten über die Hälfte der Versuchstiere bei der histologischen Beurteilung definitive Anzeichen einer Osteomyelitis.

Um bei der histologischen Auswertung eine individuelle Aussage bezüglich des Schweregrades einer potentiell vorliegenden Infektion für jedes Kaninchen treffen zu können, wurde ein einfach anwendbarer semiquantitativer Bewertungsscore entwickelt. Dieser entstand durch Vereinfachung und in Anlehnung an die durch Smeltzer et al (1997) und Tiemann et al (2014) publizierten und etablierten Scoringssysteme. Es wurden die Bewertungskriterien **Abszessformation im Markraum oder Kortikalknochen**, **periostale Knochenneubildung** und **bakterielle Ansiedlung im Markraum oder Kortikalknochen** festgelegt. Je nach Kriterium erfolgte eine einfach durchzuführende Aufteilung der histologischen Schnitte in verschiedene Segmente und die anschließende Auswertung. Es entstand ein vereinfachtes und leicht zu bedienendes *Advanced Scoring System*, das ohne großen Aufwand und zusätzliche Auswertungssoftware angewandt werden kann. Somit könnte dieser für die vorliegende Arbeit entwickelte Bewertungsscore auch zukünftig für andere Autoren zur Beurteilung der histologischen Osteomyelitis nützlich sein.

Sekundäre Ziele der vorliegenden Studie waren sowohl die Identifizierung des optimalen MRSA-Stammes als auch die Identifizierung der optimalen Inokulationsdosis für eine

zuverlässige Reinfektionsinduktion zum Zeitpunkt der Euthanasie an Tag 84. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene MRSA-Stämme (EDCC 5443 und EDCC 5398) mit zwei unterschiedlichen Inokulationsdosen (10^5 und 10^7 CFUs) verwendet. Obwohl die Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen klein war, zeigten die mikrobiologischen Ergebnisse, dass Gruppe I mit dem Stamm EDCC 5443 in einer Dosis von 10^5 CFUs die vielversprechendsten Ergebnisse lieferte. Die Eradikation der initialen schweren, akuten Infektion konnte zu 67 % durch Spülung, Debridement und lokale Antibiotikabehandlung mit Vancomycin-beladenen PMMA-*Spacern* nach *Revision 2* erreicht werden. An Tag 84 zeigte sich eine Reinfektionsrate von 100 %. In zwei von drei Fällen konnte die histologische Analyse eine chronische Osteomyelitis nachweisen.

Zusammenfassend bietet das in dieser Arbeit entwickelte Kleintiermodell auf Grundlage der erreichten Annäherung an das aktuelle klinische Vorgehen einer *Two-Stage-Revision Procedure* die Möglichkeit, sämtliche Therapiebausteine zu variieren und *in vivo* zu beurteilen.

4.3 Weitere experimentelle Studien am Tier im Vergleich

In der Literatur ist eine Vielzahl an verschiedenen Studien und Modellen für Implantat-assoziierte Osteomyelitiden beschrieben. Unterschiedliche Tierarten dienten dabei als Versuchstiere. Einen strukturierten und sehr umfangreichen Überblick für *S. aureus*-assoziierte Osteomyelitis-Modelle geben Reizner et al (2015). Betrachtet man hier im Speziellen Kaninchenmodelle, welche MRSA-assoziierte Knocheninfektion aufgrund eines Implantates oder einer Fraktur beschreiben, existieren zwar mehrere Studien, aber keine von ihnen imitiert eine *Two-Stage-Revision Procedure* und spiegelt so den aktuellen klinischen Goldstandard wieder.

Sowohl Belmatoug et al (1996) als auch Craig et al (2005) führten in ihren Arbeiten jeweils nur eine initiale Operation zur Implantatinsertion und Inokulation mit MRSA durch. In beiden Studien war das primäre Ziel die Etablierung einer Infektion mit Ausbildung einer Osteomyelitis, so dass kein Eradikationsversuch unternommen wurde. Craig et al (2005) wählten einen Beobachtungszeitraum von lediglich sieben Tagen, Belmatoug et al (1996) euthanasierten die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten, jedoch spätestens nach 8 Wochen. Darüber hinaus unterscheiden sich beide Arbeiten durch

abweichende und unterschiedliche Implantatarten (Edelstahlschraube vs. Silikonelastomer Implantat) mit anderen Implantationsorten (distale Femurkondylen vs. Tibia-Plateau) sowie unterschiedlichen Beimpfungsmethoden mit lediglich einem Bakterienstamm und mehreren Inokulationsdosen.

Giavaresi et al (2008), Ismael et al (2003) und El-Kamel et al (2007) gingen einen Schritt weiter und simulierten in ihren Modellen jeweils ein einzeitiges Therapieverfahren, um antibiotische Therapiestrategien zu testen.

El-Kamel et al (2007) untersuchten ein implantierbares Gatifloxacin-Verabreichungssystem auf Basis des biologisch abbaubaren Polymers Polycaprolacton für die lokale Antibiotikabehandlung. Nach initialer Operation mit Implantation einer Edelstahlnadel in den tibialen Markraum als Prothesenimitat und MRSA-Beimpfung erfolgte nach 14 Tagen die Revisionsoperation. Wurde die eine Hälfte der Tiere euthanasiert, erhielt die andere Hälfte das Gatifloxacin-Verabreichungssystem. Diese Tiere wurden nach weiteren zwei Wochen, also nach einem insgesamt Beobachtungszeitraum von vier Wochen, euthanasiert. Giavaresi et al (2008) induzierten in ihrem Modell eine femorale Osteomyelitis durch MRSA-Kontamination. Dabei wurde in der initialen Operation auf das Einbringen eines Implantates verzichtet. Vier Wochen nach erfolgter Kontamination erfolgte eine Revisionsoperation und die Unterteilung der Tiere in Gruppen. So wurde den Versuchstieren einer Gruppe Gentamicin-Vancomycin-beladene PMMA-Nägel als *Spacer* implantiert. Nach insgesamt sieben Wochen erfolgte dann die Euthanasie aller Tiere, so dass auch hier auf ein zweizeitiges Verfahren verzichtet wurde. Ismael et al (2003) wählten den partiellen Kniegelenksersatz mit tibialer Komponente als Versuchsgrundlage. Dieser wurde in einer initialen Operation mit simultaner MRSA-Beimpfung durchgeführt. Sieben Tage später führte die Arbeitsgruppe den einzeitigen Prothesenausbau durch. Den Tieren einer Gruppe wurde in der Revisionsoperation ein Teicoplanin-beladener Zement-*Spacer* eingesetzt. Am Tag 28 wurden alle Tiere für die weitere Auswertung euthanasiert. Eine Prothesenreimplantation fand auch hier nicht statt. Alle drei Modelle unterschieden sich somit wiederum nicht nur durch das grundlegende Therapiekonzept und die Beimpfungsmethode, sondern im Falle von El-Kamel et al (2007) und Ismael et al (2003) auch durch die gewählte Prothesenart und im Falle von Ismael et al (2003) und Giavaresi et al (2008) durch den Implantationsort.

Andere MRSA-assoziierte Osteomyelitis-Modelle am Kaninchen, welche nicht von Reizner et al (2015) erwähnt wurden, beschreiben Helbig et al (2014) und Gaudin et al

(2011). Dabei lag die Intention von Helbig et al (2014) darin, ein einfaches Osteomyelitis-Modell zu etablieren. Hierfür wurde lediglich eine Operation durchgeführt, in der ein Titanzylinder in die rechte Femurkondyle implantiert und mit MRSA beimpft wurde. Eine weitere Operation fand nicht statt. Nach insgesamt 42 Tagen wurden alle Versuchstiere euthanasiert. Das Ziel von Gaudin et al (2011) war es, ebenfalls ein einfaches Osteomyelitis-Modell zu entwickeln, welches für weitere Studien genutzt werden kann. Dabei wurde in der initialen Operation nach Markraumtrepanation des Femurs MRSA in diesen beimpft. Das Studiendesign sah eine Euthanasie der Versuchstiere ja nach Gruppe an den Tagen 1, 2, 3, 9 und 14 vor. Diejenigen Tiere, die nicht an den Tagen 1, 2 und 3 euthanasiert wurden erhielten am dritten Postoperativen Tag ein chirurgisches Debridement, um eine erneute Operation zu imitieren. Letztendlich unterscheiden sich auch diese beiden Modelle grundlegend in Konzeption, gewählter Prothesenart, Implantationsort und Beimpfungsmethode.

Neben diesen am Kaninchen durchgeführten Studien existieren noch weitere MRSA-assoziierte Modelle, bei denen andere Tierarten als Forschungsobjekt dienten. Dazu zählen weitere Kleintierstudien an Ratte und Maus (Ersoz et al 2004, Niska et al 2012, Orhan et al 2010, Shandley et al 2012, Tuzuner et al 2006), sowie Großtierstudien am Schaf (Moriarty et al 2017, Williams et al 2012a, Williams et al 2012b). Auch von diesen imitierte mit einer Ausnahme keines eine *Two-Stage-Revision Procedure*.

Moriarty et al (2017) bieten die erste Näherung an den klinischen Goldstandard des zweizeitigen Prothesenwechsels im Großtiermodell mit dem Versuchstier Schaf. Aufgrund der unterschiedlichen Tierarten ist ein Vergleich mit dem in dieser Arbeit präsentierten Modell (Brunotte et al 2019) nur bedingt möglich. Es zeigen sich aber grundlegende Überschneidungen.

Die Arbeitsgruppe um Moriarty et al (2017) nutzen in ihrer Arbeit insgesamt 33 ausgewachsene *Schweizer Alpenschafe*. Diese wurden in insgesamt sieben Gruppen unterteilt, von denen zunächst zwei Gruppen mit je drei Tieren als Pilotversuch zur Festlegung der Operationstechniken, der grundlegenden Antibiotikabehandlung und der bakteriellen Impfdosen dienten. In der Hauptstudie wurden die restlichen fünf Gruppen untersucht. Diese unterteilten sich in einmal drei Gruppen je sechs Tiere, welche mit MSSA beimpft wurden und einmal in zwei Gruppen mit je drei und sechs Tieren, die mit MRSA beimpft wurden. Dabei entsprach der genutzte MRSA-Stamm einem des in der vorliegenden Arbeit präsentierten Modells. Moriarty et al (2017) nutzten ebenfalls den MRSA-Stamm EDCC 5443 für ihr Versuchsvorhaben. Im Rahmen der initialen

Operation wurde den Schafen ein aus der Humantraumatologie stammender Humerusnagel der Fa. Debuy Synthes in den tibialen Markraum der linken Extremität implantiert und über einen präparierten Kollagenschwamm beimpft. Nach acht Wochen erfolgte die erste Revisionsoperation (*Stage 1*) mit Implantatentfernung, Debridement und *Spacer*implantation. Die verwendeten *Spacer* waren entweder antibiotikafrei, mit Gentamicin oder mit einem Gentamicin-Vancomycin-Gemisch zur lokalen Eradikation versetzt. Je nach Gruppe wurde zusätzlich mit einer systemischen Antibiotikatherapie begonnen. Nach weiteren zwei Wochen erfolgte die zweite Revisionsoperation (*Stage 2*), in der die *Spacer* im Rahmen eines leichten Debridements entfernt wurden und ein erneuter Humerusnagel implantiert wurde. Die systemische Antibiotikatherapie wurde beendet. Vier Wochen später, nach einem insgesamt Beobachtungszeitraum von 14 Wochen (98 Tage), wurden die Tiere euthanasiert und die Tibiae zur weiteren Aufarbeitung entnommen. Während des gesamten Beobachtungszeitraums erfolgte die Aufarbeitung der gewonnenen Materialien während der Revisionsoperationen, es wurde das Gewicht der Tiere kontrolliert, es wurden diverse radiologische Kontrollen durchgeführt und systemische Inflammationsparameter wurden überprüft.

