

***In-vivo*-Wirksamkeit von mikroporösem metallischen  
Silber in Polymethylmethacrylat-Knochenzement gegen  
Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus***

**Eine experimentelle Studie am Kaninchen**

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

vorgelegt von  
Stefan Meißner  
aus Kaufbeuren

Gießen 2014

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der  
Universitätsklinik Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Gießen

Direktor: Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Volker Alt

Gutachter: Prof. Dr. Eugen Domann

Tag der Disputation: 16. September 2014

# Widmung

Meinem Vater  
Dr. Norbert Meißner  
(1948-1983)

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Demographische Entwicklung .....	1
1.2	Arthrose .....	2
1.3	Endoprothetik .....	4
1.4	Materialien .....	4
1.4.1	Materialien in der Endoprothetik .....	4
1.4.1.1	Chrom .....	4
1.4.1.2	Cobalt .....	5
1.4.1.3	Molybdän .....	5
1.4.1.4	Titan .....	6
1.4.1.5	Stahl .....	6
1.4.1.6	Keramik .....	7
1.4.1.7	Kunststoff .....	8
1.4.2	Gleitpaarungen .....	8
1.4.2.1	Polyethylen - Metall .....	9
1.4.2.2	Metall – Metall .....	10
1.4.2.3	Keramik - Keramik .....	11
1.5	Verankerungstechniken in der Endoprothetik .....	12
1.5.1	Zementfreie Technik .....	13
1.5.2	Zementierte Technik .....	13
1.5.2.1	PMMA-Historie .....	14
1.5.2.2	Chemische Grundlagen .....	15
1.6	Komplikationen in der Endoprothetik .....	16
1.6.1	Mechanische Komplikationen .....	17
1.6.2	Infektionen .....	17
1.6.2.1	Erregerspektrum .....	18
1.6.2.2	Allgemeine Pathogenese .....	19

1.6.2.3	Spezielle Pathogenese.....	19
1.7	Infektionsprophylaxe .....	22
1.7.1	Allgemeine Prinzipien.....	23
1.7.2	Prinzip der systemischen Antibiose .....	23
1.7.3	Prinzip der lokalen Antibiose .....	24
1.7.4	Knochenzemente mit Antibiotika-Zusatz.....	24
1.8	Bakterielle Resistenzentwicklung .....	25
1.9	Antimikrobieller Effekt von Silber .....	26
1.9.1	Wirkmechanismus.....	27
1.9.2	Nebenwirkungen .....	27
1.9.3	Anwendungen in der Medizin .....	28
1.10	MikroSilber-Knochenzement .....	28
1.10.1	Eigenschaften .....	28
1.10.2	<i>in-vitro</i> -Testung.....	30
1.11	Problemstellung der Arbeit .....	32
2	Material und Methode.....	33
2.1	Studiendesign .....	33
2.1.1	Pilotstudie .....	33
2.1.2	Hauptstudie.....	34
2.2	Kaninchen .....	35
2.3	Bakterien.....	35
2.4	Knochenzemente .....	35
2.5	Versuchsdurchführung .....	36
2.5.1	Narkose.....	36
2.5.2	Operation .....	37
2.5.3	Postoperative Röntgenkontrolle .....	39
2.5.4	Postoperative Beobachtung .....	39
2.5.5	Euthanasie der Tiere .....	40
2.5.6	Auswertung der Versuche .....	40

2.5.6.1	Röntgenverlaufskontrolle.....	40
2.5.6.2	Entnahme der Femora .....	40
2.5.6.3	Mikrobiologische Untersuchung .....	41
2.5.6.4	Aufarbeitung und Ausstrich .....	41
2.5.6.4.1	Latexagglutinationstest .....	43
2.5.6.4.2	API®-Staph-Test .....	44
2.5.6.4.3	Molekulargenetischer Nachweis.....	46
2.5.6.4.4	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	48
2.5.6.5	Histologische Aufarbeitung.....	50
2.5.6.5.1	Trenn-Dünnschliff-Technik.....	50
2.5.6.5.2	Präparate-Färbung.....	51
2.5.6.5.3	Kriterien der histologischen Beurteilung .....	52
2.5.6.6	Statistische Auswertung .....	53
3	Ergebnisse .....	54
3.1	Pilotstudie .....	54
3.1.1	Klinischer Befund .....	54
3.1.2	Röntgenverlaufskontrolle.....	54
3.1.3	Mikrobiologische Auswertung.....	56
3.1.4	Histologische Auswertung .....	56
3.2	Hauptstudie.....	57
3.2.1	Klinischer Befund .....	57
3.2.2	Röntgenverlaufskontrolle.....	60
3.2.3	Mikrobiologische Auswertung.....	61
3.2.4	Histologische Auswertung .....	62
3.2.5	Statistische Auswertung .....	62
4	Diskussion.....	64
4.1	Infektionsprophylaxe in der Endoprothetik.....	64
4.2	Konzipierung von Silberknochenzement.....	69
4.3	<i>In-vitro</i> -Untersuchung.....	71

4.4	<i>in-vivo</i> -Untersuchung .....	71
4.5	Fazit .....	75
5	Schlussfolgerung.....	76
6	Zusammenfassung.....	77
7	Summary.....	78
8	Abbildungsverzeichnis.....	79
9	Tabellenverzeichnis .....	81
10	Literaturverzeichnis.....	82
11	Publikationsverzeichnis.....	103

Erklärung

Danksagung

## 1 Einleitung

### 1.1 Demographische Entwicklung

Der medizinische Fortschritt und deutlich verbesserte Hygienemaßnahmen haben im 20. Jahrhundert zu einer geringeren Sterblichkeit und höheren Lebenserwartung der Weltbevölkerung geführt, die seitdem rasant wächst und sich innerhalb der letzten 100 Jahre mehr als verdreifacht hat (Abb. 1). Während um 1900 knapp 2 Milliarden Menschen die Erde bevölkerten, waren es im Jahr 2000 bereits über 6 Milliarden [Gelbard et al. 1999, Lutz et al. 2002].

Die Weltbevölkerungsentwicklung wird auch in Zukunft durch die Fertilitätsraten in den Entwicklungsländern Afrikas und Asiens bestimmt werden, wobei ein Ende des nach wie vor dynamischen Wachstums in frühestens 200 Jahren bei einer Weltbevölkerung von etwa 11 Milliarden Menschen erwartet wird [Gelbard et al. 1998].

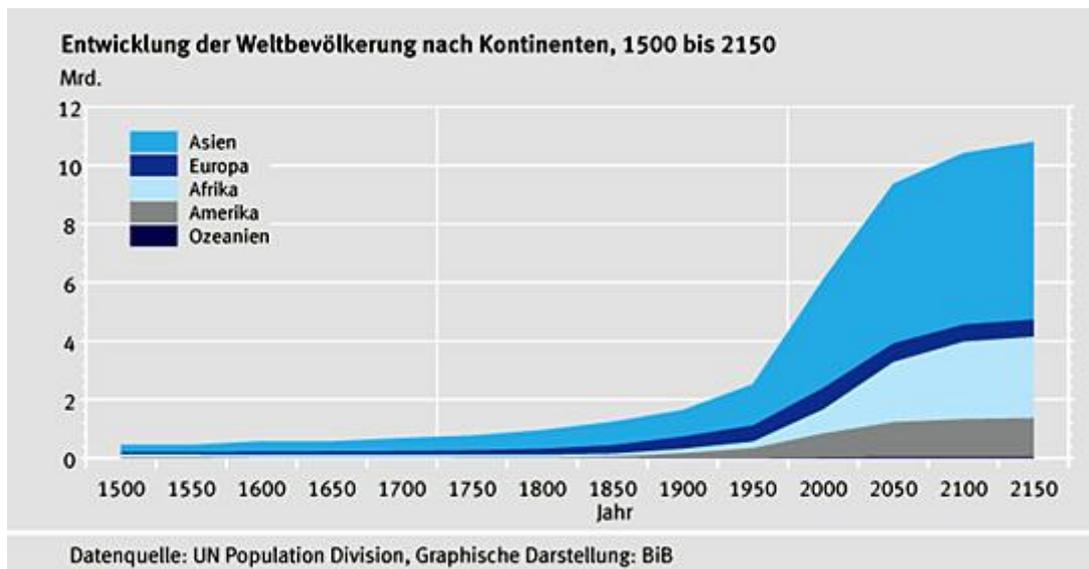


Abbildung 1: Wachstum der Weltbevölkerung bis 2150  
(Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung 2008)

In den Industrienationen hingegen werden die steigende Lebenserwartung und der Rückgang der Geburtenzahlen zu einer Verschiebung der Altersverteilung innerhalb der Bevölkerung zugunsten des hohen Alters führen (Abb. 2).



Zunächst sind konservative Therapiemaßnahmen wie Gewichtsreduktion, Herz-Kreislauf-Training, krankengymnastische Übungsbehandlung, Muskelaufbau, physikalische Medizin, Magnetfeldtherapie, Radiotherapie, Akupunktur oder Schmerztherapie angezeigt, um die Beschwerden zu lindern [Bijlsma et al. 2007; Powell et al. 2005; Schuh et al. 2007].



*Abbildung 3: Fortgeschrittene Coxarthrose auf der rechten Seite mit Verschmälerung des Hüftgelenkspalts, subchondraler Sklerosierung, osteophytären Randanbauten des Pfannendachs und Deformierung des Hüftkopfs*

Gelingt dies nicht, muss unter Berücksichtigung individueller Risikofaktoren und möglicher Komplikationen über ein operatives Vorgehen nachgedacht werden. Befindet sich der Patient noch in einem initialen Stadium der Arthrose oder besteht lediglich eine sog. präarthrotische Deformität, kann eine Umstellungsosteotomie ausreichend sein, um durch Entlastung der betroffenen Gelenkbereiche ein Fortschreiten der Arthrose zu verhindern und eine Beschwerdelinderung zu erzielen [Gunther 2001]. Reicht auch dies nicht aus oder liegt bereits ein fortgeschrittenes Stadium der Arthrose vor (Abb. 3), besteht die Indikation zum künstlichen Gelenkersatz [Mancuso et al. 1996].

### **1.3 Endoprothetik**

Der Ersatz durch künstliche Gelenke, sog. Endoprothesen, ist heute ein etabliertes und standardisiertes Verfahren an Hüft- und Kniegelenk. Aber auch am Schultergelenk, am Ellbogen- und Sprunggelenk und an den Finger- und Zehengelenken ist ein solcher Eingriff möglich [Bernard et al. 1999]. Die Implantation von Hüft- und Knie-Totalendoprothesen (TEP) gehört bereits heute zum täglichen Operationsprogramm unfallchirurgischer und orthopädischer Kliniken und wird künftig, wenn die demographischen Prognosen zutreffen, in noch wesentlich größerem Umfang durchgeführt werden [Hart 2004, Robertsson et al. 2000].

Um eine ungestörte, schmerzfreie und vor allem dauerhafte Funktion zu erreichen, müssen die Materialien eines künstlichen Gelenks hohen Anforderungen entsprechen. Sie dürfen keine Unverträglichkeitsreaktionen hervorrufen, müssen Druck- und Biegebelastungen standhalten und korrosionsbeständig sein und sollten möglichst wenig Abrieb aufweisen, um eine lokale Immunreaktion mit Synovitis und Fremdkörpergranulomen, mechanische Blockaden durch Partikeleinklemmung, periprothetischen Verlust an Knochensubstanz und eine dadurch verursachte Lockerung der Prothese zu vermeiden und dem Patienten auf diese Weise einen Revisionseingriff und Wechsel der Endoprothese zu ersparen [Jacobs et al. 2006].

### **1.4 Materialien**

Für die einzelnen Komponenten einer Prothese werden verschiedene hochwertige Metalle (Chrom, Cobalt, Molybdän, Titan), Metalllegierungen (Stahl), Keramik und Kunststoffe (Polyethylen) verwendet, die aufeinander abgestimmt und bioverträglich sein müssen [Sanfilippo et al. 2006].

#### **1.4.1 Materialien in der Endoprothetik**

##### **1.4.1.1 Chrom**

Chrom ist ein chemisches Element, das wie alle im Folgenden genannten Metalle zu den sogenannten Übergangsmetallen im Periodensystem der Elemente zählt und auf der Erde natürlicherweise nicht elementar vorkommt. Es ist korrosions- und anlaufbeständig und im Urzustand zäh und formbar. In seinen Verbindungen liegt Chrom am häufigsten in einer der Oxidationsstufen +2, +3 oder +6 vor, das heißt als

Cr(II), Cr(III) oder Cr(VI), und wird vorwiegend zur Herstellung von Chromstählen und nichtrostenden Stählen verwendet [Schwister 2005].

Während elementarem Chrom im menschlichen Körper keine physiologische Bedeutung zukommt, ist die Rolle von Chrom-Ionen, insbesondere des stabilen Cr(III), nicht mit letzter Sicherheit geklärt. Obwohl Cr(III) als essentielles Spurenelement gilt und regelmäßig in nahrungsergänzenden Multivitamin- und Mineralstoffpräparaten zu finden ist, ist seine angenommene Funktion im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel nach wie vor nicht zweifelsfrei bewiesen [Vincent 2004]. Ebenso wenig sind *in vivo* allerdings auch toxische Wirkungen von Cr(III) belegt, obwohl es *in vitro* Hinweise darauf gibt [Levina et al. 2008]. Cr(VI) hingegen ist nachweislich hochgiftig und wird in relevanten Mengen meist durch die Haut oder durch Inhalation, in kleineren Mengen auch durch Ingestion aufgenommen. Es schädigt das Erbgut (mutagen) und kann bösartige Tumoren hervorrufen (karzinogen) [Bagchi et al. 2002; Barceloux 1999].