Demnach ergeben sich diverse Überschneidungen zwischen der Arbeit von Moriarty et al (2017) und dem in der vorliegenden Arbeit (Brunotte et al 2019) erörterten Modell. So ist das grundlegende Studiendesign als gleichwertig zu betrachten, der Implantationsort war entsprechend, es wurde ein gleicher MRSA-Stamm genutzt und diverse Auswertungsmethoden waren gleich.

Das Großtiermodell von Moriarty et al (2017) zeigt sich in verschiedenen Punkten überlegen. So konnten in einer Pilotstudie die Operationstechniken, die grundlegenden Antibiotikabehandlungen und die bakteriellen Impfdosen festgelegt werden. Sie diente zugleich als Kontrollgruppe. Außerdem wurden insgesamt mehr Tiere in das Versuchsvorhaben eingeschlossen. Darüber hinaus imitiert ein Großtiermodell die klinische Realität besser, da die durchgeführte Operationstechnik aufgrund der anatomisch vergleichbareren Gegebenheiten derjenigen am Menschen deutlich näherkommt. Als Implantat konnte ein in der Humantraumatologie genutzter Humerusnagel der Fa. Debuy Synthes mit Verriegelungsschraube genutzt werden. Neben dem antibiotikabeladenen *Spacer* wurde zusätzlich eine systemische Antibiose durchgeführt, die aufgrund des ähnlichen Gewichtes der Versuchstiere zum Menschen in annähernd gleichen Dosen verabreicht werden konnte. Auch die Überwachungskriterien der Studie von Moriarty et al (2017) waren umfangreicher. So wurden wesentlich mehr

radiologische Kontrollen durchgeführt und den Versuchstieren wurde regelmäßig Blut zur Beurteilung der Inflammationsparameter abgenommen.

Allerdings ist ein Großtiermodell auch wesentlich kostenintensiver und bindet sowohl mehr personelle als auch räumliche Ressourcen. Die Umsetzung gestaltet sich daher als deutlich schwieriger und ist dadurch oftmals nur unter großen Mühen umsetzbar.

Abschließend lässt sich feststellen, dass in der Literatur bisher kein vergleichbares Kleintiermodell zur Simulation einer *failed Two-Stage-Revision Procedure*, wie das in dieser Arbeit präsentierte (Brunotte et al 2019) beschrieben ist. Lediglich Moriarty et al (2017) liefern mit ihrem Großtiermodell einen dem klinischen Alltag sehr realitätsgetreuen Ansatz.

4.4 Limitationen und beeinflussende Faktoren

Das in dieser Arbeit präsentierte Kleintiermodell (Brunotte et al 2019) zur Simulation einer *failed Two-Stage-Revision Procedure* bei Implantat-assoziiertes MRSA-Infektion unterliegt diversen Einschränkungen.

Ein Hauptproblem ist die geringe Anzahl an Versuchstieren. Der Einsatz von lediglich zwölf Kaninchen, auf vier Gruppen zu je drei Tieren verteilt, stellt eine deutliche Limitation dar und macht das Versuchsvorhaben in dieser Form stark anfällig für statistische Ungenauigkeiten. Dies hat besonders dann einen Einfluss, wenn man sich die teils unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Auswertungsmethoden innerhalb der einzelnen Gruppen anschaut. Bei einer solch kleinen Anzahl an Versuchstieren pro Gruppe wirken sich kleinste Ungenauigkeiten beim händischen Beimpfen der Tiere mit den vorbereiteten Inokulationsdosen auf die erzielten Ergebnisse aus. Selbst bei exaktem Arbeiten kann es durchaus sein, dass die einzelnen Tiere nicht zu 100 % die gleiche Anzahl an CFUs erhalten haben und somit die Infektinduktion beeinflusst wurde. Dazu kommen die individuellen Eigenschaften des Immunsystems eines jeden einzelnen Tiers. Das Immunsystem von Lebewesen ist ein hochkomplexes System zum Schutz vor pathogenen Einflüssen. Die Entwicklung ist vielschichtig und unterliegt verschiedenen Einflüssen (Holladay & Smialowicz 2000, Holt & Jones 2000). Letztendlich entwickelt jedes Individuum sein eigenes, spezifisches Immunsystem, was den Grundvoraussetzungen der unterschiedlichen Spezies entspricht (Holsapple et al 2003).

Es wäre daher möglich, dass sich aufgrund der geringen Anzahl an Tieren die individuellen Immunantworten der Tiere auf die unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb einer Gruppe ausgeübt haben.

Des Weiteren liegt keine Kontrollgruppe vor, die zur Überprüfung der erzielten Ergebnisse in medizinischen Studien von erheblicher Bedeutung ist, wie es Szekér et al zusammenfassen (2017). Die geringe Anzahl an Versuchstieren wurde als Kompromiss erwogen, um zunächst möglichst wenig Kaninchen der enormen Belastung des Studiendesigns mit einem langen Beobachtungszeitraum von 84 Tagen, insgesamt drei komplexen Operationen und einer schweren Infektion auszusetzen und somit den 3R-Kriterien (Russell & Burch 1959) zu entsprechen.

Um ein Scheitern des Versuchs im Sinne einer kompletten Eradikation der Infektion zu verhindern und somit das primäre Ziel der Arbeit zu verfehlen, wurde in dem vorliegenden Modell auf einen bedeutenden Therapieschritt der alltäglichen klinischen Praxis verzichtet. So wurde zur Infekteradikation lediglich eine chirurgische Therapie in Form eines Debridements an *Stage 1* und *Stage 2* und die lokale Antibiotikaaanwendung mittels des Vancomycin-beladenen PMMA-*Spacers* durchgeführt. Eine intravenöse Antibiotikatherapie fand nicht statt, obwohl dies in anderen Osteomyelitis-Modellen am Kaninchen bereits durchgeführt wurde (Ismael et al 2003, Schroeder et al 2012). Die Virulenz der einzelnen MRSA-Stämme war in dem neuen Studiendesign nicht sicher vorhersehbar und eine kombinierte Therapie mittels Antibiotika-beladenem *Spacer* und intravenöser Gabe schien zunächst zu riskant, da selbst das Reinfektionsverhalten ohne intravenöse Antibiose nicht sicher bekannt war. Es hätten weitere Versuchsgruppen mit mehr Versuchstieren gebildet werden müssen. Gemäß der Einhaltung der 3R-Kriterien und dem nicht vorhersehbaren Ergebnis wurde dies unterlassen und eine Limitation des Modells gegenüber dem aktuellen klinischen Standards in Kauf genommen.

Diese Limitation wurde auch zum Schutz des sekundären Ziels der vorliegenden Arbeit akzeptiert. Zur Identifizierung des optimalen MRSA-Stamms und einer optimalen Inokulationsdosis für ein zweistufiges Revisionsmodell im Sinne einer *failed revision* im Kaninchen wäre eine zusätzliche intravenöse Antibiotikagabe bei solch kleiner Gruppengröße in diesem frühen experimentellen Stadium kontraproduktiv gewesen, da die vollständige Eradikation gedroht hätte.

Darüber hinaus wäre es sinnvoll gewesen, zur Identifizierung des optimalen MRSA-Stamms und einer optimalen Inokulationsdosis bei jeder Revisionsoperation (*Stage 1* und *Stage 2*) eine mikrobiologische Auswertung zur Bestimmung der bakteriellen

Belastung (*Bacterial load*) des Knochenmarks vorzunehmen. Diese Daten wären dahingehend hilfreich, um ein verbessertes Verständnis des mikrobiellen Wachstums während einer chirurgischen, lokalen und in einem erweiterten Studiendesign einer systemischen Antibiotikabehandlung zu entwickeln. Die Aufdeckung von Wachstumsmustern, die nicht nur von der Art und dem Zeitpunkt der chirurgischen Intervention, sondern auch von zusätzlichen lokalen oder systemischen medizinischen Behandlungen abhängen, könnte von großem Nutzen für die zukünftige therapeutische Optimierung sein.

Wie bereits zuvor erwähnt, postulierten Carli et al (2016) grundlegende Kriterien, die zur Entwicklung eines experimentelle PJI-Modells eingehalten werden sollten, um klinisch repräsentative Ergebnisse zu erzielen. Diese sind: (1) Durchführung der Studie an einem Tier, dessen muskuloskelettale und immunologische Eigenschaften mit denen des Menschen vergleichbar sind, (2) Verwendung eines Implantats aus klinisch relevanten Materialien, welches am Implantationsort einer Gewichtsbelastung ausgesetzt ist und die periprothetische Umgebung effektiv simuliert, (3) Verwendung klinisch relevanter Bakterien, die auf Implantatoberflächen Biofilmbildung zeigen und (4) Nutzung quantitativer Messmethoden von Bakterien, Biofilm und der Immunantwort des Versuchstiers.

Das in dieser Arbeit präsentierte Modell (Brunotte et al 2019) erfüllt diese Kriterien nicht vollumfänglich und weist daher eine weitere Limitation auf. Da dieses der erste Versuch der Etablierung einer *failed Two-stage-Revision Procedure* am Kaninchen war, wurde ein bereits funktionierendes Modell von Alt et al (2006) weiterentwickelt. Dabei wird Punkt (2) der von Carli et al (2016) geforderten Kriterien nicht erreicht. Die intramedulläre Lage des K-Drahts in der linken Tibia spiegelt eine periprothetische Umgebung nicht effektiv wider, da das Implantat keiner Belastung ausgesetzt ist, aus klinisch eher unbedeutendem Material bestehen, locker sitzt und die intraartikulären und intramedullären Räume nicht voneinander trennt. Auch für diese Einschränkungen war der primäre Grund das Tierwohl im Sinne der 3R-Kriterien. Da ein Erfolg der Studie nicht sicher vorausgesagt werden konnte, wurde zunächst ein praktikableres und vereinfachtes Modell mit weniger operativem Stress für die Tiere getestet.

Letztendlich beeinflusst diese Limitation aber die immunologischen und mikrobiologischen Vorgänge im Bereich des Implantats für eine möglichst realitätsgetreue Untersuchung entscheidend. Denn es ist von enormer Bedeutung, ob das Implantat locker oder fest im Knochen verankert ist und den intraartikulären vom

intramedullären Raum trennt. Im klinischen Alltag ist eine feste Fixierung nicht nur für die korrekte Funktion des Gelenks und der Extremität unerlässlich, sondern sie wirkt sich auch auf die Ausbildung des Biofilms und der Immunantwort des Implantatträgers aus. Untersuchungen von Wijeyekoon et al (2004) konnten zeigen, dass Bakterien auf konkrete Oberflächenbelastung, wie sie bei einem fest verankertem Implantat vorkommt, mit einer Erhöhung der Biofilmdichte und der Zellaktivität reagieren. Kommt es jedoch zu Scherkräften, welche im Falle einer Implantatlockerung auftreten können, beeinflussen diese die bakteriellen Adhäsionen und führen zu einem veränderten Metabolismus, der die Biofilmdichte und -festigkeit ändern kann, wie es Liu & Tay (2001) nachweisen konnten.