### 1.4.1.2 Cobalt

Cobalt ist ein ferromagnetisches, hoch schmelzendes und zähes Schwermetall, das mit anderen Metallen wie Chrom oder Molybdän Legierungen bildet. Es kommt im Ursprung immer in Verbindung mit Nickel, oft auch Silber oder Eisen vor und wird indirekt z.B. als Nebenprodukt der Kupferverhüttung gewonnen. Korrosionsbeständig und härter als Stahl wird es hauptsächlich für die Produktion von Hartmetallen, Schneidwerkzeugen und Maschinenbauteilen verwendet, aber auch zur Herstellung von Farbpigmenten in der Glas-, Email- und Keramikindustrie [Schwister 2005].

Die wichtigsten Oxidationsstufen sind +2 und +3, wobei Cobalt(II)-Chlorid (Cobaltdichlorid) ein essentielles Spurenelement ist, da positiv geladenes Cobalt das zentrale Atom in der Struktur von Vitamin B12 (Cobalamin) ist. Der Bedarf ist mit 0,2 µg pro Tag aber sehr gering. Cobalt ist bei oraler Aufnahme auch in leichten Überdosierungen nur wenig toxisch, kann aber bei Dosierungen von einigen Milligramm oder inhaliert schwere Funktionsstörungen innerer Organe hervorrufen und ist karzinogen [Berg et al. 2007; Schwister 2005].

### 1.4.1.3 Molybdän

Auch Molybdän ist hoch schmelzend und gut formbar, muss aber aufwendig durch Reduktion aus Erzen wie Molybdänit ( $\text{MoS}_2$ ) gewonnen werden. Es dient überwiegend

zur Steigerung der Festigkeit und Hitze- und Korrosionsbeständigkeit von Edelstählen und Nickelwerkzeugen. Die wichtigste Oxidationsstufe ist +6 [Schwister 2005].

Als Spurenelement ist Molybdän für Pflanzen, insbesondere Hülsenfrüchtler, essentiell, um Luftstickstoff zu fixieren und Nitrat zu reduzieren. Bei Mensch und Tier ist Molybdän als Cofaktor der Xanthinoxidase am Purinabbau beteiligt [Mendel et al. 2006]. Eine Molybdän-Überdosierung z.B. durch Überdüngung von Ackerböden mit Ammoniummolybdat kann deshalb gichtartige Gelenkschmerzen und Leberschäden verursachen. Ansonsten ist Molybdän aber auch in höheren Dosen nur gering toxisch [Barceloux 1999].

### 1.4.1.4 Titan

Herausragende Bedeutung kommt in der Endoprothetik dem Element Titan zu, weil es im Gegensatz zu den drei zuvor genannten Schwermetallen eine sehr geringe Dichte besitzt und dementsprechend leicht ist, trotzdem aber eine enorme Festigkeit und sehr gute Korrosionsbeständigkeit aufweist. Es verbindet damit die positiven Eigenschaften von Aluminium und Stahl und ist deshalb ein wertvoller Werkstoff. Auch Titan kommt, obwohl es nicht selten ist, nie elementar vor. Technisch bedeutender ist aber ohnehin Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ), das im Allgemeinen aus Rutil, einem Oxid-Mineral, gewonnen wird, in dem es in reiner Form vorliegt. Aber auch aus Ilmenit (Titaneisenerz) kann mit Kohle und Chlor unter Hitze Titan tetrachlorid ( $\text{TiCl}_4$ ) hergestellt werden, das nicht nur die Polymerisation von Ethylen katalysiert, sondern auch von Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) zu HCl und Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) zersetzt werden kann. Sowohl in  $\text{TiO}_2$  als auch in  $\text{TiCl}_4$  liegt Titan in seiner wichtigsten Oxidationsstufe +4 vor [Schwister 2005].

Obwohl sich Titan in vitalem Gewebe anreichern kann, spielt es physiologisch nach bisherigen Erkenntnissen keine Rolle. Anders als bei Nickel, Chrom und Cobalt sind Allergien und toxische Nebenwirkungen bei reinem Titan bislang wissenschaftlich nicht nachgewiesen [Pohler 2000].

### 1.4.1.5 Stahl

Als Stahl bezeichnet man definitionsgemäß nach deutscher Industrienorm (DIN) Metalllegierungen, deren Hauptbestandteil Eisen ist und die gewichtsbezogen maximal 2% Kohlenstoff enthalten. Je weniger Kohlenstoff ein Stahl enthält, desto härter und rauer ist er. Meist werden jedoch keine reinen, nur aus Eisen und Kohlenstoff bestehenden Stähle verwendet, sondern Stahllegierungen, bei denen die

physikalischen und chemischen Eigenschaften von Stahl durch die jeweiligen Qualitäten der zugefügten Metalle verbessert werden [Schwister 2005]. In der Endoprothetik kommt aktuell Cobalt-Chrom-Molybdän-Stahl (CoCrMo) zum Einsatz [Santavirta et al. 2003].

### 1.4.1.6 Keramik

Unter Keramik verstand man ursprünglich aus Ton hergestellte Erzeugnisse aller Art. Die Produktion von Keramik ist eines der ältesten Handwerke der Menschheit und reicht wahrscheinlich bis in die Jungsteinzeit (Neolithikum) um 6000 v. Chr. zurück [Frotscher et al. 2003].

Heutzutage bezieht sich der Begriff Keramik allerdings weniger auf den zugrundeliegenden Rohstoff als auf den Herstellungsprozess und umfasst daher nicht nur Gegenstände, die aus Ton gefertigt werden, sondern alle Gegenstände, die aus anorganischen, feinkörnigen Rohstoffen und Wasser bei Raumtemperatur geformt, danach getrocknet und schließlich gebrannt werden. Dabei dient der Brennprozess nicht nur der Trocknung des Materials, sondern auch der Erzeugung stabiler Kristallkomplexe, die durch gleichzeitig schmelzende Glaspartikel verkittet werden [Kollenberg 2004].

In der sogenannten technischen Keramik, die Produkte für technische Anwendungen herstellt, wird dieser Vorgang des Zusammenbackens „Sinterung“ genannt, wobei die meisten Ausgangspulver synthetisch hergestellt sind. Technische Keramiken zeichnen sich durch große Abrieb- und Verschleißfestigkeit, hohe Hitze- und Korrosionsbeständigkeit und ihre gute Biokompatibilität aus und stellen damit in den technischen Bereichen der Medizin eine hervorragende Alternative zu Metallteilen dar, die ihrerseits allerdings den Vorteil besitzen elastisch und plastisch verformbar (duktil) zu sein und deshalb seltener zu brechen als Keramik [Barrack et al. 2004; Verband der Keramischen Industrie 2003].

Die am häufigsten verwendete Keramik in der Endoprothetik ist Alumina. Es handelt sich dabei um Aluminium(III)oxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Es wird meist eigenständig verwendet, kann aber auch durch Zugabe von Zirkonium(II)oxid ( $\text{ZrO}_2$ ), das ebenfalls eigenständig eingesetzt werden kann, aufgehärtet werden, so dass ZTA (Zirconia toughened Alumina) entsteht [Barrack et al. 2004; De Aza et al. 2002].

### 1.4.1.7 Kunststoff

Der weltweit meist produzierte und verwendete Kunststoff ist Polyethylen. Zu seinen herausragenden physikalischen und chemischen Eigenschaften zählen hohe Plastizität, geringes Gewicht, sehr gute Gleiteigenschaften und die Absorption schwacher ionisierender Strahlung sowie die Beständigkeit gegen Wasser, wässrige Säuren, Laugen, Salzlösungen, Alkohol und polare Lösungsmittel. Außerdem verbrennt Polyethylen rückstandsfrei zu Kohlendioxid und Wasser ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) [Schwister 2005].

Polyethylen entsteht durch Polymerisation von Ethen ( $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$ ) bzw. Ethylengas und fällt zunächst immer als zähe Flüssigkeit an. Während im Hochdruckverfahren bei Drücken von bis zu 3000 bar und Temperaturen zwischen  $100^\circ\text{C}$  und  $300^\circ\text{C}$  weiches Polyethylen (PE-LD = low density polyethylene) hergestellt wird, entsteht im Niederdruckverfahren bei Drücken bis 100 bar und Temperaturen zwischen  $20^\circ\text{C}$  und  $250^\circ\text{C}$  unter Einsatz von Katalysatoren wie oben genannten Titanverbindungen hartes Polyethylen (PE-HD = high density polyethylene) [Peacock 2000; Schwister 2005]. Für ihre grundlegenden Arbeiten zu metallorganischen Katalysatoren, die die Polymerisation von Alkenen bei Normaldruck und damit die Massenproduktion von Kunststoffen wie Polyethylen (PE-HD) oder Polypropylen (PP) ermöglichten, erhielten Karl Ziegler und Giulio Natta 1963 den Nobelpreis für Chemie [Kurtz 2004].

In der Endoprothetik wird hartes Polyethylen mit besonders langen Polymerketten (PE-UHMW = ultra high molecular weight polyethylene) für Pfannen und Inlays verwendet, das in einem modifizierten Niederdruckverfahren hergestellt wird und nahezu optimale Gleiteigenschaften und minimalen Abrieb aufweist [Kurtz 2004].

### 1.4.2 Gleitpaarungen

Da beim künstlichen Gelenkersatz in der Regel beide artikulierenden Gelenkflächen ersetzt werden, muss eine Totalendoprothese (TEP) aus mehreren Komponenten bestehen, die an einer Stelle gelenkig miteinander verbunden sind [Kircher et al. 2007]. Im Bereich dieser Verbindung treten unter Belastung und Rotation immense Kräfte auf, die die artikulierenden Gleitflächen im Laufe der Zeit gegeneinander abreiben. Dadurch entstehen Mikropartikel, die von Makrophagen erkannt werden und eine komplexe Kaskade des Immunsystems auslösen, an deren Ende die Aktivierung von Osteoklasten und die Resorption von Knochensubstanz steht. Dies führt schließlich zur Prothesenlockerung [Campbell et al. 2004; Haynes et al. 2001; Kadoya et al. 1998; Lassus et al. 1998; Rader et al. 1999].

Um eine Lockerung durch Abriebpartikel-induzierte Osteolyse so weit wie möglich zu verhindern, sollten die Prothesenkomponenten den einwirkenden Kräften möglichst lange über Jahre und Jahrzehnte standhalten. Dabei kommt es nicht nur auf die Qualität, sondern auch auf das funktionelle Zusammenspiel, insbesondere das oben beschriebene Gleitverhalten unter Druck, der verwendeten Materialien an. Man spricht von „Gleitpaarungen“, die sich hinsichtlich Abrieb, Belastbarkeit, Beständigkeit und Bioverträglichkeit teilweise erheblich unterscheiden [Kircher et al. 2007]. Bei der Auswahl müssen deshalb die individuellen Bedürfnisse des einzelnen Patienten berücksichtigt und die Vor- und Nachteile der zur Verfügung stehenden Gleitpaarungen sorgfältig abgewogen werden [McKellop 2001].

### **1.4.2.1 Polyethylen - Metall**

In den letzten Jahrzehnten erhielten weltweit mehrere Millionen Patienten Implantate, deren tragende Oberflächen zum Teil aus PE-UHMW (ultra high molecular weight polyethylene) bestanden [Campbell et al. 2004].

Zur Sterilisation wurde Gammastrahlung eingesetzt, die allerdings eine gewisse oxidative Degradation des Polyethylens bei Kontakt mit Sauerstoff induziert. Gammastrahlung führt aber auch zur stabilitätsverbessernden, abriebreduzierenden Quervernetzung (cross-linking) von PE-Molekülen bei gleichzeitiger Entstehung von unkombinierten Elektronen, sog. freien Radikalen, die ihrerseits in chemischen Reaktionen die Struktur von Polyethylen schwächen [Kurtz 2004].

Während manche Hersteller aufgrund des beobachteten hohen Polyethylen-Abriebs und der damit verbundenen Komplikationen dazu übergingen, in sauerstofffreier Umgebung zu bestrahlen, um eine oxidative Degradation zu verhindern, nahmen andere Hersteller von einer Bestrahlung ganz Abstand und verwendeten stattdessen Ethylenoxid oder Gasplasma zur Sterilisation. Auf diese Weise konnte zwar die Entstehung von freien Radikalen verhindert werden, es fand aber auch das erwünschte Cross-Linking nicht mehr statt [Kurtz 2004; McKellop et al. 2000].

Nachdem in mehreren Studien das optimale Maß an Cross-Linking untersucht worden war und gezeigt werden konnte, dass exzessives Cross-Linking die Belastbarkeit und Bruchfestigkeit von Polyethylen sogar herabsetzt, wurden verschiedene Verfahren entwickelt, die einen Kompromiss zwischen Sterilität und oxidativer Degradation

einerseits und Cross-Linking und Entstehung freier Radikaler andererseits bieten: Durch moderate Gamma- oder Elektronenbestrahlung wird ein gewisses Maß an Cross-Linking erreicht, wobei gerade so viele freie Radikale entstehen wie durch eine nachfolgende thermische Behandlung eliminiert werden können. Die abschließende Sterilisation erfolgt mit geringen Dosen erneuter Gamma- oder Elektronenstrahlung oder durch Bedampfung mit Ethylenoxid bzw. Gasplasma [Campbell et al. 2004; McKellop 2001]. Auf diese Weise konnte die Stabilität von Polyethylen signifikant erhöht, der gefürchtete Polyethylen-Abrieb, wenn auch nicht vollständig beseitigt, doch erheblich reduziert werden, so dass die Kombination Polyethylen – Metall besonders in der Knieendoprothetik nach wie vor als Standardgleitpaarung gilt [Campbell et al. 2004].

### **1.4.2.2 Metall – Metall**

Der endoprothetische Gelenkersatz wurde in den 1960er Jahren von 4 englischen Orthopäden wesentlich vorangetrieben und geprägt: Sir John Charnley aus Manchester, George McKee und John Watson-Farrar aus Norwich und Peter Ring aus Redhill.

Die zwischen 1960 und 1965 entwickelte, zementierte McKee-Farrar-Prothese aus CoCrMo-Stahl, bei der alle tragenden Oberflächen ausschließlich aus Metall bestanden, wurde zunächst in großer Zahl implantiert, wies aber eine erhöhte Rate aseptischer Lockerung auf [McKee et al. 1966; McKellop et al. 1996; Schmidt et al. 1996; Walker et al. 1996; Walker et al. 1974]. Während Peter Ring die Ursache in der Zementierung sah und deswegen eine zementfreie Metall-Metall-Prothese mit Pfannenschraube propagierte, verwendete Sir John Charnley zur Vermeidung metallischen Abriebs und einer abriebinduzierten Lockerung eine Metall-PE-Gleitpaarung, wobei er alle Hüftprothesen weiterhin zementiert einbrachte [Charnley 1961; Ring 1968]. In den folgenden Jahren wurden Metall-Metall-Gleitpaarungen mit dickeren, präziser gerundeten Pfannen und größeren Köpfen zur optimierten Druckverteilung entwickelt und Ende der 1980er Jahre klinisch wieder eingeführt, die sich den Metall-PE-Gleitpaarungen in Abrieb und Beständigkeit bis heute zumindest ebenbürtig zeigen [Dorr et al. 2000; Long 2005; Naudie et al. 2004; Weber 1996].

Da die Abriebpartikel bei Metall in der Regel wesentlich kleiner sind als bei Polyethylen oder Keramik, kommt es trotz des insgesamt geringeren Abriebvolumens zu einer wesentlich größeren aktiven Oberfläche gegenüber dem biologischen Milieu [Campbell

et al. 2004; Doorn et al. 1998]. Da Metallionen in biologischen Systemen immer einem gewissen Grad an Korrosion unterliegen und Korrosionsprodukte zu einer entsprechenden Sensibilisierung führen können, ist anzunehmen, dass auch erhöhte Konzentrationen an Cobalt- und Chrom-Ionen, wie sie im Blut und Urin bei Patienten mit Metall-Metall-Implantaten beobachtet wurden, zu toxischen Effekten führen [Hallab et al. 2001; Jacobs et al. 1998; MacDonald 2004; Merritt et al. 1996; Shahgaldi et al. 1995]. Allerdings ist unklar, welche Cobalt- und Chrom-Konzentrationen welche Art toxischer Nebenwirkungen hervorrufen, zumal wie dargestellt auch die Art der Inkorporation (Inhalation, Ingestion, Implantation) von Bedeutung zu sein scheint [Bagchi et al. 2002; Barceloux 1999; Berg et al. 2007; Plitz 2007].

Die Auswirkungen erhöhter Metallionen-Konzentrationen auf den menschlichen Organismus sind deshalb nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung, so dass Metall-Metall-Gleitpaarungen momentan zwar verfügbar, aber nicht erste Wahl sind [Cuckler 2005].

### **1.4.2.3 Keramik - Keramik**

Keramik-Keramik-Gleitpaarungen auf der Basis von Aluminiumoxid (Alumina) befinden sich seit den 1970er Jahren erfolgreich im klinischen Einsatz [Willmann 2000]. Die Versagensrate war mit mehr als 10% zunächst sehr hoch und ist auf die suboptimale Zusammensetzung und den unausgereiften Herstellungsprozess des Materials zur damaligen Zeit zurückzuführen [Barrack et al. 2004].

In den letzten 20 Jahren wurden jedoch Keramiken entwickelt, die eine höhere Reinheit und feinere Körnerstruktur haben und mit verbesserten Sinterungstechniken gebrannt werden [Barrack et al. 2004; Campbell et al. 2004; Hannouche et al. 2005]. Mit diesen Modifizierungen konnte nicht nur der gefürchtete Keramikbruch, der zu einem augenblicklichen Funktionsverlust der Prothese führt, reduziert, sondern auch der ohnehin geringe Keramikabrieb noch weiter minimiert werden [Barrack et al. 2004; Willmann 2000].

Um sowohl eine homogene Druckverteilung auf die Pfanne und den Kopf zu erzielen als auch ein Anschlagen des Prothesenhalses am medialen, inferioren Pfannenrand (neck-socket impingement) und damit einen Bruch der Keramik zu vermeiden, dürfen Keramikpfannen auf keinen Fall zu steil implantiert werden [Bader et al. 2004; Barrack et al. 2004; Campbell et al. 2004; Garino 2000]. Keramiken auf der Basis von

Zirconiumoxid (Zirconia), die in den 1980er Jahren eingeführt und seither vor allem als Prothesenköpfe mit Polyethylen-, aber auch Alumina-Pfannen kombiniert werden, erweisen sich aufgrund ihrer Festigkeit und Härte gerade bei kleinen Prothesenmodellen als vorteilhaft [Campbell et al. 2004; Piconi et al. 1999].

Unstimmigkeit herrscht allerdings über den in manchen Labortests beobachteten, relativ starken Abrieb von Zirconia gegen Zirconia und Zirconia gegen Alumina, aufgrund dessen Zirconia-Alumina-Paarungen in den USA bislang nicht implantiert werden [Campbell et al. 2004, Früh et al. 1997]. Möglicherweise verursachen die hohen Temperaturen in wässriger Umgebung während der Sterilisation eine Phasentransformation, die die Oberflächenrauigkeit von Zirconia erhöht und dadurch später zu vermehrtem Abrieb führt [Campbell et al. 2004]. Andere Studien dagegen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen und berichten über einen ähnlich geringen Abrieb bei Zirconia-Alumina-Paarungen wie bei reinen Alumina-Alumina-Paarungen, die aktuell favorisiert werden [Campbell et al. 2004; Clarke et al. 2000].

Die herausragende Eigenschaft von Keramiken ist aber in jedem Fall ihr hohes Maß an Biokompatibilität und Biostabilität [Campbell et al. 2004]. Im Gegensatz zu Metallen geht Keramik in organischem biologischen Milieu nicht in Lösung, so dass es zu keiner nennenswerten Ionisierung kommt [Savarino et al. 2008]. Die fibrotische Reaktion, die zur Abkapselung von Abriebpartikeln führt, fällt bei Keramik-Keramik-Gleitpaarungen wegen des extrem geringen Abriebs sehr schwach aus [Christel 1992]. Zudem bewirken Keramikpartikel vermutlich eine vorzeitige Makrophagen-Apoptose, so dass die Makrophagen-vermittelte Zytokin-Freisetzung geringer ist als bei gleichen Mengen anderer Abriebpartikel und offenbar nicht ausreicht, um Osteoklasten zu aktivieren [Petit et al. 2002]. Eine unmittelbar durch Keramikabrieb induzierte Osteolyse ist bisher jedenfalls nicht beschrieben, wengleich Keramikpartikel natürlich an anderen Prothesenkomponenten und Knochenzement Abrieb verursachen können, der seinerseits zu einer Osteolyse führt [Barrack et al. 2004; Bizot et al. 2001; Campbell et al. 2004].

### **1.5 Verankerungstechniken in der Endoprothetik**

Für die optimale Funktion einer Gelenkendoprothese ist neben der Auswahl des Prothesenmodells, der Qualität der verwendeten Materialien und einer geeigneten Gleitpaarung die feste, sichere Verankerung im Knochen die wichtigste Voraussetzung

für den langfristigen Erfolg einer endoprothetischen Versorgung [Breusch et al. 2000; Breusch et al. 2000].

### **1.5.1 Zementfreie Technik**

Bei der zementfreien Implantationstechnik wird die Prothese durch Einpressen in den Knochen („press-fit“) verankert [Romagnoli 2002]. Die Oberflächenstruktur und verschiedenartige Beschichtungen wie Hydroxylapatit und Calciumphosphat sollen durch Osteokonduktion eine schnelle Integration der Prothese in den Knochen bewirken [Capello et al. 1998; Chang et al. 2006; Schnettler et al. 2003; Yee et al. 1999]. Bei der Osteokonduktion bietet die Oberfläche des eingebrachten Materials ein Gerüst, in das ortsständiges Knochengewebe nach Matrixkontakt einwächst, wobei die einwachsenden Zellen Differenzierungs- und Reifungsphasen durchlaufen [Albrektsson et al. 2001; Stevenson 1999].

Die zementfreie Implantationstechnik ist für Patienten geeignet, die über genügend und ausreichend stabile Knochensubstanz verfügen, um die Prothese auch ohne Knochenzement fest zu verankern, und deren Alter und Aktivitätsgrad vermuten lassen, dass im weiteren Verlauf Implantatwechseleingriffe notwendig werden. Da bei einer Wechseloperation nicht nur die einliegende Prothese, sondern auch der Zementmantel vollständig entfernt werden muss, liegen operationstechnisch günstigere Voraussetzungen vor, wenn eine Prothese zementfrei implantiert wurde [Goldberg et al. 2007]. Bei der inzwischen üblichen Haltbarkeit einer Gelenkendoprothese von 10-15 Jahren können bei einem Patienten, der mit 30 Jahren die erste Hüftprothese erhält, mehrfache Wechseloperationen im Leben notwendig sein, sofern es zu keinen intra- oder postoperativen Komplikationen kommt, die weitere Eingriffe erfordern.

Um die knöcherne Einheilung der Prothese zu ermöglichen, erfordert die zementfreie Technik allerdings eine längere Entlastungsphase als die zementierte Technik, bei der eine Vollbelastung in der Regel sofort nach der Operation möglich ist [Archibeck et al. 2006; Breusch et al. 2000; Engesaeter et al. 2006].

### **1.5.2 Zementierte Technik**

Bei der zementierten Implantationstechnik wird Knochenzement auf der Basis von Polymethylmethacrylat (PMMA) zwischen Knochen und Prothese gebracht, um die Prothese fest mit dem Knochen zu verbinden [Kühn 2000].

Wenn Krankheiten des Knochens wie Osteoporose die Knochenstruktur schwächen und die Belastbarkeit reduzieren, ist nicht nur die feste Verankerung, sondern auch die schnelle Wiederbelastbarkeit des Gelenks der entscheidende Vorteil der zementierten Gelenkprothese, weil sie älteren und morbidem Patienten lange Liege- und Entlastungs- bzw. Teilbelastungszeiten und die damit verbundenen Komplikationen dekompensierender Kreislaufverhältnisse, nachlassender Beweglichkeit der Gelenke (Kontrakturen), weiterer Demineralisierung des Skeletts und des Verlusts der selbständigen Orientierung im vertrauten häuslichen und sozialen Umfeld erspart [Krackow 2004].

Da die Indikationen zum endoprothetischen Gelenkersatz nicht nur Arthrosen, sondern auch Frakturen, insbesondere die mediale Schenkelhalsfraktur, die sich typischerweise im hohen Lebensalter ereignet, umfassen, wird die Verankerung von Totalendoprothesen mit Knochenzement auf der Basis von Polymethylmethacrylat (PMMA) insgesamt wesentlich häufiger durchgeführt als die zementfreie Implantation und kann deshalb auch künftig als „gold standard“ in der Endoprothetik bezeichnet werden [Bauer et al. 1999; Breusch et al. 2000; Breusch et al. 2000].

### 1.5.2.1 PMMA-Historie

Um 1900 überließ der Tübinger Chemie-Professor Dr. Hans Freiherr von Pechmann (1850-1902) seinem Doktoranden Otto Böhm für dessen Dissertation das Thema „Polymerisationsprodukte von Acrylsäure“ [Universitätsarchiv Tübingen 2000]. Aufbauend auf den Ergebnissen seiner Arbeit war Böhm in der Folgezeit selbst maßgeblich an der Weiterentwicklung von Methylmethacrylaten (MMA) beteiligt (Abb. 4).

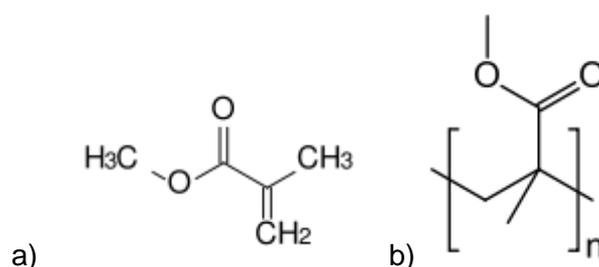


Abbildung 4: Strukturformeln von Methylmethacrylat (a) und Polymethylmethacrylat (b). Aus: [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)

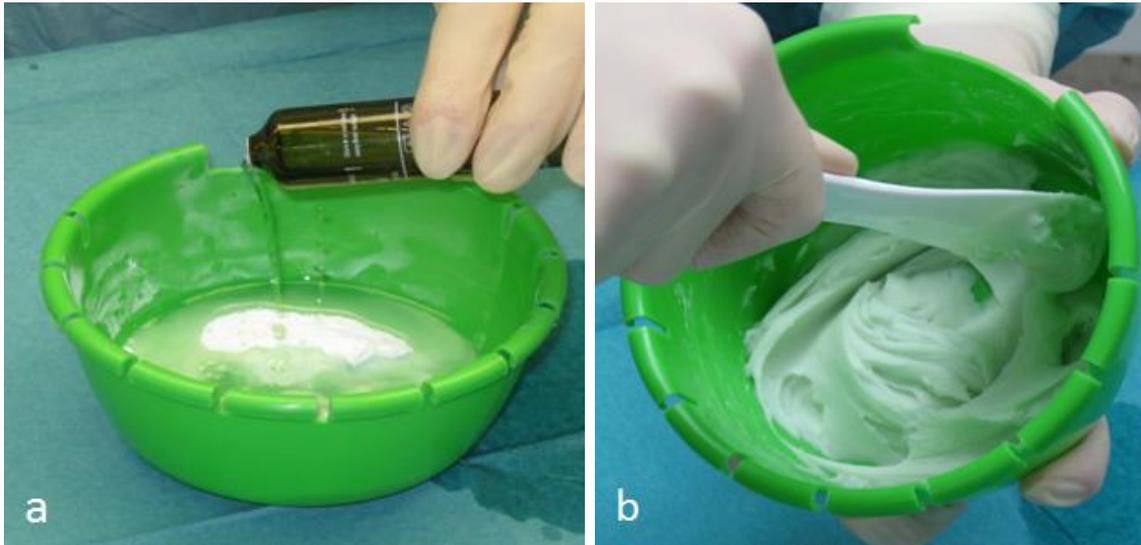
Die Firma Kulzer erhielt 1936 ein Patent auf eine formbare Paste, die aus pulverförmigem Polymethylmethacrylat (PMMA) und flüssigem Methylmethacrylat-Monomer (MMA) hergestellt wurde und aushärtete, sobald man Benzoylperoxid (BPO) als katalysierenden Initiator für die Polymerisation hinzufügte und die Paste auf 100°C erhitzte. Nachdem festgestellt worden war, dass sich der Polymerisationsvorgang auch bei Raumtemperatur auslösen lässt, wenn man einen zweiten Initiator auf der Basis tertiärer aromatischer Amine beifügt, stellte Kulzer 1943 das in seinen Grundzügen bis heute gültige Protokoll für die Herstellung von Knochenzement auf der Basis von Polymethylmethacrylat (PMMA) auf [Kühn 2000].