Bei fest im Knochen verankerten Implantaten gewährt die Immunreaktion des Implantatträgers unter sterilen Umständen trotz vielfältiger mechanischer Belastung eine erfolgreiche Osseointegration und somit eine regelrechte Belastungsverteilung der auf das Implantat wirkenden Kräfte (Carli et al 2016). Bei Implantaten mit unzureichender Presspassung oder schlechter Oberflächenbeschaffenheit (Gristina 1987) verhindert die Immunreaktion des Implantatträgers eine regelrechten Osseointegration. Vielmehr führt diese stattdessen zu einer schlechten Fixierung durch fibröses Gewebe (Soballe et al 1992) und ruft eine chronische, durch Neutrophile und Lymphozyten induzierte, Entzündung hervor (Abu-Amer et al 2007, Athanasou et al 1992), wie es Carli et al (2016) beschreiben.

Es zeigt sich also, dass sich die immunologischen Umgebungsbedingungen von lockeren und fest sitzenden Implantaten deutlich unterscheiden. Die kombinierten Auswirkungen von Implantatstabilität und -belastung auf die Immunantwort und das Bakterienwachstum verdeutlichen die translatorischen Defizite zwischen Tierversuch und Realität bei der Verwendung eines unbelasteten, losen Implantats zur Simulierung einer periprothetischen Umgebung (Carli et al 2016).

Das vorliegende Modell unterliegt insgesamt diversen Limitationen und beeinflussenden Faktoren. Hauptverantwortlich dafür war primär das Tierwohl. So wurde bewusst beschlossen, diverse Einschränkungen in Kauf zu nehmen, um zunächst die ethische Vertretbarkeit des präsentierten Modells festzustellen, bevor eine größere Anzahl an Tieren diesem Studiendesign zugeführt wird.

4.5 Ausblick

Die Therapie Implantat-assoziiertes Infektionen erweist sich trotz vielschichtiger Forschung und einer immensen Anzahl an Publikationen, besonders innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte (Henderson & Austin 2017), noch immer als nicht definitiv geklärt. Auch wenn die Inzidenz für PJIs mit bis zu 2 % (Kapadia et al 2016) relativ klein ist, so stellen PJIs besonders dann, wenn sie durch multiresistente Erreger wie MRSA hervorgerufen werden, eine besondere Bedrohung für die Patienten dar. Ultima Ratio ist derzeit bei nicht beherrschbaren PJIs mit schweren Knochen- und Weichteilinfektionen leider weiterhin die Amputation oder der Entscheid zu einer *Girdlestone Situation* (Osmon et al 2013). Beides stellt für die Patienten einen massiven Einschnitt in ihren weiteren Lebensweg dar. Da die Anzahl der jährlich durchgeführten Implantat-Implantationen stetig zunimmt (Wengler et al 2014), muss daher das oberste Ziel sein, PJIs zu verhindern bzw. eine möglichst effektive Therapie anzubieten. Nicht nur um die Morbidität und Mortalität zu senken, sondern auch um die medizinischen Kosten zu reduzieren und volkswirtschaftlichen Schaden abzuwenden.

Um die zugrunde liegenden Pathomechanismen immer besser zu verstehen und neue Therapiestargeten entwickeln zu können, sind *in vivo* Modell in Form von Tierversuchen auch heutzutage noch von immenser Bedeutung. Diese sollen den aktuellen klinischen Therapiestandard simulieren und es so ermöglichen, diesen immer weiter zu verbessern (Reizer et al 2015).

Das in dieser Arbeit präsentierte Kleintiermodell zur Simulation einer *failed Two-Stage-Revision Procedure* bei MRSA-assoziiertes Protheseninfektion (Brunotte et al 2019) ist das erste seiner Art. In der Literatur findet sich lediglich ein weiteres *Two-Stage-Revision-Procedure* Modell, welches allerdings am Großtier durchgeführt wurde (Moriarty et al 2017) und somit wesentlich schwerer umzusetzen ist.

Wie in Kapitel 4.4 erörtert, unterliegt das hier vorliegende Modell in der jetzigen Form diversen Limitationen. Diese sind vor allem auf den Schutz des Tierwohls im Sinne der 3R-Kriterien zurückzuführen. Da das Modell positive Ergebnisse erbracht und somit als Erfolg gewertet werden kann, steht es nun zur Weiterentwicklung zur Verfügung. Durch hohe Überlebensraten von 91.7 % und einer sicheren Etablierung einer chronischen Osteomyelitis in Gruppe I ist es ethisch vertretbar, im nächsten Schritt mehr Versuchstiere und somit mehr Versuchsgruppen zu etablieren. Damit könnten

zuverlässigere Ergebnisse und eine bessere Korrelation zwischen verschiedenen Bewertungsmethoden erzielt werden. Darüber hinaus bietet es sich an, das operative Vorgehen zu verfeinern und komplexer zu gestalten, um ein noch realitätsgetreueres PJI-Modell zu entwickeln. Verlässt man das Feld der PJIs, bietet sich das vorliegende Modell auch zur Simulation einer Fraktur-assoziierten Infektion mit Osteosynthesematerial an. Die Entzündungsreaktion und biomechanische Veränderungen in der Frakturheilung gelten als Schlüsselfaktoren für die Etablierung, die Behandlung und das Ergebnis von Patienten mit frakturbezogenen Infektionen (Claes et al 2012b).

Da ein zweizeitiges Modell insgesamt sehr komplex mit langem Beobachtungszeitraum und diversen Operationen ist, bietet es generell eine Vielzahl an Ansatzpunkten, um Neuerungen zu testen. Dabei ist es lediglich entscheidend, dass ein konkretes Ziel verfolgt und die erzielten Daten konsequent unter Experten ausgetauscht werden. Dieses soll einen sicheren Nutzen der durch die Forschung erhobenen Daten gewährleisten (Henderson & Austin 2017).

Abschließend zeigt sich also, dass das in dieser Arbeit präsentierte Kleintiermodell am Kaninchen (Brunotte et al 2019) und das von Moriarty et al (2017) entwickelte Großtiermodell am Schaf die ersten vielversprechenden Tiermodelle sind, die den aktuellen klinischen Goldstandard simulieren und somit in Zukunft für die Entwicklung neuer Therapiestrategien genutzt werden können.

5 Zusammenfassung

Implantat-assoziierte Infektionen stellen eine enorme Herausforderung für Patienten, behandelnde Ärzte und das gesamte Gesundheitssystem dar. Besonders dann, wenn sie durch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) hervorgerufen werden. Mitunter können sie zu verheerenden Komplikation und Funktionsbeeinträchtigungen führen und im schlimmsten Fall den Verlust der betroffenen Gliedmaßen bedeuten. Trotz umfangreicher Therapiekonzepte liegen noch immer hohe Reinfektions- und Therapieversagensraten vor. Eine Verbesserung der aktuellen chirurgischen Behandlung ist daher notwendig. Dazu bedarf es neuer Infektionsmodelle, die den aktuellen klinischen Goldstandard widerspiegeln und zur Erprobung verbesserter Therapiemöglichkeiten dienen können. Tiermodelle spielen dabei eine wichtige Rolle. Neben einem bereits etablierten, anspruchsvollen und kostenintensiven Großtiermodell gibt es noch kein Kleintiermodell, welches eine zweizeitige Revision adäquat simuliert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein präklinisches Kleintiermodell zu entwickeln, um eine zweizeitige Prothesenrevision bei Implantat-assoziierte MRSA-Infektion im Sinne einer *failed revision* zu simulieren.

Hierfür wurden zwölf *New Zealand White Kaninchen* K-Drähte in den Markraum der linken Tibia implantiert und anschließend mit MRSA beimpft. Es wurden zwei verschiedene klinische Isolate von MRSA-Stämmen (EDCC 5398 - Eugen Domann Culture Collection Nr. 5398 und EDCC 5443 -Eugen Domann Culture Collection Nr. 5443, je Institut für medizinische Mikrobiologie, Gießen) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10^5 und 10^7 *Colony Forming Units* (CFUs)) verwendet. Diese Aufteilung führte zu vier Gruppen mit je drei Kaninchen. Das Studiendesign sah einen Beobachtungszeitraum von insgesamt 84 Tagen vor. Nach 28 Tagen wurden die K-Drähte entfernt und ein Debridement durchgeführt, sowie ein Vancomycin-beladener PMMA-*Spacer* eingesetzt (*Stage 1*). Nach weiteren 28 Tagen, an Tag 56, erfolgte *Stage 2*. Dabei erfolgten *Spacer*-Entfernung, ein erneutes Debridement und K-Drähte wurden zur Simulation der Re-Implantation erneut eingesetzt. An Tag 84 erfolgte die Euthanasie aller Tier und neben der mikrobiologischen Auswertung der K-Drähten und des Knochenmarks wurden die einzelnen Tibiae radiologisch und Knochenproben histologisch analysiert. Zusätzlich erfolgte über den gesamten Beobachtungszeitraum eine klinische Beurteilung der Tiere sowie umfangreiche Gewichtskontrollen.

Elf Kaninchen überlebten die gesamte Studiendauer, was einer Überlebensrate von 91,7 % entspricht. Innerhalb der ersten vier Wochen konnte bei jedem Tier eine manifeste K-Draht-assoziierte Infektion etabliert werden. Durch Debridement und *Spacer*implantation bei Revision 1 (*Stage 1*) konnte die Infektion in Gruppe I zu 67 % und in den Gruppen III und IV zu 33 % eradiziert werden. Ein Wiederauftreten der Infektion konnte durch die mikrobiologische Auswertung an Tag 84 in neun von elf Tieren (allen Tieren der Gruppen I und IV) festgestellt werden. Sowohl die Röntgenanalyse als auch die Histologie zeigten nach zwölf Wochen in den meisten Fällen deutliche Anzeichen einer Osteomyelitis. Die hohe Überlebensrate, die klinischen Beobachtungen und die Gewichtsentwicklung bestätigten den für die Tiere ethisch vertretbaren Stress während des langen Versuchsvorhabens.

Zusammenfassend bietet das in dieser Arbeit präsentierte Kleintiermodell einen ersten vielversprechenden präklinischen Ansatz zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien für Implantat-assoziierte Infektionen. Sowohl die hohen Überlebens- als auch Reinfektionsraten zeigen den Erfolg des gewählten Studiendesigns, trotz diverser Limitationen. Daher kann dieses Modell als geeignet für nachfolgende präklinische *in vivo* Tests angesehen werden.

6 Summary

Implant-related infections remain an enormous challenge for patients, orthopedic surgeons and the entire healthcare system. Particularly, if they are caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). This devastating complication can lead to functional impairments and, in the worst case, can mean the loss of the affected limbs. Despite comprehensive therapy concepts, there are still high rates of reinfection and therapy failure. Therefore, an improvement of the current surgical treatment is necessary. This requires new infection models that reflect the current clinical gold standard and can serve to find new treatment options. Animal models play an important role here. Beside an already established, demanding and costly large animal model, there is no small animal model that adequately simulates a *two-stage revision procedure*. Therefore, the purpose of this study was to establish a preclinical small animal model to simulate a *two-stage revision procedure* in implant-related MRSA infection.