Bereits 1938 hatten die Gebrüder Judet aus Paris versucht arthrotische Gelenkflächen des Hüftgelenks mit einer acrylischen Paste zu überziehen, die jedoch regelmäßig auslockerte. Sie entwickelten daraufhin eine Hüftgelenksendoprothese aus Acryl mit einem kurzen Schaft, die aber wegen des Acryl-Abriebs ebenfalls hohe Lockerungsraten zeigte [Judet 1954]. Der Ansatz jedoch wurde von Edward J. Haboush aus New York aufgegriffen, dem es gelang Metallendoprothesen mit Hilfe von Acryl im Knochen zu verankern [Haboush 1953].

### 1.5.2.2 Chemische Grundlagen

Die Basis aller kommerziell erhältlichen und im klinischen Einsatz befindlichen Knochenzemente ist Methylmethacrylat (MMA), ein Ester der Methacrylsäure. Eine Herstellung von Knochenzement aus MMA allein wäre allerdings unmöglich, weil nicht nur die Polymerisation unendlich lang dauern würde und die Volumenabnahme (shrinkage) dabei zu hoch (~20%) wäre, sondern auch enorme, biounverträgliche Hitze von weit mehr als 100°C entstünde.

Aus diesem Grund werden Knochenzemente gewöhnlich als 2-Komponenten-Systeme angeboten: Die Pulverkomponente enthält bereits vorpolymerisiertes Methylmethacrylat (PMMA), während die flüssige Komponente aus monomerischem MMA in wässriger Lösung besteht (Abb. 5). Der Polymerisationsvorgang wird durch Benzoylperoxid (BPO) als Initiator im Pulver und den Co-Initiator Dimethyl-p-Toluidin (DMPT) als tertiäres aromatisches Amin in der flüssigen Komponente aktiviert.



*Abbildung 5: PMMA-Pulver wird MMA in wässriger Lösung zugegeben (a). Nach dem Anrühren (b) muss der Knochenzement zügig appliziert werden, bevor er aushärtet.*

Auf diese Weise lässt sich bei der innerhalb von Minuten abgeschlossenen Polymerisation sowohl die Volumenschrumpfung des Zements auf 2–3% minimieren als auch die Hitzeentwicklung durch Energiefreisetzung (52 kJ/mol MMA) kontrollieren. Des Weiteren enthält die Pulverkomponente in geringen Mengen röntgendichte Stoffe (z.B. Bariumsulfat) für radiologische Kontrollen, die flüssige Komponente Stabilisatoren und Radikalfänger (z.B. Ascorbinsäure) für den kontrollierten Ablauf der Polymerisation. Beiden kann darüber hinaus Chlorophyll als Farbstoff zur besseren Kenntlichkeit des Knochenzements im Operationssitus beigefügt werden [Kühn 2000].

## **1.6 Komplikationen in der Endoprothetik**

Wie jedes invasive Verfahren ist auch die Implantation einer Gelenkprothese mit allgemeinen Risiken und möglichen Komplikationen behaftet, über die in der Bundesrepublik Deutschland der Arzt den Patienten vor der Operation explizit aufklären muss. Dazu gehören im Wesentlichen die Verletzung von Blutgefäßen und Nerven, das Auftreten thromboembolischer Ereignisse, mechanische Komplikationen und Infektionen [Calligaro et al. 2003; Colwell Jr 2006; Farrell et al. 2005; Friedman 2007; Schinsky et al. 2001; Wilson et al. 2003].

### **1.6.1 Mechanische Komplikationen**

Am häufigsten treten in der Endoprothetik mechanische Komplikationen auf. Die Lockerung oder Luxation einer Gelenkprothese führt zu einer inhomogenen Belastungsverteilung und kann mit oder ohne eintretenden Bruch des Materials zum totalen Funktionsverlust der Endoprothese führen, so dass die Prothese in einem Revisionseingriff gewechselt werden muss [Amstutz et al. 2004; Dobzyniak et al. 2006; Dorr et al. 1983; Homesley et al. 2004; Meek et al. 2006]. Auch signifikante Beinlängendifferenzen durch die falsche Wahl der Implantatgröße oder –länge, die zu Hinken und veränderten statischen Verhältnissen des Skeletts führen, müssen revidiert werden [Austin et al. 2003; Clark et al. 2006; Maloney et al. 2004].

### **1.6.2 Infektionen**

Zu den schwerwiegendsten und gefürchtetsten Komplikationen in der Endoprothetik zählen Infektionen. Unter einer Infektion versteht man den Befall eines Makroorganismus (Mensch, Tier, Pflanze) durch Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen, Parasiten) und die dadurch verursachte Entstehung von Krankheiten. Davon abzugrenzen ist die physiologische Kolonisation eines Makroorganismus durch Mikroorganismen, z.B. die bakterielle Besiedlung der Haut oder des Darms, ohne Krankheitsentstehung oder mit gegenseitigem Nutzen (Symbiose) [Kayser 2005; Pschyrembel 2007].

Die Übertragung des Erregers erfolgt entweder durch direkten Kontakt oder einen Zwischenwirt (indirekt) oder über zerstäubte Sekrete (Tröpfcheninfektion). In der Folge kommt es zu einer starken Vermehrung des eingedrungenen Erregers im Wirtsorganismus. Die Zeit zwischen dem Befall des Organismus bis zum Auftreten erster Krankheitssymptome wird als Inkubationszeit bezeichnet [Kayser et al. 2005].

Nach der Ausprägung der hervorgerufenen Symptome unterscheidet man stumme (ohne klinische Symptome), abortive (leichte Krankheitserscheinungen) und manifeste Infektionen (deutliche Krankheitserscheinungen). In Verbindung mit dem zeitlichen Ablauf ergibt sich daraus die Einteilung in foudroyante (schneller Beginn, schwerer Verlauf, oft tödlich), akute (plötzlicher Beginn, schwerer Verlauf über Tage), chronische (schleichender Beginn, mittelschwerer Verlauf über Monate bis Jahre), rezidivierende (wiederkehrende akute Schübe) und latente Infektionen (klinisch stumm über Monate bis Jahre) [Pschyrembel 2007].

Für die Entstehung einer Infektion sind aber nicht nur die Keimzahl und die Pathogenität eines Erregers, sondern auch die Immunkompetenz des Wirts entscheidend [Robson 1979]. Während bei geschwächter Immunabwehr eine kleine Menge gering pathogener Keime eine manifeste Infektion verursachen kann, sind bei intakter Immunlage große Mengen hochpathogener Keime notwendig, um eine Infektion hervorzurufen [Kalicke et al. 2004; Hansis 1996; Hansis et al. 1996]. Die Immunkompetenz setzt sich dabei aus der systemischen und der lokalen Abwehrlage zusammen, die durch Alter, Vorerkrankungen und Medikamenteneinnahme einerseits und das unmittelbare Operationstrauma andererseits bestimmt werden. Den bereits dargestellten demographischen Prognosen entsprechend werden sich in Zukunft in erheblichem Maße Patienten einem endoprothetischen Eingriff unterziehen, bei denen aufgrund der reduzierten systemischen Abwehrlage ein erhöhtes Infektionsrisiko besteht [Walter 2008; Zimmerli et al. 2004].

### 1.6.2.1 Erregerspektrum

Infektionen allgemein und Knocheninfektionen im Speziellen werden am häufigsten durch Staphylokokken verursacht. Staphylokokken sind ubiquitär, d.h. überall, vorkommende grampositive Bakterien, die als fakultative Anaerobier leicht kultivierbar sind, auch bei Mischinfektionen dominieren und durch die Freisetzung von Entero- und Exotoxinen zu foudroyanten und akuten Infektionen mit fatalem klinischen Verlauf führen können [Gentry 1988; Kayser et al. 2005; Lew et al. 2004; Lowy 1998; Sibbald et al. 2006].

Die vorherrschenden Spezies unter den Staphylokokken sind der Koagulase-positive, d.h. Koagulase produzierende *S. aureus* und der koagulase-negative *S. epidermidis*. Die Koagulase gilt als einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren in der Mikrobiologie, weil sie wie Thrombin die Gerinnung von Fibrinogen zu Fibrin aktiviert, mit dem sich das Bakterium umgibt und sich so vor Phagozytose schützt [Kayser et al. 2005]. Deshalb besitzt *S. aureus* die höchste Pathogenität unter den Staphylokokken, *S. epidermidis* als physiologischer Hautkeim dagegen wird vor allem bei oberflächlichen Infektionen am häufigsten nachgewiesen [Hope et al. 1989; Josefsson et al. 1993; Lentino 2003; Mahan et al. 1991; Nijhof et al. 2000; Peersman et al. 2001].

Im Falle fremdmaterial- bzw. implantatassoziiertes Infektionen treten oftmals aber auch andere koagulase-negative Staphylokokken und Propionibakterien auf. Des Weiteren finden sich regelmäßig besonders bei älteren Patienten gramnegative Bakterien wie

Pseudomonaden, Enterokokken und *E. coli*. Bei kindlichen Infektionen spielen auch Streptokokken und *Haemophilus influenzae* eine nicht zu vernachlässigende Rolle [Cunha 2002; Gentry 1988; Lew et al. 2004; Mahan et al. 1991; Meyers et al. 1973; Paisley et al. 1994; Powers et al. 1990; Ramage et al. 2003; Schierholz et al. 2004; Zeller et al. 2007].

### 1.6.2.2 Allgemeine Pathogenese

Eine Infektion kann endogen oder exogen entstehen [Wirth, Mutschler 2007]. Bei der endogenen Form befindet sich der Erreger bereits im Wirtsorganismus und gelangt auf dem Blutweg (hämatogen), seltener auf dem Lymphweg (lymphogen) an den Ort der späteren Infektion [Lew et al. 2004]. Entsteht die Infektion exogen, dringt der Keim durch eine äußere Eintrittspforte – meist im Rahmen einer intraoperativen Kontamination durch den offenen Operationssitus – in den Wirtsorganismus ein [Wirth, Mutschler 2007].

Nach dem Eindringen in den Wirtsorganismus heftet sich der Keim über selbstexprimierte Oberflächenmoleküle (MSCRAMM = microbial surface components recognising adhesive matrix molecules) an extrazelluläre Proteine des Wirtes an und setzt sich sowohl intrazellulär als auch extrazellulär in interstitiellem Gewebe fest [Clarke et al. 2006; Ellington et al. 2003; Lew et al. 2004; Mandell 2005; Patti et al. 1994]. Durch Mikroembolien und Toxin-Freisetzung wird die lokale Blutversorgung im Wirtsorganismus reduziert [Kayser et al. 2005; Myrvold et al. 1977]. Zusätzlich begünstigen Hohlräume, Hämatome, Weichteilnekrosen und avitale Knochenfragmente (Sequester) im Operationsgebiet die bakterielle Besiedlung. Daneben können hohes Alter, Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme und Genussmittelabusus die Abwehr des Wirts schwächen und der Ausbreitung einer Infektion Vorschub leisten [Calhoun et al. 2005; Lazzarini et al. 2004; Roesgen et al. 1989].

### 1.6.2.3 Spezielle Pathogenese

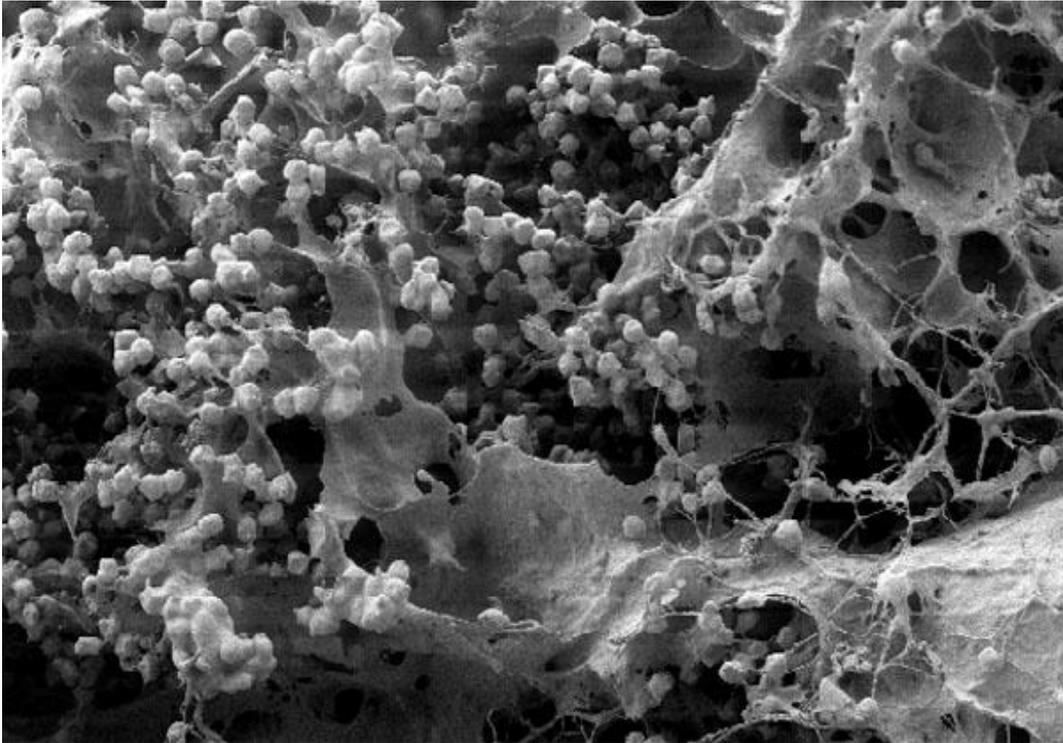
Postoperative Infektionen in der Endoprothetik entstehen fast immer exogen, d.h. durch Keimeintritt in die Operationswunde. Bereits eine Studie aus dem Jahr 1957 beobachtete, dass nach Einbringung von Fremdmaterial in Form von Nahtfäden eine 1000fach geringere Menge an *S. aureus* nötig war, um eine Infektion auszulösen, als nach Eingriffen ohne Verwendung von Fadenmaterial [Elek et al. 1957]. 1985 zeigte eine Untersuchung, dass umgekehrt eine bis zu 1000fach höhere Antibiotikadosis

notwendig war, um Bakterien auf einem Urinkatheter zu eliminieren, als bei Infektionen in Abwesenheit von Fremdmaterial [Nickel et al. 1985].