For this objective, a K-wire was implanted into the intramedullary canal of the left tibia in twelve *New Zealand White Rabbits* followed by inoculation with MRSA. Two different clinical isolates of MRSA-strains (EDCC 5398 - Eugen Domann Culture Collection Nr. 5398 and EDCC 5443 -Eugen Domann Culture Collection Nr. 5443, Institute of Medical Microbiology Gießen respectively) were used in two different concentrations (10^5 and 10^7 colony forming units (CFUs)). This resulted in four groups of three rabbits each. The study design provided for a total observation period of 84 days. After 28 days an irrigation and debridement with the removal of the K-wire was performed followed by implantation of a vancomycin-loaded PMMA *spacer (stage 1)*. After another 28 days, on day 56, *stage 2* was performed with another irrigation and debriment with removal the spacer and new insertion of another K-wire. On day 84, all animals were euthanized and in addition to the microbiological evaluation of the K-Wires and the bone marrow, the individual tibiae were radiologically and histologically analyzed. In addition, a clinical evaluation of the animals and extensive weight controls were performed over the entire observation period. Eleven rabbits survived the whole study period, which corresponds to a survival rate of 91.7 %. Within the first four weeks, a manifest K-wire-associated infection was established in each animal. By debridement and spacer implantation during revision 1 (*stage 1*), 67% of the infection was eradicated in group I and 33% in groups III and IV.

A recurrence of the infection was detected by microbiological analysis on day 84 in nine of eleven animals (all animals of groups I and IV). Both X-ray analysis and histological analysis showed clear signs of osteomyelitis in most cases after 12 weeks. The high survival rate, clinical observations and weight development confirmed the ethically acceptable stress for the animals during the long experimental period.

In summary, the small animal model presented in this work offers a first promising preclinical approach to the development of new treatment strategies for implant-related infections. Both the high survival and reinfection rates show the success of the chosen study design, despite various limitations. Therefore, this model can be considered suitable for subsequent preclinical *in vivo* tests.

7 Abkürzungsverzeichnis

AAOS	<i>American Academy of Orthopaedic Surgeons</i>
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CFUs	Colony Forming Units
CI	Convidence Intervall
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
EDCC	Eugen Domann Culture Collection
evtl.	Eventuell
ggfls.	Gegebenenfalls
h	Stunde
HE	Hämalaun-Eosin
HEP	Hemiprothese
HPF	Hauptgesichtsfeld
i.m.	intramuskulär
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
K-Draht	Kirschner-Draht
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
LE	Leukozyten Esterase
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSIS	Musculoskeletal Infection Society
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>

NIS	<i>Nationwide Inpatient Sample</i>
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannt
OSG	Oberes Sprunggelenk
PJI	Protheseninfektion (<i>engl. periprotthetic joint infection</i>)
PMMA	Polymethylmethacrylate
PMN	synovialer Neutrophilen Anteil (PMN %)
rpm	rounds per minute
RT	Raum Temperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s.c.	subcutan
sec	Sekunden
SPILF	<i>Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française</i>
TB	Toluidinbaur O
TEP	Totalendoprothese
TRAP	Tartrat Resistente Saure Phosphatase
vs.	versus
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Biofilmformation auf einer metallischen Oberfläche. Es zeigt sich eine große Bakterienformation (a), bis mit zunehmender Vergrößerung einzelne kokkoide Bakterien (b) voneinander abgegrenzt werden können (Labor für experimentelle Unfallchirurgie Universitätsklinikum Gießen).....	13
Abbildung 2 Vereinfachter Diagnosealgorithmus für PJIs. Eine PJI liegt definitionsgemäß dann vor, wenn eines der Hauptkriterien, oder vier der Nebenkriterien erfüllt sind (in Anlehnung an die Fachgesellschaftsempfehlungen (Osmon et al 2013, Parvizi et al 2011b, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010)).....	22
Abbildung 3 Vereinfachter Therapiealgorithmus für PJIs (in Anlehnung an die Fachgesellschaftsempfehlungen (Osmon et al 2013, Parvizi et al 2011b, Societe de Pathologie Infectieuse de Langue et al 2010)).	28
Abbildung 4 PMMA-Zement-Spacer (Fa. aap Implantate AG, Berlin).	39
Abbildung 5 Zeitplan für das Versuchsvorhaben.	41
Abbildung 6 Präoperative Vorbereitungen (für jedes Tier in gleicher Art und Weise durchgeführt). Anästhesieeinleitung durch eine Tierärztin und ihr Team (a). Rückenlagerung des Versuchstiers mit steriler Abdeckung mittels Lochtuch zur Aussparung des OP-Gebiets am linken Hinterlauf (b).....	43
Abbildung 7 Operationstechnik Tag 0 (<i>Initial surgery</i>). Präoperative Vorbereitung des auf dem Rücken liegenden und bereits narkotisierten Versuchstieres. Nach Enthaarung des Op-Feldes folgt die Desinfektion mittels Povidon-Iodlösung (10 %) (a). Inzision an dem steril abgedeckten linken Hinterlauf über der Tuberositas Tibia per Einwegskalpell Größe 11 (b)(c). Eröffnung des tibialen Markraums mit einem 2 mm Handbohrer nach Darstellung und Spaltung des Ligamentum Patella (d)(e). Kürzung des K-Drahts mit einer Kneifzange nach antegrader Einbringung und Vorschub bis zum distalen knöchernen Ende (f)(g). Beimpfung des tibialen Markraums und dem darin liegenden K-Draht mit dem für das Tier vorgesehenen Bakterienstamm in entsprechend vorgesehener Inokulationsdosis mittels einer 1 ml Spritze (h). Schichtweiser Wundverschluss mit 4-0 Vicrylfaden (i).	44
Abbildung 8 Operationstechnik Tag 28 (Revision 1, <i>Stage 1</i>). Aufsuchen des implantierten K-Drahts nach erneuter Inzision mittels eines Einwegskalpells Größe 11 im Bereich der alten Narbe (a)(b)(c). Entfernung des K-Drahts mit Hilfe einer Overholt-	

Klemme (d). Ausrollen des steril entnommenen K-Drahts auf einer BHI-Agarplatte (e). Zunächst Spülung des tibialen Markraums mit 20 ml NaCl-Lösung (0,9 %ig) (f) und anschließendes Debridierung mittels eines 2 mm Handbohrers (g) sowie erneuter Spülung des tibialen Markraums mit 20 ml NaCl-Lösung (0,9 %ig) (h). Einbringen des mit Vancomycin beladenen PMMA-Spacers in den tibialen Markraum (i) und Vorschub des Spacers bis zum Anschlag, sodass dieser vollständig im Markraum eingebracht ist (Pfeil) (j).....	45
Abbildung 9 Postoperative Röntgenaufnahme im seitlichen Strahlengang zur Lagekontrolle des intramedullär liegenden Implantats. Korrekte Lage des K-Drahts an Tag 0 (a), sowie korrekte Lage des Spacers an Tag 28 (b).....	46
Abbildung 10 Beispiele bebrüteter BHI-Agarplatten für die drei unterschiedenen quantitativen Bewertungskriterien. Bild (a) zeigt eine „nicht besiedelte (0)“ BHI- Agarplatte. Bild (b) eine „leicht besiedelte (+)“ und Bild (c) eine „stark besiedelte (++)“ BHI-Agarplatte.	49
Abbildung 11 Ultraschallbad BactoSonic im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Fa. BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin).	50
Abbildung 12 Spaltung einer steril entnommenen Tibia mittels oszillierender Säge (a). Ausschaben der lateralen Tibia-Hälfte zur Gewinnung von purulentem Knochenmark (roter Pfeil) zur Bestimmung der Bakterienlast (b). Wiegen des mittels scharfen Löffels gewonnenem Markrauminhalts (c) (Fa. Sartorius AG, Göttingen).	51
Abbildung 13 Arbeitsplatz unter einem Abzug zum Färben der Paraffin-Schnitte im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie Gießen. Zu sehen ist das Beispiel einer Gram- Färbereihe.....	54
Abbildung 14 Übersichtsaufnahme HE, 2,5x. Einteilung der Schnitte mittels Hilfslinien in insgesamt sechs Sektoren. In Längsrichtung wurden die Schnitte halbiert, quer gedrittelt.....	58
Abbildung 15 Übersichtsaufnahme TB, 2,5x. Einteilung der Schnitte mittels Hilfslinien in insgesamt vier Sektoren. Die Schnitte wurden jeweils in Längs- und Querausrichtung halbiert.....	58
Abbildung 16 Übersichtsaufnahme Gram, 2,5x. Einteilung der Schnitte mittels Hilfslinien in insgesamt sechs Sektoren.....	58

- Abbildung 17** Klinische Beurteilung an Tag 28 (Revision 1, *Stage 1*). Initiale OP-Narben mit Wundheilung per primam (a). Deutlich eitriger Debris (weißer Pfeil) (b), sowie massiver eitriger Ausfluss (schwarze Pfeile) (c) bei Spülung der Wunde..... 59
- Abbildung 18** Klinische Beurteilung an Tag 54 (Revision 2, *Stage 2*). Leicht eitrig tingierte Spülflüssigkeit (Pfeil) (a). Deutlich klarer als an Tag 28 (vgl. Abb. 17 (c)). Subcutane, periartikuläre Kniegelenksschwellung (Pfeile) (b). Intraoperative Pyarthros-Entleerung aus Kniegelenk Tier Nr. 8 (c). 60
- Abbildung 19** Präoperative klinische Beurteilung an Tag 84. Deutliche prätibiale Schwellung am operierten linken Hinterläuf (roter Pfeil) (a). Massive, ventral liegende periartikuläre Schwellung am operierten linken Hinterlauf (roter Pfeil) (b)..... 61
- Abbildung 20** Intraoperative, klinische Kniegelenksbeurteilung an Tag 84. Massive Pyarthrosentleerung (roter Pfeil) im Bereich des medialen Kniegelenkes unter Mitbeteiligung der Muskulatur (a). Pyarthrosentleerung aus subcutaner Weichteilgewebeschicht oberhalb des Kniegelenkes (roter Pfeil) (b). Exartikulierter Hinterlauf mit Blick auf den proximalen Gelenkanteil (c). Deutlichen Eiteraumlagerungen (rote Pfeile) (c)..... 61
- Abbildung 21** Klinische Beurteilung der gespaltenen Tibiae an Tag 84. Reste von rotem, infektfreiem Knochenmark im Meta- und Diaphysenbereich der proximalen Tibia (gelbe Pfeile). Dagegen im Diaphysenbereich purulentes Knochenmark als Zeichen einer Infektion (rote Pfeilköpfe) (a). Tibialer Markraum gänzlich mit infektbedingt purulentem Knochenmark gefüllt (rote Pfeilköpfe) (b)..... 62
- Abbildung 22** Körpergewichtsentwicklung für den Versuchszeitraum von 84 Tagen. Gewichtsentwicklung für jedes Tier im Einzelnen pro Messzeitpunkt (a). Gewicht der Tiere als arithmetischer Mittelwert pro Gruppe und Messzeitpunkt (b). Gewicht aller Tiere als arithmetischer Mittelwert pro Messzeitpunkt (c). (a), (b) und (c) jeweils ohne Berücksichtigung von Tier Nr. 6. 64
- Abbildung 23** Radiologische Beurteilung an Tag 84. Deutliche Zeichen einer Osteomyelitis mit lytischen Läsionen (gelbe Pfeile) und perisotaler Knochenaufreibung bzw. perostaler Knochenneubildung (a). Massive kortikale Aufreibung (rote Pfeilköpfe) mit erkennbarer Weichteilschwellung (roter Kasten) (b). (d) zeigt das dazugehörige klinische Erscheinungsbild. Normwertige Röntgenkontrolle des Tieres ohne radiologische Zeichen einer Osteomyelitis (c). 65
- Abbildung 24** Histologisch Analyse der an Tag 84 entnommen Tibiae in HE in verschiedenen Vergrößerungen. Es zeigen sich massive Ansammlungen von