Grund für dieses Phänomen und weiterhin Gegenstand vieler Untersuchungen in der Grundlagenforschung ist die Fähigkeit mancher Bakterienstämme sich an Oberflächen allogener, avitaler Fremdkörper wie Kathetern, Endoprothesen oder Knochenzement anzuheften und eine Polysaccharid-Glykokalix („Biofilm“) auszubilden (Abb. 6), in der sie vor dem Zugriff des Immunsystems und der Wirkung von Antibiotika geschützt sind und sich ungehindert vermehren können [Costerton et al. 1995; Costerton et al. 1999; Donlan 2002; Donlan et al. 2002; Gristina 1987; Silverstein et al. 2003; Stewart et al. 2001; Stoodley et al. 2011; Trampuz et al. 2003; van de Belt et al. 2001].

Klinisch kommt es zu lokalen Schmerzen, Entzündungszeichen wie Rötung, Schwellung und Überwärmung, seröser oder eitriger Sekretion, seltener auch zu Fieber, Schüttelfrost und Nachtschweiß [Kutscha-Lissberg et al. 2004; Lazzarini et al. 2004]. Eine Infektion dieses Ausmaßes ist ohne erneute Operation meist nicht mehr sanierbar. Es droht nicht nur die Ausbildung von ausgedehnten Weichteilnekrosen und Knochensequestern, die ihrerseits wiederum eine ideale Basis für eine weitere Keimbesiedlung und –ausbreitung darstellen, sondern auch die septische Lockerung und der Funktionsverlust der Endoprothese sowie ein schwerwiegender systemischer Krankheitsverlauf bis hin zu einer lebensbedrohlichen septischen Bakteriämie [Costerton et al. 1999; Frommelt 2006; Lewis 2001; Trampuz et al. 2003].

Die Infektionsraten bei gelenkendoprothetischen Operationen an der Hüfte werden mit 1% für primäre Eingriffe bzw. bis zu 3% für Revisionseingriffe angegeben, am Knie mit 3% für primäre Eingriffe und bis zu 6% für Revisionseingriffe [Anguita-Alonso et al. 2005; Antti-Poika et al. 1990; Hanssen et al. 1999; Hanssen 2006; Harris et al. 1990].



*Abbildung 6: Elektronenmikroskopie eines Staphylokokken-Biofilms. Aus dem Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen*

Als einzige Maßnahme, um eine schwere Infektion wirkungsvoll zu bekämpfen und eine Bakteriämie und Sepsis zu verhindern, bleibt oft nur die Entfernung des Fremdmaterials [Crockarell et al. 1998; Jiranek et al. 2006; Mack et al. 2006; van de Belt et al. 2001]. Dieser Schritt stellt aber nur den Anfang eines langen Leidenswegs für Patient und Arzt dar: Nachdem in einem ersten Revisionseingriff sämtliches einliegendes Prothesenmaterial vollständig entfernt, infiziertes Gewebe radikal reseziert (Debridement) und ein antibiotikahaltiger Spacer eingesetzt werden muss, müssen im weiteren Verlauf im Abstand von wenigen Tagen großzügige Gelenk- und Weichteilspülungen durchgeführt und lokale Antibiotikaträger wie Kugelketten oder Vliese eingelegt und gewechselt werden, um die Infektion des Knochen- und Weichteilgewebes vollständig zu beseitigen, bevor die Implantation einer neuen Endoprothese viele Monate später überhaupt in Betracht gezogen werden kann [Crockarell et al. 1998; Hanssen et al. 2004; Schnettler et al. 2004]. Gelingt eine vollständige Sanierung des Infekts nicht, droht eine schwergradige Behinderung (Abb. 7) oder gar eine Amputation [Sierra et al. 2003].



*Abbildung 7: Girdlestone-Situation linksseitig mit Abstützung des Trochanter minor im Acetabulum und des Trochanter major am Os ilium*

Derart schwere Krankheitsverläufe mit wiederholt langen Krankenhausaufenthalten, mehrfachen Revisionseingriffen, langwierigen Rehabilitationsmaßnahmen und fortgesetzter Medikamenteneinnahme bei ungewissem Ausgang stellen nicht nur für den Patienten und sein soziales Umfeld, sondern auch für die Krankenkassen und das Gesundheitssystem eine immense Belastung dar [Barrack et al. 1999; Bozic et al. 2005; Kilgus et al. 2002; Peersman et al. 2001; Persson et al. 1999]. Der erfolgreichen Behandlung, vor allem aber der Prophylaxe von Infektionen kommt deshalb entscheidende Bedeutung in der Endoprothetik zu [Geffers et al. 2001].

## **1.7 Infektionsprophylaxe**

Grundlage für unser heutiges Verständnis und Wissen auf dem Gebiet der Infektiologie und Hygiene war die Entdeckung von Bakterien als Krankheitserregern durch Louis Pasteur (1822-1895) und Robert Koch (1843-1910) [Bordenave 2003; Munch 2003; Schmitt 1982; Schwartz 2001]. Die herausragende Bedeutung der Antisepsis zur Verhinderung einer Infektion erkannte Ignaz Semmelweis (1818-1865) in seiner bahnbrechenden Erforschung des Kindbettfiebers [Best et al. 2004; Tan et al. 2006].

### **1.7.1 Allgemeine Prinzipien**

Während das Ziel einer Infektionsbehandlung die Bekämpfung und Beseitigung einer bereits bestehenden lokalen oder systemischen Infektion ist, versucht die Infektionsprophylaxe die Entstehung einer Infektion zu verhindern. Dies ist grundsätzlich an zwei Stellen des Pathomechanismus möglich: zum Einen vor oder beim Eindringen eines Keims von außen in den Organismus (exogen), zum Anderen beim Versuch der Ansiedlung, Vermehrung und Ausbreitung eines Keims innerhalb des befallenen Organismus (endogen) [Kayser et al. 2005].

Für die heutige klinische Anwendung sind nach wie vor eine keimarme Umgebung (Operationssaal), sorgfältiges Waschen und Desinfizieren der Hände des Operateurs und OP-Pflegepersonals, mehrmaliges Desinfizieren und steriles Abdecken des Operationsgebiets und die absolute Sterilität der verwendeten Implantate und OP-Werkzeuge essentielle Voraussetzungen, um das Risiko einer bakteriellen Infektion so weit wie möglich zu reduzieren [Koeppen et al. 2005].

### **1.7.2 Prinzip der systemischen Antibiose**

Besteht Anlass zu der Annahme, dass trotz aller antiseptischen äußeren Maßnahmen Keime in den Organismus vordringen werden, oder ist nicht auszuschließen, dass sich Erreger bereits im Organismus befinden, können Antibiotika intravenös oder oral verabreicht werden, die auf verschiedene Art und Weise, z.B. durch Hemmung der Zellwandsynthese oder der Replikationsfähigkeit, entweder die Vermehrung des Keims verhindern (bakteriostatisch) oder den Keim direkt abtöten (bakterizid) [Lüllmann et al. 2004]. Man unterscheidet antibiotische Einmal-, Langzeit- und Dauertherapie [Stille et al. 2005].

Etabliert und in mehreren klinischen Studien als effektive Infektionsprophylaxe in der Endoprothetik nachgewiesen ist die prä- und perioperative intravenöse Einmalgabe („single-shot“) von Antibiotika zur Reduktion der Morbidität und Mortalität [Bratzler et al. 2005; Hanssen et al. 1999; Hawn et al. 2006; Silber et al. 2005; Tang et al. 2003]. Insbesondere bei Revisionseingriffen ist aber häufig auch eine postoperative systemische Antibiotikagabe oral oder parenteral in hoher Dosierung über längere Zeit erforderlich, die als belastend empfunden wird, ihrerseits Risiken und Nebenwirkungen birgt und kostenintensiv ist [Frommelt 2006]. Die Auswahl und Dosierung der Antibiose muss sich dabei immer nach der Empfindlichkeits- bzw. Resistenzlage des Erregers (Antibiogramm bzw. Resistogramm) richten, aber auch Grund- und

Begleiterkrankungen des Patienten berücksichtigen [Lamp 1996; Pakyz 2007; Wirth, Mutschler 2007].

### **1.7.3 Prinzip der lokalen Antibiose**

Um die Konzentration antimikrobieller Substanzen im Bereich des Infektherds oder zur Infektionsprophylaxe zu erhöhen, wenn systemisch erlaubte Höchstdosen allein nicht ausreichend Erfolg versprechen oder das Risiko von Organschäden oder gastrointestinalen Beschwerden reduziert werden soll, können Trägermaterialien lokal appliziert werden, die kontinuierlich Antibiotikum freisetzen und teilweise sogar resorbierbar sind [Kanellakopoulou et al. 2000; Makinen et al. 2005; Wahlig et al. 1984]. Geeignet sind Kollagenschwämme, Kollagenvliese und PMMA-Kugelketten, aber auch Knochenzement und Osteosynthesematerial [Ipsen et al. 1991; Kanellakopoulou et al. 2000; Klemm 1979; Knaepler et al. 1985; Wahlig et al. 1978].

In der Endoprothetik wird vornehmlich Palacos-Knochenzement auf der Basis von Polymethylmethacrylat (PMMA) mit Gentamicin-Zusatz eingesetzt. In einer bedeutenden prospektiven Studie, in der die Freisetzung mehrerer Antibiotika aus verschiedenen Knochenzementen untersucht wurde, konnte nämlich gezeigt werden, dass Gentamicin aus Palacos-Knochenzement nicht nur in zwei- bis dreifach höherer Konzentration, sondern auch über einen wesentlich längeren Zeitraum (mindestens 5 Jahre) als andere Antibiotika aus anderen Knochenzementen freigesetzt wird und in dieser Zeit antibiotisch wirksame Gentamicin-Konzentrationen sowohl im Blutserum und Urin als auch in Gewebe und Wundexsudat aus der unmittelbaren Umgebung des Knochenzements nachzuweisen waren [Wahlig et al. 1980].

### **1.7.4 Knochenzemente mit Antibiotika-Zusatz**

Die Beimischung von Antibiotika zu PMMA-Knochenzement zur Reduktion der Infektionsrate in der Endoprothetik wurde erstmals 1970 von Buchholz und Engelbrecht vorgestellt [Buchholz et al. 1970; Josefsson et al. 1990]. Mehrere klinische Studien belegen sowohl die prophylaktische als auch therapeutische Überlegenheit antibiotikahaltigen Knochenzements in Verbindung mit systemischer Antibiose [Engesaeter et al. 2003; Engesaeter et al. 2006; Espehaug et al. 1997; Josefsson et al. 1981]. Neben Tobramycin und Vancomycin, die jedoch als Reserveantibiotika zurückgehalten werden sollten, wird vor allen Dingen Gentamicin als Zusatz in Knochenzement verwendet, weil es nicht nur eine sehr günstige Elutionskinetik besitzt, sondern auch eine sehr breite und insbesondere gegen Staphylokokken sehr gute

antimikrobielle Wirksamkeit aufweist und sich wegen seiner Hitzebeständigkeit während des Polymerisationsvorgangs ideal zur Beimischung zu Polymethylmethacrylat (PMMA) eignet [Espehaug et al. 1997; Hanssen et al. 1999; Josefsson et al. 1993; Klekamp et al. 1999; Klemm 1979; Nijhof et al. 2000; Nijhof et al. 2000; Nijhof et al. 2001; Thierse 1978; Wahlig et al. 1978; Wannske et al. 1979].

In den USA hingegen wird der Einsatz von antibiotikahaltigem Knochenzement in der primären Endoprothetik und bei aseptischen Revisionseingriffen nach wie vor kontrovers diskutiert. Die Ergebnisse der genannten europäischen Studien, insbesondere des Norwegischen Endoprothetik Registers, die eine signifikant niedrigere Infektionsrate bei Verwendung von antibiotikahaltigem Knochenzement allein und in Verbindung mit systemischer Antibiotika-Gabe zur Infektionsprophylaxe belegen, werden zwar anerkannt. Es bestehen aber weiterhin Bedenken, durch den Einsatz von Knochenzement mit niedrig dosiertem Antibiotika-Zusatz in der Primärendoprothetik könnte die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen gefördert werden. Außerdem sei der flächenhafte und routinemäßige Einsatz von antibiotikahaltigem Knochenzement, vor allem mit entsprechend höheren Antibiotika-Konzentrationen, in der primären Endoprothetik und bei aseptischen Revisionseingriffen zu kostspielig. Deshalb wird in den USA der Einsatz antibiotikahaltigen Knochenzements bei solchen Eingriffen derzeit nur für Patienten empfohlen, die aufgrund ihrer Ausgangssituation vor der Operation ein deutlich erhöhtes Infektionsrisiko aufweisen [Engesaeter et al. 2003; Jiranek et al. 2006].