- Abzessformationen (**a**) und Granulationsgewebe (**gt**) die sich teils im Markraum (a, b) und teils in kortikalen Spalträumen (c, d) befinden. Darüber hinaus lassen sich Knochensequester (a, Pfeile) und periostale Knochenneubildung (pb) nachweisen. In einzelnen Bereichen konnte Angiogenese (Pfeilköpfe) detektiert werden. 67
- Abbildung 25** Histologisch Analyse der an Tag 84 entnommenen Tibiae in TB in verschiedenen Vergrößerungen. Es zeigen sich zum Teil langstreckige periostale Knochenneubildungen (pb), die sich entweder an der äußeren Kortikalis (C) in Verbindung zur umgebenden Muskulatur (M) (a, b) entwickelt haben oder in den Markraum (m) (c) reichen. Im Granulationsgewebe (gt) lassen sich eine Vielzahl von Knochensequestern (Pfeile) (d) finden..... 68
- Abbildung 26** Histologisch Analyse der an Tag 84 entnommenen Tibiae in Gram-Färbung in verschiedenen Vergrößerungen. Kokkoide Ansammlungen von Bakterienformationen (Pfeile) finden sich besonders im mit Granulationsgewebe(gt) durchsetzten nekrotischen Knochenmark im Markraum (m) (a, c, d) und im Bereich ossärer Läsionen der destruierten Kortikalis (C) (b)..... 69
- Abbildung 27** Histologisch Analyse der an Tag 84 entnommenen Tibiae in TRAP-Färbung in verschiedenen Vergrößerungen. Die in der TRAP-Färbung leuchtend rot angefärbten Tatrat- resistenten Makrophagen und Osteoklasten verweisen eindrucksvoll auf die stattfindenden Umbauprozesse im entzündeten Knochen. So lassen sie sich in großer Anzahl im Bereich der angegriffenen Kortikalis (C) (a,b, c) und der periostale Knochenneubildung (pt) (a, b) finden. Außerdem sind sie für den Abbau von Knochensequester (Pfeilkopf) zuständig. Im Bereich der sich auflösenden kortikalen Integrität finden sich Abzessformationen (*) (b,d). m steht für Markraum..... 70
- Abbildung 28** Bebrütete BHI-Agarplatten nach ausrollen der initial implantierten K-Drähne an Tag 28. Lediglich OM 9 (*) zeigt eine leichte Besiedelung, wohin gegen alle anderen BHI-Agarplatten stark besiedelt sind..... 73
- Abbildung 29** Bebrütete BHI-Agarplatten nach ausrollen der erneut implantierten K-Drähte an Tag 84. Zwei Platten weisen kein Wachstum auf ((a)(*)), die restlichen eine leichte (a) bis starke (b) Besiedelung..... 73
- Abbildung 30** Grafische Darstellung der Colony Forming Units (CFUs) pro Gramm Knochenmark (a) und pro K-Draht (b) an Tag 84 des Versuchsvorhabens..... 74

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Studiendesign mit Anzahl der Tiere pro Bakterienstamm und Konzentration	40
Tabelle 2 Quantitative Bewertung Bakterienwachstum auf BHI-Agarplatten durch ausgerollte Implantate an den Tagen 28, 54 und 84	48
Tabelle 3 Protokoll zur Paraffineinbettung mittels des Leica-Paraffin-Einbettautomaten TP1050	52
Tabelle 4 Färbeprotokolle HE- und TB-Färbung (alle Schritte bei RT)	53
Tabelle 5 Färbeprotokoll Gram-Färbung (alle Schritte bei RT)	54
Tabelle 6 Färbeprotokoll TRAP-Färbung (Tartrat Resistente Saure Phosphatase) (alle Schritte, sofern nicht anders angegeben, bei RT). ¹ 35mg Naphtol-AS-Phosphat gelöst in 125 µl N-N-Dimethylformamid. ² 57,5 mg Na-Tartrat gelöst in 1 ml 0,1M Na-Acetat pH 5,2, gemischt mit 35 mg Echtrotsalz gelöst in 1 ml 0,1M Na-Acetat pH 5,2	55
Tabelle 7 Zuordnung der Osteomyelitis Einteilungskriterien zu den entsprechenden Färbungen	56
Tabelle 8 Einteilungskriterien für die einzelnen Färbungen anhand der Ausprägung des zu untersuchenden Parameters und die dazugehörige Werte-Zuordnung	57
Tabelle 9 Abschließende Beurteilung anhand entsprechend der Summe der einzelnen Einteilungskriterien	57
Tabelle 10 Ergebnisse des semiquantitativen Bewertungsscores	71
Tabelle 11 Roll-Out-Ergebnisse an den Tagen 28, 54 und 84	72
Tabelle 12 Zusammenfassung aller erhobenen Ergebnisse des Versuchsvorhabens	76

10 Literaturverzeichnis

- Abu-Amer Y, Darwech I, Clohisy JC. 2007. Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 1: S6
- Achermann Y, Stasch P, Preiss S, Lucke K, Vogt M. 2014. Characteristics and treatment outcomes of 69 cases with early prosthetic joint infections of the hip and knee. *Infection* 42: 511-9
- Adler C-P. 2004. *Knochenkrankheiten: Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts*. pp. 131-169, 3. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Aggarwal VK, Bakhshi H, Ecker NU, Parvizi J, Gehrke T, Kendoff D. 2014. Organism profile in periprosthetic joint infection: pathogens differ at two arthroplasty infection referral centers in Europe and in the United States. *J Knee Surg* 27: 399-406
- Alt V, Bitschnau A, Osterling J, Sewing A, Meyer C, et al. 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
- Amin TJ, Lamping JW, Hendricks KJ, McIff TE. 2012. Increasing the elution of vancomycin from high-dose antibiotic-loaded bone cement: a novel preparation technique. *J Bone Joint Surg Am* 94: 1946-51
- Anderl JN, Zahller J, Roe F, Stewart PS. 2003. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1251-6
- Athanasou NA, Quinn J, Bulstrode CJ. 1992. Resorption of bone by inflammatory cells derived from the joint capsule of hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Br* 74: 57-62
- Azzam K, McHale K, Austin M, Purtill JJ, Parvizi J. 2009. Outcome of a second two-stage reimplantation for periprosthetic knee infection. *Clin Orthop Relat Res* 467: 1706-14
- Bauer TW, Parvizi J, Kobayashi N, Krebs V. 2006. Diagnosis of periprosthetic infection. *J Bone Joint Surg Am* 88: 869-82

- Belmatoug N, Cremieux AC, Bleton R, Volk A, Saleh-Mghir A, et al. 1996. A new model of experimental prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a microbiologic, histopathologic, and magnetic resonance imaging characterization. *J Infect Dis* 174: 414-7
- Bendinger B, Rijnaarts HH, Altendorf K, Zehnder AJ. 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl Environ Microbiol* 59: 3973-7
- Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, et al. 1998. Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clin Infect Dis* 27: 1247-54
- Berbari EF, Marculescu C, Sia I, Lahr BD, Hanssen AD, et al. 2007. Culture-negative prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis* 45: 1113-9
- Bernard L, Vaudaux P, Merle C, Stern R, Huggler E, et al. 2005. The inhibition of neutrophil antibacterial activity by ultra-high molecular weight polyethylene particles. *Biomaterials* 26: 5552-7
- Bialecki J, Bucsi L, Fernando N, Foguet P, Guo S, et al. 2019. Hip and Knee Section, Treatment, One Stage Exchange: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. *J Arthroplasty* 34: S421-S26
- Biring GS, Kostamo T, Garbuz DS, Masri BA, Duncan CP. 2009. Two-stage revision arthroplasty of the hip for infection using an interim articulated Prostalac hip spacer: a 10- to 15-year follow-up study. *J Bone Joint Surg Br* 91: 1431-7
- Bleß H, Kip M. 2017. *Weißbuch Gelenkersatz - Versorgungssituation endoprothetischer Hüft- und Knieoperationen in Deutschland*. pp. 1-15. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, Ong K, Chiu V, et al. 2010. The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States. *Clin Orthop Relat Res* 468: 45-51
- Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, Ong K, Vail TP, Berry DJ. 2009. The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the United States. *J Bone Joint Surg Am* 91: 128-33
- Bozic KJ, Ries MD. 2005. The impact of infection after total hip arthroplasty on hospital and surgeon resource utilization. *J Bone Joint Surg Am* 87: 1746-51
- Brandt CM, Sistrunk WW, Duffy MC, Hanssen AD, Steckelberg JM, et al. 1997. *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection treated with debridement and prosthesis retention. *Clin Infect Dis* 24: 914-9

- Brochin RL, Phan K, Poeran J, Zubizarreta N, Galatz LM, Moucha CS. 2018. Trends in Periprosthetic Hip Infection and Associated Costs: A Population-Based Study Assessing the Impact of Hospital Factors Using National Data. *J Arthroplasty* 33: S233-S38
- Brunotte M, Rupp M, Stotzel S, Sommer U, Mohammed W, et al. 2019. A new small animal model for simulating a two-stage-revision procedure in implant-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bone infection. *Injury*
- Carli AV, Ross FP, Bhimani SJ, Nodzo SR, Bostrom MP. 2016. Developing a Clinically Representative Model of Periprosthetic Joint Infection. *J Bone Joint Surg Am* 98: 1666-76
- Castelli CC, Gotti V, Ferrari R. 2014. Two-stage treatment of infected total knee arthroplasty: two to thirteen year experience using an articulating preformed spacer. *Int Orthop* 38: 405-12
- Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. 2018. Sepsis and septic shock. *Lancet* 392: 75-87
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 37: 1771-6
- Charnley J. 1960. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br* 42-B: 28-30
- Charnley J. 1961. Arthroplasty of the hip. A new operation. *Lancet* 1: 1129-32
- Charnley J. 1970. Total hip replacement by low-friction arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 72: 7-21
- Claes L, Kirschner P, Perka C, Rudert M. 2012a. *AE-Manual der Endoprothetik: Hüfte und Hüftrevision*. Springer-Verlag, Heidelberg, Dordrecht, London, New York.
- Claes L, Recknagel S, Ignatius A. 2012b. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 8: 133-43
- Cochran AR, Ong KL, Lau E, Mont MA, Malkani AL. 2016. Risk of Reinfection After Treatment of Infected Total Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty* 31: 156-61
- Cooper HJ, Della Valle CJ. 2013. The two-stage standard in revision total hip replacement. *Bone Joint J* 95-B: 84-7
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-22