### **1.8 Bakterielle Resistenzentwicklung**

Die Literatur der vergangenen 15 Jahre berichtet über eine außergewöhnlich starke Resistenzentwicklung pathogener Keime gegenüber Antibiotika [Alanis 2005; Beatson et al. 2014; Chambers 2001; Davies et al. 2010; de Lalla 2001; Fair et al. 2014; Garvin et al. 1999; Livermore 2000; Nicas et al. 1997; Smith et al. 1999; Tang et al. 2014; Thomes et al. 2002].

In einer intakten Mischflora limitieren sich die verschiedenen Bakterienstämme in ihrem Wachstum gegenseitig [Kayser et al. 2005]. Werden aber ein oder mehrere Bakterienstämme durch zufällige Genmutation oder Plasmiderwerb resistent gegenüber einem Antibiotikum, werden alle antibiotikasensiblen Bakterien abgetötet oder an ihrem Wachstum gehindert, während sich resistente Stämme ausbreiten können [Alanis 2005; Davies et al. 2010; Ito et al. 2003; Lüllmann et al. 2004;

Tang et al. 2014]. Antibiotika sollten deshalb generell sehr restriktiv und erst nach Bestimmung der Resistenzlage eingesetzt werden [König et al. 1999; Hsu et al. 2008].

Die unsachgemäße Anwendung von Antibiotika hat zu einer ernstzunehmenden Selektion und Verbreitung von Bakterien geführt, die gegen mehrere Antibiotika gleichzeitig resistent sind (Multiresistenz) [Beatson et al. 2014; Chambers 2001; Davies et al. 1997; Kilgus et al. 2002; Smith et al. 1999]. Infektionen durch multiresistente Bakterien haben generell einen signifikant schlechteren Ausgang als Infektionen, die durch nicht-resistente Keime verursacht werden [Kopp et al. 2004; Skurray et al. 1997]. In einer amerikanischen Studie mit 70 Patienten, bei denen es nach Implantation einer Hüft-TEP oder Knie-TEP zu einer Infektion kam, konnten beim Nachweis Methicillin-sensibler Keime 81% (Hüft-TEP) bzw. 89% (Knie-TEP) der betroffenen Patienten erfolgreich behandelt und die Endoprothese belassen oder im Verlauf eine neue implantiert werden, während beim Nachweis Methicillin-resistenter Bakterien nur 48% (Hüft-TEP) bzw. 18% (Knie-TEP) der Patienten erfolgreich saniert werden konnten. Die übrigen Patienten, bei denen die Infektion nicht beseitigt werden konnte, mussten amputiert, arthrodisiert (gelenkversteift) oder ohne Prothese belassen werden [Kilgus et al. 2002]. Unter den Methicillin-resistenten Bakterien ist der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) besonders gefürchtet, weil er hohe Pathogenität besitzt und medikamentös kaum zu beherrschen ist [Grundmann et al. 2006].

### **1.9 Antimikrobieller Effekt von Silber**

Bei infizierten Verletzungen und schwer zu behandelnden Infektionskrankheiten wurde von Ärzten bereits im 18. Jahrhundert Silber eingesetzt, anfangs vor allen Dingen bei der Behandlung von Geschlechtskrankheiten, Akne und Beinulzera [Lansdown 2002]. Der französische Arzt Carl Credé (1819 – 1892) erkannte als Erster den prophylaktischen Nutzen von silbernitrat-haltigen Augentropfen, wobei die therapeutische Wirksamkeit von Silbernitrat bei der Behandlung der durch Gonokokken verursachten Augeninfektionen bei Neugeborenen (*Ophthalmia neonatorum*) bereits bekannt war [Dunn 2000]. Auch schwere Brandverletzungen, die immer in besonderem Maße infektionsgefährdet sind, wurden schon vor Jahrzehnten mit Wundauflagen versorgt, die mit silbernitrat-haltigen Lösungen getränkt waren [Chu et al. 1988; Moyer et al. 1965; Wyatt et al. 1990].

Dies unterstreicht den Stellenwert der Infektionsprophylaxe im Vergleich zur Behandlung einer manifesten Infektion, da Prophylaxe in der Regel deutlich geringeren

zeitlichen und materiellen Aufwand erfordert und kostengünstiger als ist als die Behandlung einer manifesten Infektion [Marculescu et al. 2005].

Angesichts der Zunahme bakterieller Resistenzen gegenüber Antibiotika spielt Silber in der Infektionsprophylaxe eine immer wichtigere Rolle, weil bisher kein Organismus objektivierbare Immunitätsreaktionen auf Silber gezeigt hat [Lansdown et al. 2007; Walter 2008; Zhao et al. 1998].

### **1.9.1 Wirkmechanismus**

Silber ist ein stark toxisches Schwermetall, das in hochaktiven Reaktionen an die Thiol(SH)-Gruppen von Proteinen bindet und Strukturveränderungen und -schäden an intra- und extrazellulären Membranen, insbesondere Zell- und Kernmembranen, verursacht. Außerdem kommt es als Folge der gehemmten Zellwandsynthese zu einem Ausstrom von essentiellen Zellnährstoffen wie Phosphat und Glutamin. Intrazellulär hemmt Silber die Atmungskette durch Interaktion mit den Zytochromen und dem Flavoprotein in der NADH- und der Succinatdehydrogenase-Region. Als Reaktion auf die denaturierenden Effekte von Silberionen kondensieren die DNA-Moleküle und können nicht mehr repliziert werden [Bragg et al. 1974; Feng et al. 2000; Lansdown 2002; Schreurs et al. 1982; Slawson et al. 1990; Zhao et al. 1998].

Der breite antimikrobielle Effekt von Silber beruht also insgesamt auf der Schädigung von Zellproteinen, der Hemmung der mitochondrialen Zellatmung und der Inaktivierung der DNA- und RNA-Replikation, so dass Mikroorganismen ihre Vermehrungs- und Lebensfähigkeit verlieren [Lansdown 2002].

### **1.9.2 Nebenwirkungen**

Allerdings bleiben toxische Wirkungen von Silber nicht nur auf Mikroorganismen beschränkt. In Tierversuchen wurde beobachtet, dass bis zu 10% des inkorporierten Silbers absorbiert und an Albumin, Globuline und Transferrin gebunden transportiert wird [Rungby 1990]. Als Folge der erhöhten Silberkonzentration im Serum kommt es zu einer Anreicherung vorwiegend in Geweben, die nicht durch die Blut-Hirn-Schranke geschützt sind. Im zentralen Nervensystem (ZNS) fanden sich dabei die größten Mengen Silber in Kleinhirn- und motorischen Hirnstammkernen [Rungby 1990]. Aber auch im peripheren Nervensystem (PNS) und in Leber- und Nierengewebe zeigten sich Silberablagerungen, die zu klinisch relevanten neurologischen Ausfällen und Einschränkungen der Leber- und der Nierenfunktion führten [Lansdown 2002; Rosenman et al. 1979; Rungby 1990; Sudmann et al. 1994; Vik et al. 1985]. Darüber

hinaus werden in der Literatur Graufärbungen der Haut (*Argyria*) und der Augen (*Argyrosis*) mit Sehschwäche beschrieben [DiVincenzo et al. 1985; Holzegel 1970; Jensen et al. 1988; Rosenman et al. 1979; Rungby 1990].

### 1.9.3 Anwendungen in der Medizin

Silber wird heute in ionischer Form als Silbersalz in Wundauflagen und Cremes verwendet, aber auch künstliche Herzklappen, Gefäß- und Blasenkatheter sowie Prothesen werden mittlerweile mit ionischem Silber beschichtet, um bakterielle Infekte zu verhindern bzw. zu bekämpfen [Bechert et al. 1999; Bechert et al. 2000; Boswald et al. 1999; Furno et al. 2004]. Die Erstbeschreibung einer Beimischung von Silbersalzen zu Knochenzement stammt aus dem Jahr 1979 [Dueland et al. 1982; Spadaro et al. 1979; Vik et al. 1985].

### 1.10 MikroSilber-Knochenzement

MikroSilber ist eine Entwicklung des Medizintechnik-Unternehmens Bio-Gate AG, Nürnberg, Deutschland in Zusammenarbeit mit der Fraunhofer Gesellschaft, München, Deutschland.

#### 1.10.1 Eigenschaften

MikroSilber unterscheidet sich von herkömmlichem kommerziellen Silberpulver darin, dass es elementar, d.h. metallisch, in nicht-ionischer Form in Primärpartikeln mit einer Größe von 5 – 50 Nanometern (nm) vorliegt, die sich zu Agglomeraten von 2 – 5 Mikrometern ( $\mu\text{m}$ ) zusammenlagern (Abb. 8).

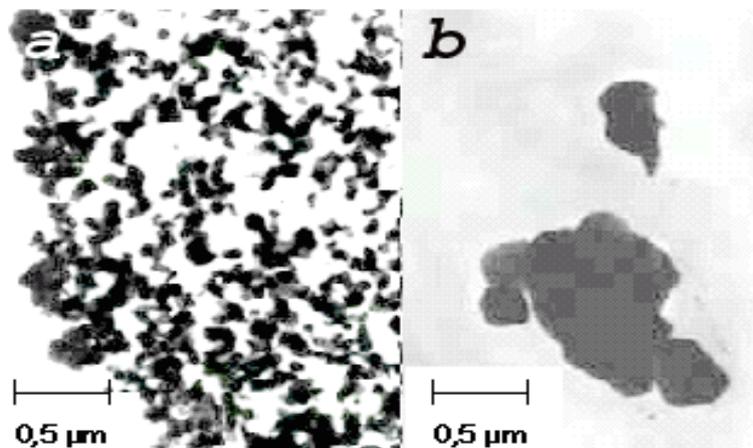
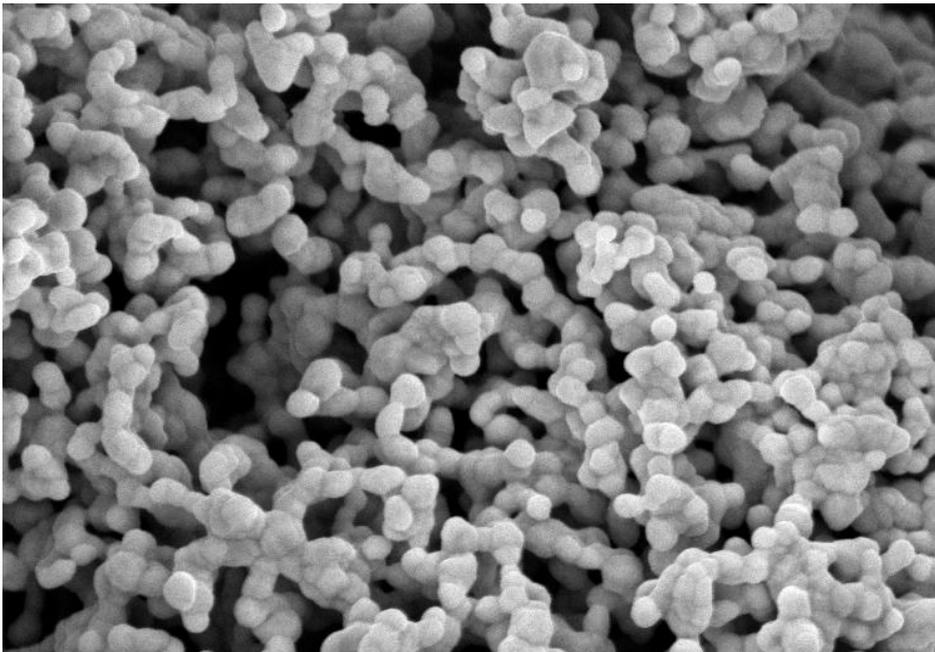


Abbildung 8: Partikelgröße von MikroSilber (a) und herkömmlichem kommerziellen Silber (b) im Vergleich

Selbst wenn sich die MikroSilber-Partikel zu Agglomeraten zusammenlagern, kommt es wegen der geringen Größe der Primärpartikel zu einer starken Vergrößerung der biologisch aktiven Oberfläche und zur Erhöhung der Porosität: Während die Oberfläche von normalem Silber 1-2 m<sup>2</sup>/g beträgt, besitzt MikroSilber eine Oberfläche von 4 m<sup>2</sup>/g bei einer Porosität von 85-95% im Vergleich zu 0% bei herkömmlichem Silber [Alt et al. 2004]. Deshalb wird diese Form von Silber als mikroporöses Silber bezeichnet (Abb. 9).



*Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Darstellung der aktiven Oberfläche und hohen Porosität von MikroSilber. Aus dem Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen*

Die im Vergleich wesentlich geringere Partikelgröße von MikroSilber sollte zu einer gleichmäßigeren antimikrobiellen Abschirmung der Zementoberfläche führen, während es durch die metallische, nicht-ionische Form von MikroSilber zu einer kontrollierteren Freisetzung von Silberionen als bei herkömmlichem Silber kommt, so dass sich die Silberwirkung auf den Knochenzement und seine Oberfläche beschränkt und sowohl zytotoxische Effekte in anliegendem Gewebe als auch oben beschriebene systemische Nebenwirkungen minimiert werden [Alt et al. 2004].

Die antimikrobielle Aktivität und Zellverträglichkeit des Silberknochenzements wurde zunächst *in vitro* gegen den Methicillin-resistenten *Staphylococcus-aureus*-Stamm (MRSA) Eugen Domann Culture Collection (EDCC) 5246 mit hoher Gentamicin-

Resistenz (minimal inhibition concentration (MIC) > 64 µg/ml) aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen untersucht, der im Rahmen eines septischen Revisionseingriffs aus einer Fußwunde beim Menschen gewonnen worden war. Um die minimal notwendige Konzentration Silber zu bestimmen, die zu einer vollständigen Hemmung bakteriellen Wachstums führt, wurden PMMA-Knochenzement-Proben mit gewichtsbezogenem Zusatz von 0,1%, 0,5% und 1,0% MikroSilber hergestellt. Als Vergleich für die Testung dienten PMMA-Zement mit 2,5%igem Zusatz von Gentamicin und reiner PMMA-Zement ohne Zusätze.