- Craig MR, Poelstra KA, Sherrell JC, Kwon MS, Belzile EL, Brown TE. 2005. A novel total knee arthroplasty infection model in rabbits. *J Orthop Res* 23: 1100-4
- Cui Q, Mihalko WM, Shields JS, Ries M, Saleh KJ. 2007. Antibiotic-impregnated cement spacers for the treatment of infection associated with total hip or knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 89: 871-82
- Dale H, Hallan G, Hallan G, Espehaug B, Havelin LI, Engesaeter LB. 2009. Increasing risk of revision due to deep infection after hip arthroplasty. *Acta Orthop* 80: 639-45
- Darley ES, Bannister GC, Blom AW, Macgowan AP, Jacobson SK, Alfouzan W. 2011. Role of early intravenous to oral antibiotic switch therapy in the management of prosthetic hip infection treated with one- or two-stage replacement. *J Antimicrob Chemother* 66: 2405-8
- Darouiche RO. 2004. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 350: 1422-9
- Daver NG, Shelburne SA, Atmar RL, Giordano TP, Stager CE, et al. 2007. Oral step-down therapy is comparable to intravenous therapy for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *J Infect* 54: 539-44
- Donlan RM. 2000. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* 46: S47-52
- Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8: 881-90
- Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167-93
- El-Kamel AH, Baddour MM. 2007. Gatifloxacin biodegradable implant for treatment of experimental osteomyelitis: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Deliv* 14: 349-56
- Ersoz G, Oztuna V, Coskun B, Eskandari MM, Bayarslan C, Kaya A. 2004. Addition of fusidic acid impregnated bone cement to systemic teicoplanin therapy in the treatment of rat osteomyelitis. *J Chemother* 16: 51-5
- Esposito S, Leone S, Bassetti M, Borre S, Leoncini F, et al. 2009. Italian guidelines for the diagnosis and infectious disease management of osteomyelitis and prosthetic joint infections in adults. *Infection* 37: 478-96
- Fink B, Vogt S, Reinsch M, Buchner H. 2011. Sufficient release of antibiotic by a spacer 6 weeks after implantation in two-stage revision of infected hip prostheses. *Clin Orthop Relat Res* 469: 3141-7

- Fischbacher A, Borens O. 2019. Prosthetic-joint Infections: Mortality Over The Last 10 Years. *J Bone Jt Infect* 4: 198-202
- Flemming H-CW, J.; Griegbe; Mayer, C. . 2000. Physico-chemical properties of biofilms. In *Biofilms: recent advances in their study and control.*, ed. e Evans LV, pp. 19-34. Amsterdam: Harwood Academic Publishers
- Fletcher M, Loeb GI. 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 37: 67-72
- Gaudin A, Amador Del Valle G, Hamel A, Le Mabecque V, Miegerville AF, et al. 2011. A new experimental model of acute osteomyelitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rabbit. *Lett Appl Microbiol* 52: 253-7
- Gehrke T, Zahar A, Kendoff D. 2013. One-stage exchange: it all began here. *Bone Joint J* 95-B: 77-83
- Giavaresi G, Borsari V, Fini M, Giardino R, Sambri V, et al. 2008. Preliminary investigations on a new gentamicin and vancomycin-coated PMMA nail for the treatment of bone and intramedullary infections: An experimental study in the rabbit. *J Orthop Res* 26: 785-92
- Gluck T. 1890a. Autoplastik - Transplantation - Implantation von Fremdkörpern. *Berl Klin Wschr* 27: 421-27
- Gluck T. 1890b. Die Invaginationsmethode der Osteo- und Arthroplastik. *Berlin Klin Wochenschr* 33: 732-57
- Gluck T. 1891. Referat über die durch das moderne chirurgische Experiment gewonnenen positiven Resultate, betreffend die Naht und den Ersatz von Defekten höherer Gewebe, sowie über die Verwertung resorbierbarer und lebendiger Tampons in der Chirurgie. *Arch f Klin Chir* 41: 187-239
- Griffin G, Clark JM, Zurlo J, Ritskes-Hoitinga M. 2014. Scientific uses of animals: harm-benefit analysis and complementary approaches to implementing the three Rs. *Rev Sci Tech* 33: 265-72
- Gristina AG. 1987. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237: 1588-95
- Gristina AG, Costerton JW. 1984. Bacterial adherence and the glycocalyx and their role in musculoskeletal infection. *Orthop Clin North Am* 15: 517-35
- Gristina AG, Costerton JW. 1985. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg Am* 67: 264-73

- Gristina AG, Hobgood CD, Webb LX, Myrvik QN. 1987. Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. *Biomaterials* 8: 423-6
- Gristina AG, Rovere GD, Shoji H, Nicastro JF. 1976. An in vitro study of bacterial response to inert and reactive metals and to methyl methacrylate. *J Biomed Mater Res* 10: 273-81
- Gundtoft PH, Pedersen AB, Varnum C, Overgaard S. 2017. Increased Mortality After Prosthetic Joint Infection in Primary THA. *Clin Orthop Relat Res*
- Haboush EJ. 1953. A new operation for arthroplasty of the hip based on biomechanics, photoelasticity, fast-setting dental acrylic, and other considerations. *Bull Hosp Joint Dis* 14: 242-77
- Hausner M, Wuertz S. 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol* 65: 3710-3
- Helbig L, Simank HG, Lorenz H, Putz C, Wolf C, et al. 2014. Establishment of a new methicillin resistant *Staphylococcus aureus* animal model of osteomyelitis. *Int Orthop* 38: 891-7
- Henderson RA, Austin MS. 2017. Management of Periprosthetic Joint Infection: The More We Learn, the Less We Know. *J Arthroplasty* 32: 2056-59
- Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew PD, et al. 1988. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* 158: 693-701
- Hofmann AA, Goldberg TD, Tanner AM, Cook TM. 2005. Ten-year experience using an articulating antibiotic cement hip spacer for the treatment of chronically infected total hip. *J Arthroplasty* 20: 874-9
- Holladay SD, Smialowicz RJ. 2000. Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3: 463-73
- Holsapple MP, West LJ, Landreth KS. 2003. Species comparison of anatomical and functional immune system development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 68: 321-34
- Holt PG, Jones CA. 2000. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy* 55: 688-97
- Hussain M, Wilcox MH, White PJ. 1993. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev* 10: 191-207

- Insall JN, Thompson FM, Brause BD. 1983. Two-stage reimplantation for the salvage of infected total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 65: 1087-98
- Ismael F, Bleton R, Saleh-Mghir A, Dautrey S, Massias L, Cremieux AC. 2003. Teicoplanin-Containing Cement Spacers for Treatment of Experimental Staphylococcus aureus Joint Prosthesis Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 3365-67
- Judet J, Judet R. 1950. The use of an artificial femoral head for arthroplasty of the hip joint. *J Bone Joint Surg Br* 32-B: 166-73
- Kahlenberg CA, Nwachukwu BU, McLawhorn AS, Cross MB, Cornell CN, Padgett DE. 2018. Patient Satisfaction After Total Knee Replacement: A Systematic Review. *HSS J* 14: 192-201
- Kapadia B, Berg R, Daley J, Fritz J, Bhave A, Mont A. 2016. Periprosthetic joint infection. *Lancet*: 386-94
- Kaplan SS, Heine RP, Simmons RL. 1999. Defensins impair phagocytic killing by neutrophils in biomaterial-related infection. *Infect Immun* 67: 1640-5
- Kilgus DJ, Howe DJ, Strang A. 2002. Results of periprosthetic hip and knee infections caused by resistant bacteria. *Clin Orthop Relat Res*: 116-24
- Klock JC, Stossel TP. 1977. Detection, pathogenesis, and prevention of damage to human granulocytes caused by interaction with nylon wool fiber. Implications for filtration leukapheresis. *J Clin Invest* 60: 1183-90
- Koenig L, Zhang Q, Austin MS, Demiralp B, Fehring TK, et al. 2016. Estimating the Societal Benefits of THA After Accounting for Work Status and Productivity: A Markov Model Approach. *Clin Orthop Relat Res* 474: 2645-54
- Koh CK, Zeng I, Ravi S, Zhu M, Vince KG, Young SW. 2017. Periprosthetic Joint Infection Is the Main Cause of Failure for Modern Knee Arthroplasty: An Analysis of 11,134 Knees. *Clin Orthop Relat Res* 475: 2194-201
- Krukemeyer M, Möllenhof G. 2012. *Endoprothetik: Ein Leitfaden für Praktiker*. De Gruyter.
- Kubista B, Hartzler RU, Wood CM, Osmon DR, Hanssen AD, Lewallen DG. 2012. Reinfection after two-stage revision for periprosthetic infection of total knee arthroplasty. *Int Orthop* 36: 65-71
- Kunutsor SK, Whitehouse MR, Blom AW, Beswick AD, Team I. 2016. Patient-Related Risk Factors for Periprosthetic Joint Infection after Total Joint Arthroplasty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 11: e0150866

- Kurd MF, Ghanem E, Steinbrecher J, Parvizi J. 2010. Two-stage exchange knee arthroplasty: does resistance of the infecting organism influence the outcome? *Clin Orthop Relat Res* 468: 2060-6
- Kurtz S, Mowat F, Ong K, Chan N, Lau E, Halpern M. 2005. Prevalence of primary and revision total hip and knee arthroplasty in the United States from 1990 through 2002. *J Bone Joint Surg Am* 87: 1487-97
- Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. 2007a. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* 89: 780-5
- Kurtz SM, Lau E, Schmier J, Ong KL, Zhao K, Parvizi J. 2008. Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty* 23: 984-91
- Kurtz SM, Ong KL, Lau E, Bozic KJ, Berry D, Parvizi J. 2010. Prosthetic joint infection risk after TKA in the Medicare population. *Clin Orthop Relat Res* 468: 52-6
- Kurtz SM, Ong KL, Schmier J, Mowat F, Saleh K, et al. 2007b. Future clinical and economic impact of revision total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 89 Suppl 3: 144-51
- Laffer RR, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W. 2006. Outcome of prosthetic knee-associated infection: evaluation of 40 consecutive episodes at a single centre. *Clin Microbiol Infect* 12: 433-9
- Lamagni T. 2014. Epidemiology and burden of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* 69 Suppl 1: i5-10
- Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. 2007. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet* 370: 1508-19
- Lewis G, Brooks JL, Courtney HS, Li Y, Haggard WO. 2010. An Approach for determining antibiotic loading for a physician-directed antibiotic-loaded PMMA bone cement formulation. *Clin Orthop Relat Res* 468: 2092-100
- Li HK, Rombach I, Zambellas R, Walker AS, McNally MA, et al. 2019. Oral versus Intravenous Antibiotics for Bone and Joint Infection. *N Engl J Med* 380: 425-36
- Lichstein P, Gehrke T, Lombardi A, Romano C, Stockley I, et al. 2014. One-stage vs two-stage exchange. *J Arthroplasty* 29: 108-11
- Lito S, Lomessy A., Vaudaux P., Uçkay I. 2015. Chronic Osteomyelitis in Adults In *Bone and Joint Infections : From Microbiology to Diagnostics and Treatment*, pp. 257-72: John Wiley & Sons, Inc.

- Liu Y, Tay JH. 2001. Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *J Appl Microbiol* 90: 337-42
- Loew M. 2010. *AE-Manual der Endoprothetik: Schulter*. Springer-Verlag, Heidelberg, Dordrecht, London, New York.
- Lopes JD, dos Reis M, Brentani RR. 1985. Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. *Science* 229: 275-7
- Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA, Soriano A, Sanchez-Somolinos M, et al. 2013. A large multicenter study of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections managed with implant retention. *Clin Infect Dis* 56: 182-94
- Malizos KN. 2017. Global Forum: The Burden of Bone and Joint Infections: A Growing Demand for More Resources. *J Bone Joint Surg Am* 99: e20
- Martens E, Demain AL. 2017. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *J Antibiot (Tokyo)* 70: 520-26
- McKee G, Watson-Farrar J. 1966. Replacement of arthritic hips by the McKee-Farrar prosthesis. *THE JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY* 48-B: 245-59
- Meehan AM, Osmon DR, Duffy MC, Hanssen AD, Keating MR. 2003. Outcome of penicillin-susceptible streptococcal prosthetic joint infection treated with debridement and retention of the prosthesis. *Clin Infect Dis* 36: 845-9
- Metsemakers WJ, Kuehl R, Moriarty TF, Richards RG, Verhofstad MHJ, et al. 2018. Infection after fracture fixation: Current surgical and microbiological concepts. *Injury* 49: 511-22
- Minassian AM, Osmon DR, Berendt AR. 2014. Clinical guidelines in the management of prosthetic joint infection. *J Antimicrob Chemother* 69 Suppl 1: i29-35
- Moore AT. 1952. Metal hip joint; a new self-locking vitallium prosthesis. *South Med J* 45: 1015-19
- Moriarty TF, Schmid T, Post V, Samara E, Kates S, et al. 2017. A large animal model for a failed two-stage revision of intramedullary nail-related infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur Cell Mater* 34: 83-98
- Morscher E. 1995. *Endoprothetik*. pp. 3-20, 1. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Nagra NS, Hamilton TW, Ganatra S, Murray DW, Pandit H. 2016. One-stage versus two-stage exchange arthroplasty for infected total knee arthroplasty: a systematic review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 24: 3106-14

- Neumann H. 2012. *AE-Manual der Endoprothetik: Sprunggelenk und Fuß*. Springer-Verlag, Heidelberg, Dordrecht, London, New York.
- Niska JA, Shahbazian JH, Ramos RI, Pribaz JR, Billi F, et al. 2012. Daptomycin and tigecycline have broader effective dose ranges than vancomycin as prophylaxis against a *Staphylococcus aureus* surgical implant infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 2590-7
- O'Neill. 2016. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations
- Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet Infectious Diseases* 2: 180-89
- Ong KL, Kurtz SM, Lau E, Bozic KJ, Berry DJ, Parvizi J. 2009. Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the Medicare population. *J Arthroplasty* 24: 105-9
- Orhan Z, Cevher E, Yildiz A, Ahiskali R, Sensoy D, Mulazimoglu L. 2010. Biodegradable microspherical implants containing teicoplanin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Arch Orthop Trauma Surg* 130: 135-42
- Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, et al. 2013. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 56: e1-e25
- Otto-Lambertz C, Yagdiran A, Wallscheid F, Eysel P, Jung N. 2017. Periprosthetic Infection in Joint Replacement. *Dtsch Arztebl Int* 114: 347-53
- Pandey R, Berendt AR, Athanasou NA. 2000. Histological and microbiological findings in non-infected and infected revision arthroplasty tissues. The OSIRIS Collaborative Study Group. Oxford Skeletal Infection Research and Intervention Service. *Arch Orthop Trauma Surg* 120: 570-4
- Parvizi J, Azzam K, Ghanem E, Austin MS, Rothman RH. 2009. Periprosthetic infection due to resistant staphylococci: serious problems on the horizon. *Clin Orthop Relat Res* 467: 1732-9
- Parvizi J, Della Valle CJ. 2010. AAOS Clinical Practice Guideline: diagnosis and treatment of periprosthetic joint infections of the hip and knee. *J Am Acad Orthop Surg* 18: 771-2

- Parvizi J, Gehrke T, Chen AF. 2013. Proceedings of the International Consensus on Periprosthetic Joint Infection. *Bone Joint J* 95-B: 1450-2
- Parvizi J, Ghanem E, Menashe S, Barrack RL, Bauer TW. 2006. Periprosthetic infection: what are the diagnostic challenges? *J Bone Joint Surg Am* 88 Suppl 4: 138-47
- Parvizi J, Ghanem E, Sharkey P, Aggarwal A, Burnett RS, Barrack RL. 2008. Diagnosis of infected total knee: findings of a multicenter database. *Clin Orthop Relat Res* 466: 2628-33
- Parvizi J, Jacovides C, Zmistowski B, Jung KA. 2011a. Definition of periprosthetic joint infection: is there a consensus? *Clin Orthop Relat Res* 469: 3022-30
- Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, et al. 2018. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty* 33: 1309-14 e2
- Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, Bauer TW, Springer BD, et al. 2011b. New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin Orthop Relat Res* 469: 2992-4
- Penner MJ, Duncan CP, Masri BA. 1999. The in vitro elution characteristics of antibiotic-loaded CMW and Palacos-R bone cements. *J Arthroplasty* 14: 209-14
- Pringle JH, Fletcher M. 1983. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 45: 811-7
- Pulido L, Ghanem E, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. 2008. Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors. *Clin Orthop Relat Res* 466: 1710-5
- Ravi S, Zhu M, Luey C, Young SW. 2016. Antibiotic resistance in early periprosthetic joint infection. *ANZ J Surg* 86: 1014-18
- Reizer W, Hunter JG, O'Malley NT, Southgate RD, Schwarz EM, Kates SL. 2015. A systemic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *NIH Author Manuscript*
- Roberts AP, Pratten J, Wilson M, Mullany P. 1999. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol Lett* 177: 63-6
- Robertson KA, Bertot AJ, Wolfe MW, Barrack RL. 2000. Patient compliance and satisfaction with mechanical devices for preventing deep venous thrombosis after joint replacement. *J South Orthop Assoc* 9: 182-6

- Rosteius T, Jansen O, Fehmer T, Baecker H, Citak M, et al. 2018. Evaluating the microbial pattern of periprosthetic joint infections of the hip and knee. *J Med Microbiol* 67: 1608-13
- Rowan FE, Donaldson MJ, Pietrzak JR, Haddad FS. 2018. The Role of One-Stage Exchange for Prosthetic Joint Infection. *Curr Rev Musculoskelet Med* 11: 370-79
- Ruiz D, Jr., Koenig L, Dall TM, Gallo P, Narzikul A, et al. 2013. The direct and indirect costs to society of treatment for end-stage knee osteoarthritis. *J Bone Joint Surg Am* 95: 1473-80
- Russell W, Burch R. 1959. Part Two: The Progress of Human Technique In *The Principles of Human Experimental Technique*, pp. 69-154: Methuen&Co Ltd. London
- Rüther W, Simmen B. 2013. *AE-Manual der Endoprothetik: Ellenbogen*. Springer-Verlag, Heidelberg, Dordrecht, London, New York.
- S. M. Javad Mortazavi MD DVM, Anthony Ho BA, Benjamin Zmistowski BS, Javad Parvizi MD, FRCS. 2011. Two-stage Exchange Arthroplasty for Infected Total Knee Arthroplasty: Predictors of Failure. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 469: 3049–54
- Saginur R, Stdenis M, Ferris W, Aaron SD, Chan F, et al. 2006. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 55-61
- Salgado CD, Dash S, Cantey JR, Marculescu CE. 2007. Higher risk of failure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections. *Clin Orthop Relat Res* 461: 48-53
- Schinsky MF, Della Valle CJ, Sporer SM, Paprosky WG. 2008. Perioperative testing for joint infection in patients undergoing revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 90: 1869-75
- Schroeder K, Simank HG, Lorenz H, Swoboda S, Geiss HK, Helbig L. 2012. Implant stability in the treatment of MRSA bone implant infections with linezolid versus vancomycin in a rabbit model. *J Orthop Res* 30: 190-5
- Segawa H, Tsukayama DT, Kyle RF, Becker DA, Gustilo RB. 1999. Infection after total knee arthroplasty. A retrospective study of the treatment of eighty-one infections. *J Bone Joint Surg Am* 81: 1434-45
- Sendi P, Lotscher PO, Kessler B, Graber P, Zimmerli W, Clauss M. 2017. Debridement and implant retention in the management of hip periprosthetic joint infection:

- outcomes following guided and rapid treatment at a single centre. *Bone Joint J* 99-B: 330-36
- Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. 2006. Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis* 43: 961-7
- Sendi P, Zimmerli W. 2017. The use of rifampin in staphylococcal orthopaedic-device-related infections. *Clin Microbiol Infect* 23: 349-50
- Shahi A, Tan TL, Kheir MM, Tan DD, Parvizi J. 2017. Diagnosing Periprosthetic Joint Infection: And the Winner Is? *J Arthroplasty* 32: S232-S35
- Shandley S, Matthews KP, Cox J, Romano D, Abplanalp A, Kalns J. 2012. Hyperbaric oxygen therapy in a mouse model of implant-associated osteomyelitis. *J Orthop Res* 30: 203-8
- Siddiqui MM, Lo NN, Ab Rahman S, Chin PL, Chia SL, Yeo SJ. 2013. Two-year outcome of early deep MRSA infections after primary total knee arthroplasty: a joint registry review. *J Arthroplasty* 28: 44-8
- Singh JA, Vessely MB, Harmsen WS, Schleck CD, Melton LJ, 3rd, et al. 2010. A population-based study of trends in the use of total hip and total knee arthroplasty, 1969-2008. *Mayo Clin Proc* 85: 898-904
- Smeltzer MS, Thomas JR, Hickmon SG, Skinner RA, Nelson CL, et al. 1997. Characterization of a Rabbit Model of Staphylococcal Osteomyelitis. *Journal of Orthopaedic Research*: 414-21
- Smith-Petersen MN. 1978. The classic: Evolution of mould arthroplasty of the hip joint by M. N. Smith-Petersen, *J. Bone Joint Surg.* 30B:L:59, 1948. *Clin Orthop Relat Res*: 5-11
- Soballe K, Hansen ES, H BR, Jorgensen PH, Bunger C. 1992. Tissue ingrowth into titanium and hydroxyapatite-coated implants during stable and unstable mechanical conditions. *J Orthop Res* 10: 285-99
- Societe de Pathologie Infectieuse de Langue F, College des Universitaires de Maladies Infectieuses et T, Groupe de Pathologie Infectieuse P, Societe Francaise d'Anesthesie et de R, Societe Francaise de Chirurgie Orthopedique et T, et al. 2010. Recommendations for bone and joint prosthetic device infections in clinical practice (prosthesis, implants, osteosynthesis). Societe de Pathologie Infectieuse de Langue Francaise. *Med Mal Infect* 40: 185-211