### **1.10.2 *in-vitro*-Testung**

Verwendet wurde ein *in-vitro*-Bakterienproliferationsassay (Numetrika), bei dem zunächst Proben der genannten Zemente auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit  $10^6$  keimbildenden Einheiten (KBE) MRSA EDCC 5246 pro Loch in 250 µl Zellsuspension für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Danach wurden die Proben mit PBS-Puffer ab gespült und in Trypticase Soja Medium bei 37°C für 18 Stunden erneut inkubiert. Fehlende antimikrobielle Aktivität der Zementproben führte dabei zu einer Vermehrung adhärenter Bakterien auf der Zementoberfläche und zur Aussaat von Tochterzellen in die Zellsuspension. Im Falle antimikrobieller Wirksamkeit der Zementproben hingegen wurden das Wachstum und die Aussaat von Tochterzellen in das Medium verzögert oder ganz unterdrückt. Ein Mikrotiterplatten-Lesegerät (VersaMax<sup>®</sup>, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) erfasste die Wachstumskinetik ausgesäeter Bakterien kontinuierlich über 36 Stunden und erstellte Zeit-Proliferations-Kurven [Bechert et al. 2000].

Es zeigte sich, dass die antimikrobielle Wirksamkeit von MikroSilber-Knochenzement konzentrationsabhängig war. Während PMMA-Knochenzement ohne Zusatz antibakterieller Substanzen und Gentamicin-Knochenzement 2,5% gegen MRSA wie erwartet wirkungslos waren, zeigte MikroSilber-Knochenzement 1% eine vollständige Hemmung bakteriellen Wachstums (Abb. 10).

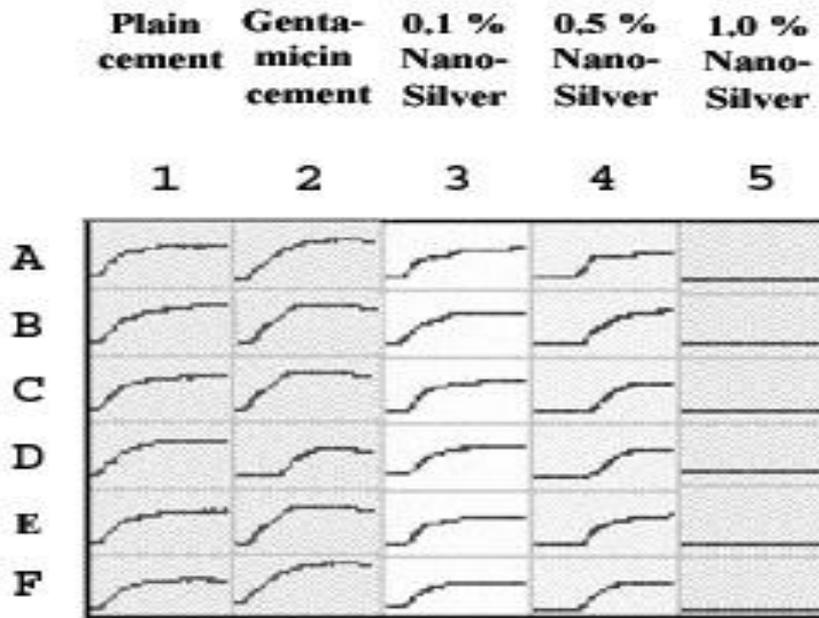


Abbildung 10: Antimikrobielle Aktivität von Silberknochenzement 0,1%, 0,5% und 1,0% gegen MRSA. Aus: Alt et al. 2004

Zur Bestimmung der Zytotoxizität gemäß DIN ISO 10993-3 zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten auf Genotoxizität, Karzinogenität und Reproduktionstoxizität wurde ein Extraktionsmedium-Test mit Mausfibroblasten durchgeführt und dabei die LDH-Freisetzung, der Gesamtproteingehalt und die Anzahl vitaler Fibroblasten bestimmt. Als nicht-toxische Kontrolle diente reines Zellkulturmedium, als toxische Kontrolle Triton X 100 (Abb. 11). MikroSilber 1% unterschied sich dabei in keinem der gemessenen Parameter signifikant von dem nicht-toxischen Zellkulturmedium, sehr wohl aber von der toxischen Triton-Gruppe. Außerdem wurde das Anwuchsverhalten humaner Osteoblasten auf mikroporösem Silberzement 1% fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Silberknochenzement 1% und dem nicht-toxischen Kontrollmedium [Alt et al. 2004].

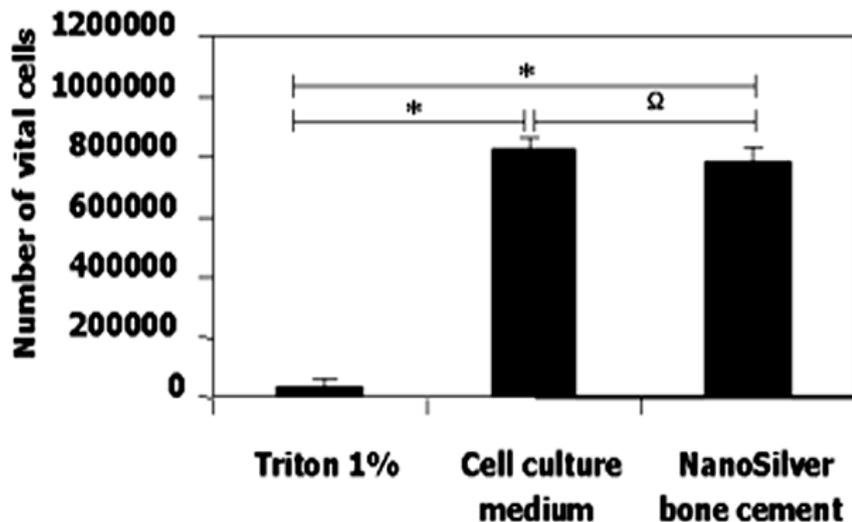


Abbildung 11: Anzahl vitaler Fibroblasten im Zytotoxizitätstest.  
Aus: Alt et al. 2004

Mikroporöser Silberknochenzement 1% wies *in vitro* eine hervorragende antimikrobielle Aktivität gegen multiresistente Keime auf, die von Gentamicin-Knochenzement nicht erreicht wurde, und zeigte darüber hinaus keine zytotoxischen Effekte.

### 1.11 Problemstellung der Arbeit

Nach der erfolgreichen *in-vitro*-Testung war Gegenstand der anschließenden und im Folgenden dargestellten Untersuchungen im Kaninchenmodell deshalb die Frage, ob MikroSilber 1% auch *in vivo* eine hohe antimikrobielle Wirksamkeit gegen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) besitzt und die Verwendung von MikroSilber-Knochenzement im Vergleich zu PMMA-Knochenzement ohne Zusatz antimikrobiell wirksamer Substanzen und Gentamicin-Knochenzement zu einer Reduktion der Infektionsrate führt.

## 2 Material und Methode

### 2.1 Studiendesign

Die Untersuchung wurde in eine Pilotstudie und eine Hauptstudie unterteilt. Für beide Testreihen im Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie (fzmb) Bad Langensalza, Thüringen, wurde vom Thüringischen Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der Einsatz von insgesamt 28 Kaninchen genehmigt (Aktenzeichen: Reg. Nr. 14-02/03 und 14-04/03).

#### 2.1.1 Pilotstudie

Um das etwaige Ausbleiben einer Infektion später zweifelsfrei auf die antimikrobielle Wirkung von Antibiotika-Knochenzement (Gentamicin-PMMA 2,5%) bzw. MikroSilber-Knochenzement 1% und nicht auf die Immunkompetenz des Versuchstiers zurückführen zu können, musste zunächst in einer Pilotstudie die Konzentration an Bakterien bestimmt werden, die ohne Applikation antimikrobieller Substanzen bei allen Versuchstieren zu einer Infektion führt. Getestet wurden Dosen von  $10^4$  bis  $10^7$  KBE MRSA EDCC 5246 bei jeweils 2 Kaninchen (insgesamt 8) unter Verwendung von Plain PMMA (Tab. 1). Dazu wurden die Tiere zunächst nummeriert und durch einen Zufallsgenerator randomisiert einer der Dosen von  $10^4$  bis  $10^7$  KBE MRSA zugeteilt.

Inokulierter Keim	Art des Knochenzements	Inokulationsdosis	Anzahl der Tiere
MRSA EDCC 5246	Plain PMMA	$10^4$	2
		$10^5$	2
		$10^6$	2
		$10^7$	2

*Tabelle 1: Protokoll der Pilotstudie*

Die Pilotstudie wurde methodisch in gleicher Art und Weise wie die im Folgenden dargestellte Hauptstudie durchgeführt.

### 2.1.2 Hauptstudie

Für die Hauptstudie standen 20 Kaninchen zur Verfügung. Es wurden deshalb zunächst 2 Hauptgruppen von jeweils 10 Tieren geplant, von denen der einen Gruppe eine Dosis von  $10^7$ , der anderen eine Dosis von  $10^8$  MRSA EDCC 5246 entsprechend den Ergebnissen der Pilotstudie inokuliert werden sollte. Beide Hauptgruppen wurden weiter in je 2 Untergruppen von jeweils 5 Tieren unterteilt, um bei jeweils einer Gruppe Gentamicin-PMMA 2,5%, bei der anderen MikroSilber 1% zu applizieren und auf diese Weise die antimikrobielle Wirksamkeit von MikroSilber 1% gegenüber der von Gentamicin-PMMA 2,5% bei Infektionen unterschiedlicher Schwere (MRSA  $10^7$  bzw.  $10^8$ ) zu testen (Tab. 2).

Zur Randomisierung der Hauptstudie wurde wiederum durch einen Zufallsgenerator eine Liste erstellt, die für jedes Versuchstier entweder die Applikation von Gentamicin-PMMA 2,5% oder von MikroSilber 1% vorsah. In der Praxis wurden alle 20 Kaninchen zuerst in einen einzigen großen Käfig gebracht, danach einzeln wieder herausgenommen und in der Reihenfolge, in der sie herausgenommen wurden, nummeriert und der vom Zufallsgenerator zuvor festgelegten Inokulation von  $10^7$  oder  $10^8$  MRSA und der Applikation von Gentamicin-PMMA oder MikroSilber 1% zugeteilt.

Inokulierter Keim	Art des Knochenzements	Inokulationsdosis	Anzahl der Tiere
MRSA EDCC 5246	Gentamicin- PMMA	$10^7$	5
		$10^8$	5
	MikroSilber- PMMA	$10^7$	5
		$10^8$	5

*Tabelle 2: Protokoll der Hauptstudie*

## 2.2 Kaninchen

Die *in vitro* nachgewiesene antimikrobielle Wirksamkeit von MikroSilber 1% sollte *in vivo* an einem etablierten Tiermodell getestet werden. Bei vergleichbaren Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit von Antibiotika-Knochenzement wurden Kaninchen eingesetzt. Deshalb fand das von Marc Nijhof, Utrecht (Niederlande), entwickelte und mehrfach publizierte Kaninchen-Modell Anwendung, das auf den nächsten Seiten ausführlich dargestellt wird [Nijhof et al. 2000; Nijhof et al. 2000; Nijhof et al. 2001].

Alle Versuchstiere waren Kaninchen, die aus dem Zuchtbetrieb Ronald Krieg, Niederwünsch, Sachsen-Anhalt, stammten und vor Beginn der Versuchsreihen veterinärmedizinisch untersucht und für gesund befunden worden waren. Prä- und postoperativ bis zur Euthanasierung wurden die Kaninchen in zufälligen Zweiergruppen in bau- und ausstattungs gleichen Laufställen mit Einstreu, Fütterung mit Standarddiät für Kaninchen und Wasser ad libitum gehalten.

## 2.3 Bakterien

Als pathogener Keim wurde der bereits *in vitro* verwendete MRSA-Stamm EDCC 5246 mit hoher Gentamicin-Resistenz (minimal inhibition concentration (MIC) > 64 µg/ml) aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendet.

## 2.4 Knochenzemente

Bei der zunächst zur Bestimmung der sicher infektionsinduzierenden Keimdosis durchgeführten Pilotstudie wurde ausschließlich PMMA-Knochenzement ohne Zusatz antimikrobieller Substanzen (Plain PMMA) eingesetzt. Bei der Hauptstudie zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit wurde PMMA-Knochenzement mit 4%igem Zusatz von Gentamicinsulfat (entspricht 2,5% Gentamicin-Base als eigentlich antibiotisch wirksamer Komponente) zur Pulverkomponente und PMMA-Knochenzement mit 1,0%igem Zusatz von MikroSilber der Fa. Bio-Gate, Nürnberg, Deutschland zur Pulverkomponente entsprechend den Ergebnissen der *in-vitro*-Versuchsreihe verwendet.

Alle drei Knochenzemente wurden als gebrauchsfertige 2-Komponenten-Systeme (Monomer und Polymer) von der Firma Coripharm, Dieburg, Deutschland zur Verfügung gestellt und jeweils unmittelbar vor der Applikation in einem Vakuum-

Mischsystem (Easymix<sup>®</sup>, Fa. AAP Biomaterials GmbH, Dieburg, Deutschland) angemischt.

Das Monomer war bei allen 3 verwendeten Knochenzementen identisch. Bei der Produktion wurden unter aseptischen Bedingungen jeweils 20 ml sterilfiltriertes Monomer in braune Brechring-Glasampullen abgefüllt, um das Monomer vor Autopolymerisation durch Einwirkung von Sonnenlicht und Wärme zu schützen. 20 ml des Monomers enthielten dabei 19,87 ml Methylmethacrylat (MMA), das mit 60 ppm Hydrochinon als Radikalfänger stabilisiert worden war, und 0,13 ml Dimethyl-p-Toluidine als Polymerisationsaccelerator. Zur Herstellung einer Applikationsdosis Knochenzement für 1 Kaninchen wurden 10 ml Monomer aus einer Ampulle herauspipettiert und mit einer Portion des gewünschten Polymers (Plain, Gentamicin 2,5%, MikroSilber 1%) angerührt.