- Soriano A, Garcia S, Bori G, Almela M, Gallart X, et al. 2006. Treatment of acute post-surgical infection of joint arthroplasty. *Clin Microbiol Infect* 12: 930-3
- Staats K, Boehler C, Frenzel S, Puchner SE, Holinka J, Windhager R. 2017. Failed Two-Stage Exchange: Factors Leading to Unachievable Endoprosthetic Reconstruction After Multiple Revision Surgeries. *J Arthroplasty*
- Steckelberg JMO, D.R. 2000. Prosthetic joint infections In *Infections associated with indwelling medical devices*, ed. FABALe Waldvogel, pp. 173-209. Washington D.C.: American Society for Microbiology
- Stefani S, Varaldo PE. 2003. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 9: 1179-86
- Stoodley PB, J.D.; Dodds, I.; Lappin-Scott, H.M. 1997. Consensus model of biofilm structure. In *Biofilms: community interactions and control.*, ed. JWTG Wimpenny, P.S.; Lappin-Scott, H.M.; Jones, M., pp. 1-9. Cardiff, UK: Bioline
- Strohm PC, Raschke M, Hoffmann R, Josten C. 2015. [Hip fracture prosthetics in German trauma surgery. State of the art]. *Unfallchirurg* 118: 173-6
- Sutherland I. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147: 3-9
- Szeker S, Fogarassy G, Vathy-Fogarassy A. 2017. Comparison of Control Group Generating Methods. *Stud Health Technol Inform* 236: 311-18
- Tarabichi M, Fleischman AN, Shahi A, Tian S, Parvizi J. 2017. Interpretation of Leukocyte Esterase for the Detection of Periprosthetic Joint Infection Based on Serologic Markers. *J Arthroplasty* 32: S97-S100 e1
- Tattevin P, Cremieux AC, Pottier P, Hutten D, Carbon C. 1999. Prosthetic joint infection: when can prosthesis salvage be considered? *Clin Infect Dis* 29: 292-5
- Tetrycz D, Ferry T, Lew D, Stern R, Assal M, et al. 2010. Outcome of orthopedic implant infections due to different staphylococci. *Int J Infect Dis* 14: e913-8
- Thakrar RR, Horriat S, Kayani B, Haddad FS. 2019. Indications for a single-stage exchange arthroplasty for chronic prosthetic joint infection: a systematic review. *Bone Joint J* 101-B: 19-24
- Tiemann A, Hofmann GO, Krukemeyer MG, Krenn V, Langwald S. 2014. Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score (HOES) - an innovative approach to histopathological diagnostics and scoring of osteomyelitis. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW* 3: 1-12

- Tigges S, Stiles RG, Roberson JR. 1994. Appearance of septic hip prostheses on plain radiographs. *AJR Am J Roentgenol* 163: 377-80
- Tolker-Nielsen T, Molin S. 2000. Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microb Ecol* 40: 75-84
- Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, et al. 2007. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE* 357: 654-63
- Trampuz A, Zimmerli W. 2005. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly* 135: 243-51
- Trampuz A, Zimmerli W. 2008. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis. *Curr Infect Dis Rep* 10: 394-403
- Triantafyllopoulos GK, Soranoglou V, Memtsoudis SG, Poultsides LA. 2016. Implant retention after acute and hematogenous periprosthetic hip and knee infections: Whom, when and how? *World J Orthop* 7: 546-52
- Triffault-Fillit C, Ferry T, Laurent F, Pradat P, Dupieux C, et al. 2019. Microbiologic epidemiology depending on time to occurrence of prosthetic joint infection: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect* 25: 353-58
- Tsai Y, Chang CH, Lin YC, Lee SH, Hsieh PH, Chang Y. 2019. Different microbiological profiles between hip and knee prosthetic joint infections. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 27: 2309499019847768
- Tuzuner T, Sencan I, Ozdemir D, Alper M, Duman S, et al. 2006. In vivo evaluation of teicoplanin- and calcium sulfate-loaded PMMA bone cement in preventing implant-related osteomyelitis in rats. *J Chemother* 18: 628-33
- Valls J. 1952. A new Prosthesis for arthroplasty of the hip. *THE JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY* 34-B: 308-10
- Vaudaux P, Pittet D, Haeberli A, Lerch PG, Morgenthaler JJ, et al. 1993. Fibronectin is more active than fibrin or fibrinogen in promoting *Staphylococcus aureus* adherence to inserted intravascular catheters. *J Infect Dis* 167: 633-41
- Verhoef J. 1991. The phagocytic process and the role of complement in host defense. *J Chemother* 3 Suppl 1: 93-7
- Voleti PB, Baldwin KD, Lee GC. 2013. Use of static or articulating spacers for infection following total knee arthroplasty: a systematic literature review. *J Bone Joint Surg Am* 95: 1594-9

- Vuong C, Gerke C, Somerville GA, Fischer ER, Otto M. 2003. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 188: 706-18
- Wang FD, Wang YP, Chen CF, Chen HP. 2018. The incidence rate, trend and microbiological aetiology of prosthetic joint infection after total knee arthroplasty: A 13 years' experience from a tertiary medical center in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 51: 717-22
- Wengler A, Nimptsch U, Mansky T. 2014. Hip and knee replacement in Germany and the USA: analysis of individual inpatient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011. *Dtsch Arztebl Int* 111: 407-16
- Wijeyekoon S, Mino T, Satoh H, Matsuo T. 2004. Effects of substrate loading rate on biofilm structure. *Water Res* 38: 2479-88
- Wiles P. 1958. The Surgery of the osteo-arthritic hip. *British Journal of Surgery* 45: 488-97
- Williams DL, Haymond BS, Beck JP, Savage PB, Chaudhary V, et al. 2012a. In vivo efficacy of a silicone cationic steroid antimicrobial coating to prevent implant-related infection. *Biomaterials* 33: 8641-56
- Williams DL, Haymond BS, Woodbury KL, Beck JP, Moore DE, et al. 2012b. Experimental model of biofilm implant-related osteomyelitis to test combination biomaterials using biofilms as initial inocula. *J Biomed Mater Res A* 100: 1888-900
- Windsor RE. 1991. Management of total knee arthroplasty infection. *Orthop Clin North Am* 22: 531-8
- Wirtz D. 2011. *AE-Manual der Endoprothetik: Knie*. Springer-Verlag, Heidelberg, Dordrecht, London, New York.
- Workgroup Convened by the Musculoskeletal Infection S. 2011. New definition for periprosthetic joint infection. *J Arthroplasty* 26: 1136-8
- Wright DG, Gallin JJ. 1979. Secretory responses of human neutrophils: exocytosis of specific (secondary) granules by human neutrophils during adherence in vitro and during exudation in vivo. *J Immunol* 123: 285-94
- Wyatt MC, Beswick AD, Kunutsor SK, Wilson MJ, Whitehouse MR, Blom AW. 2016. The Alpha-Defensin Immunoassay and Leukocyte Esterase Colorimetric Strip Test for the Diagnosis of Periprosthetic Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Bone Joint Surg Am* 98: 992-1000

- Yen HT, Hsieh RW, Huang CY, Hsu TC, Yeh T, et al. 2019. Short-course versus long-course antibiotics in prosthetic joint infections: a systematic review and meta-analysis of one randomized controlled trial plus nine observational studies. *J Antimicrob Chemother* 74: 2507-16
- Zajonz D, Wuthe L, Rodloff AC, Prietzel T, von Salis-Soglio GF, et al. 2016. [Infections of hip and knee endoprostheses. Spectrum of pathogens and the role of multiresistant bacteria]. *Chirurg* 87: 332-9
- Zeller V, Kerroumi Y, Meyssonier V, Heym B, Metten MA, et al. 2018. Analysis of postoperative and hematogenous prosthetic joint-infection microbiological patterns in a large cohort. *J Infect* 76: 328-34
- Zimmerli W. 2006. Infection and musculoskeletal conditions: Prosthetic-joint-associated infections. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20: 1045-63
- Zimmerli W. 2015. Periprosthetic Joint Infection: General Aspects In *Bone and Joint Infections: From Microbiology to Diagnostics and Treatment*, pp. 113-29: John Wiley&Sons, Inc.
- Zimmerli W, Lew PD, Waldvogel FA. 1984. Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. *J Clin Invest* 73: 1191-200
- Zimmerli W, Moser C. 2012. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65: 158-68
- Zimmerli W, Sendi P. 2011. Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. *Semin Immunopathol* 33: 295-306
- Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE. 1982. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis* 146: 487-97
- Zimmerli WT, A; and Ochsner, PE. 2004. Prosthetic-Joint Infections. *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE* 351: 1645-54
- Zmistowski B, Della Valle C, Bauer TW, Malizos KN, Alavi A, et al. 2014. Diagnosis of periprosthetic joint infection. *J Arthroplasty* 29: 77-83
- Zmistowski B, Karam JA, Durinka JB, Casper DS, Parvizi J. 2013. Periprosthetic joint infection increases the risk of one-year mortality. *J Bone Joint Surg Am* 95: 2177-84
- Zurlo J, Rudacille D, Goldberg AM. 1996. The three Rs: the way forward. *Environ Health Perspect* 104: 878-80

11 Anhang

-Scoresheet

-Genehmigung Tierversuch

12 Publikationsverzeichnis

Brunotte M., Rupp M., Stotzel S., Sommer U., Mohammed W., Thormann, U., Heiss, C., Lips, K.S., Domann E., Alt V.. eng., Injury. 2019 Aug 15. pii: S0020-1383(19)30490-5. doi: 10.1016/j.injury.2019.08.017.

13 Posterbeitrag

M. Brunotte, S. Stötzel, U. Sommer, W. Mohamed, C. Heiss, K. Lips, E. Domann, V. Alt: Etablierung eines Tiermodells zur Simulation einer „Two-Stage-Revision-Procedure“ bei MRSA Protheseninfektionen. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin 2016

14 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

15 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Volker Alt. Er war es der mir die Möglichkeit bot sich mit diesem spannenden und zukunftssträchtigen Thema auseinanderzusetzen. Für Fragen, Ideen und Vorschläge hatte er jederzeit ein offenes und verständnisvolles Ohr. Mein Dank gilt ihm aber nicht nur in Bezug auf diese Dissertation, sondern auch für seine motivierende und fördernde Art, welche auf meinen beruflichen Weg einen besonderen Einfluss hatte.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Heiß, Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen, möchte ich mich herzlich für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Abteilung durchführen zu können bedanken.

Darüber hinaus gebührt ein großer Dank allen Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie Gießen für die vielfältigen Arbeiten, die für dieses Projekt geleistet wurden.

Herrn Dr. Walid Mohamed möchte ich an dieser Stelle im Speziellen und stellvertretend für die Mitarbeiter des Instituts für experimentelle Mikrobiologie für die Bereitstellung der Bakterienstämme danken.

Den Mitarbeitern der Tierklinik Bad Langensalza der fzmb GmbH gilt ebenfalls besonderer Dank. Die Möglichkeit die Vielzahl an Operationen in Ihren Räumlichkeiten durchführen zu können und die nachfolgende hervorragende Betreuung der Tiere war eine Grundvoraussetzung für das Gelingen des Projekts. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Ute Altmann bedanken, die trotz vieler Nachfragen jederzeit und umgehende und freundliche Antwort parat hatte.

Der Firma aap Implantate AG, Berlin danke ich für die Herstellung der Antibiotika-Spacer.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie ganz besonders danken. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung und aufrichtige Fürsorge wäre diese Arbeit und vieles mehr nicht möglich gewesen. Rhea Veelken danke ich im Speziellen für die mir entgegengebrachte Geduld, nie fehlende Motivation und den stets konstruktiven Austausch. Nur so konnten wir unsere Promotionsprojekte gemeinsam meistern.

16 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae has been removed from the electronic version.