Eine Portion Polymer (ca. 21 g) für Plain PMMA bestand dabei aus 9,50 g Polymethylmethacrylat (PMMA) als Homopolymer, 9,50 g PMMA-Butadien-Styrol-Copolymer, 0,25 g Benzoylperoxid 75% als Polymerisationsinitiator und 1,90 g Zirkoniumdioxid. Zur Herstellung des gentamicinhaltigen Knochenzements 2,5% bzw. MikroSilber 1% enthielt das Pulver zusätzlich 0,80 g Gentamicinsulfat mit 0,50 g Gentamicin-Base oder 0,21 g MikroSilber. Die Polymere waren bei der Produktion in peelbare Papier-PE-Beutel eingewogen und mit Ethylenoxid gassterilisiert worden.

Nach dem Anrühren wurde der Knochenzement mit einer Applikationspistole durch eine 3x50 mm große Edelstahlkanüle mit einem Lumen von 2,3 mm in den Markraum des Kaninchenfemurs injiziert und das proximale Femur vollständig auszementiert.

## **2.5 Versuchsdurchführung**

Die ordentliche Durchführung der Versuchsreihen wurde von einem unabhängigen Tierschutzbeauftragten des Landes Thüringen überwacht, der unangemeldet den Ablauf der Versuche kontrollierte.

### **2.5.1 Narkose**

Die Narkose wurde von einer Tierärztin durchgeführt. Nach der anticholinergen Prämedikation mit Atropin 0,1 mg/kg Körpergewicht und einer Sedierung mit Diazepam erfolgte die Injektionsnarkose durch die intramuskuläre Gabe von Ketanest (60 mg/kg

KG) oder Rompun (4 mg/kg KG) und wurde bei Bedarf durch Inhalationsgase aufrechterhalten.

### 2.5.2 Operation

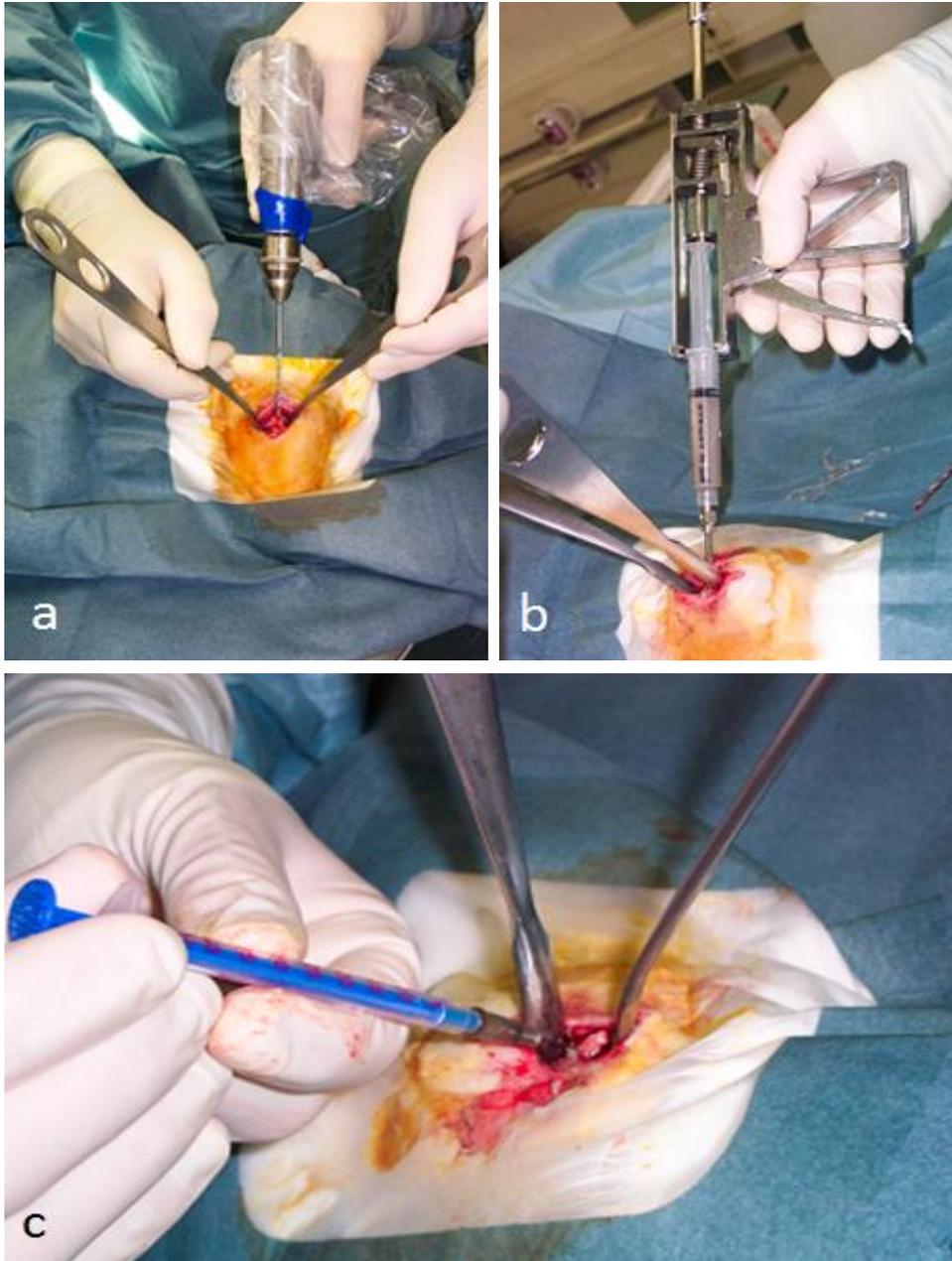
Jedes Kaninchen wurde nach Eintritt der Vollnarkose am linken Femur operiert. Das rechte Femur blieb unangetastet. Um bestmögliche Sterilität während des Eingriffs zu erreichen und eine Kontamination mit Fremdkeimen zu verhindern, wurde zunächst die Haut im Bereich des Hüftgelenks und des proximalen Femurs rasiert, das Operationsgebiet in typischer Weise mehrfach desinfizierend jodiert und steril abgedeckt (Abb. 12).



Abbildung 12: Desinfektion des rasierten OP-Gebiets

Nach der bogenförmigen Hautinzision über dem Hüftgelenk erfolgte die teils scharfe, teils stumpfe Freilegung des Trochanter tertius. Die Kortikalis des Femurs wurde mit einem Minibohrer manuell penetriert. Auf diese Weise erlangte man Zugang zum Markraum, der mit Pressluft-Bohrern (Airdrill) der Stärken 2,0 mm, 2,7 mm und 3,5 mm den jeweiligen anatomischen Verhältnissen entsprechend in die Tiefe bis etwa zur Schaftmitte weiter eröffnet wurde. Um den Austritt der eingespritzten Bakterien zu verhindern, wurde der Markraum zuerst mit einer geringen Menge Gentamicin-2,5%-PMMA oder MikroSilber-1%-PMMA verschlossen. Solange diese Zementplombe noch nicht ausgehärtet war, wurde dann die jeweilige Inokulationsdosis von  $10^7$  oder  $10^8$

MRSA möglichst randständig, um die Injektionskanüle möglichst nicht mit Knochenzement zu verstopfen, durch die Zementplombe inokuliert und der Markraum des proximalen Femurs anschließend vollständig auszementiert (Abb. 13).



*Abbildung 13: Aufbohrung (a) und Auszementierung des proximalen Femurs (b) und Inokulation der MRSA-Bakterien (c)*

Mit Vicryl 3.0 erfolgte schließlich der schichtweise Wundverschluss, mit Prolene 4.0 die adaptierende Hautnaht. Um eine Wunddehiszenz oder gar Wundöffnung durch das Aufbeißen der Wundfäden durch die Tiere und eine Infektion mit anderen Keimen als dem injizierten MRSA-Stamm zu verhindern, wurde die Haut zusätzlich geklammert

und ein Sprühpflaster (Nobecutan) aufgebracht. Zur Ausschaltung des Wundschmerzes erhielten die Tiere Carprofen 0,4mg/kg Körpergewicht als subkutane Injektion.

### 2.5.3 Postoperative Röntgenkontrolle

Das Operationsergebnis, insbesondere die Lage des Knochenzements, wurde abschließend durch unmittelbar postoperativ angefertigte Röntgenaufnahmen kontrolliert und dokumentiert, solange sich das Versuchstier noch in Narkose befand (Abb. 14).



Abbildung 14: Postoperative Röntgenkontrolle

### 2.5.4 Postoperative Beobachtung

Nach dem Eingriff wurden die Kaninchen bis zur Wiedererlangung des Bewusstseins in warmer, leicht kontrollierbarer Umgebung gehalten. Da das Operationsverfahren zu keiner Instabilität oder erhöhten Frakturgefahr des operierten linken Laufs im Vergleich zur nicht operierten Gegenseite führte, konnten die Tiere sofort wieder vollbelasten.

Während der folgenden 14 Tage bis zur Euthanasierung wurden Aktivität, Futter- und Wasseraufnahme, Körpertemperatur und das Körpergewicht ebenso wie die Wundverhältnisse täglich kontrolliert und protokolliert, wobei bei den Wundverhältnissen insbesondere auf Infektzeichen wie Überwärmung, Rötung und Schwellung geachtet wurde.

### **2.5.5 Euthanasie der Tiere**

14 Tage nach dem Eingriff wurden die Kaninchen nach oben dargestelltem Protokoll erneut sediert, in Narkose versetzt und dann durch eine Injektion Nembutal intraperitoneal (i.p.) schmerzlos getötet.

### **2.5.6 Auswertung der Versuche**

Der Nachweis des Auftretens oder Ausbleibens einer Knocheninfektion wurde vor der Tötung klinisch, nach der Tötung radiologisch, mikrobiologisch und histopathologisch geführt.

#### **2.5.6.1 Röntgenverlaufskontrolle**

Unmittelbar nach der Tötung erfolgte zunächst eine nochmalige Röntgenkontrolle zur Dokumentation des Verlaufs. Dabei wurde auf folgende Infektionszeichen geachtet:

1. Knochen- und Gelenkdestruktion
2. Sequesterbildung
3. Osteolysen
4. Verdickung der Kortikalis mit periostaler Reaktion

#### **2.5.6.2 Entnahme der Femora**

Zur Probengewinnung wurde das OP-Gebiet erneut mehrfach desinfiziert, steril abgedeckt, die Wunde des ersten Eingriffs eröffnet und das linke Femur freipräpariert und entnommen, wobei die Osteotomie des Femurs mit einer oszillierenden Säge jeweils distal und weit proximal durchgeführt wurde. Danach wurde das Femur mit der Säge in der vorderen und hinteren Medianlinie longitudinal gespalten, so dass eine mediale und eine laterale Kortikalishälfte entstanden, die mit Hilfe eines Meißels vorsichtig von der innen anliegenden Zementplombe gelöst wurden (Abb. 15).



*Abbildung 15: Kortalishälften mit Zementplombe*

Zum späteren Vergleich der histologischen Ergebnisse mit den mikrobiologischen Ergebnissen wurde eine beliebige der beiden Kortalishälften für die histologische Untersuchung asserviert, während die andere umgehend mikrobiologisch aufgearbeitet wurde.

### **2.5.6.3 Mikrobiologische Untersuchung**

Alle mikrobiologischen Arbeitsschritte und Auswertungen wurden unter streng sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination mit Fremdkeimen zu vermeiden.

### **2.5.6.4 Aufarbeitung und Ausstrich**

Die für die mikrobiologische Untersuchung vorgesehene Kortalishälfte wurde zunächst gewogen, bevor sie mit 10 ml/1,0 g Knochengewicht Phosphate-Buffered Saline (PBS) in einer Glaskuvette mit einem Mahlgerät (Polytron<sup>®</sup> T 2100, Fa. Kinematica, Littau, Schweiz) 2 Minuten lang bei 2000 Umdrehungen pro Minute, danach für weitere 3 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zu einem Homogenisat zermahlen wurde, das als 10<sup>0</sup>-Lösung bezeichnet wurde (Abb. 16). Um später das Auszählen der Bakterienkolonien im Falle einer Infektion zu erleichtern, wurden Verdünnungen um die Faktoren 10 und 100 hergestellt, indem zunächst 500 µl aus der 10<sup>0</sup>-Lösung in eine gesonderte leere Kuvette, davon 100 µl in eine mit 900 µl PBS vorbereitete Kuvette und davon wiederum 100 µl in eine weitere Kuvette mit 900 µl PBS pipettiert wurden, so dass die Lösungen 10<sup>-1</sup> und 10<sup>-2</sup> entstanden.



*Abbildung 16: Zermahlung des Knochenpräparats*

Von allen drei Lösungen  $10^0$ ,  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  wurden jeweils 25  $\mu\text{l}$  auf Brain-Heart-Infusion(BHI)-Agarplatten pipettiert, gleichmäßig ausgestrichen und für 48 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Brutschrank inkubiert.

Die Zementplomben hingegen wurden zunächst in einem Ultraschallbad von lose anliegenden Zellen gereinigt, bevor sie mit einer sterilen Pinzette mittig in Standardpetrischalen gelegt und jeweils mit 50 ml flüssigem, auf  $42^\circ\text{C}$  abgekühltem Standardnähragar überschichtet wurden. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Proben für 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank bebrütet.

Als Infektion wurde das makroskopisch sichtbare Wachstum von Bakterienkolonien im Ausstrich auf den Nähragarplatten oder um die Zementplombe herum im eingegossenen Agar definiert (Abb. 17). Im Falle eines Bakterienwachstums wurden verschiedene biochemische und molekulargenetische Untersuchungen zur eindeutigen Identifizierung des Erregers durchgeführt. Dabei wird durch die biochemischen Tests (Latexagglutinationstest, API<sup>®</sup> Staph Test) die Spezies ermittelt. Die molekulargenetischen Tests (Polymerase-Ketten-Reaktion, Pulsfeld-Gelelektrophorese) erlauben die Differenzierung einzelner Stämme der Spezies.

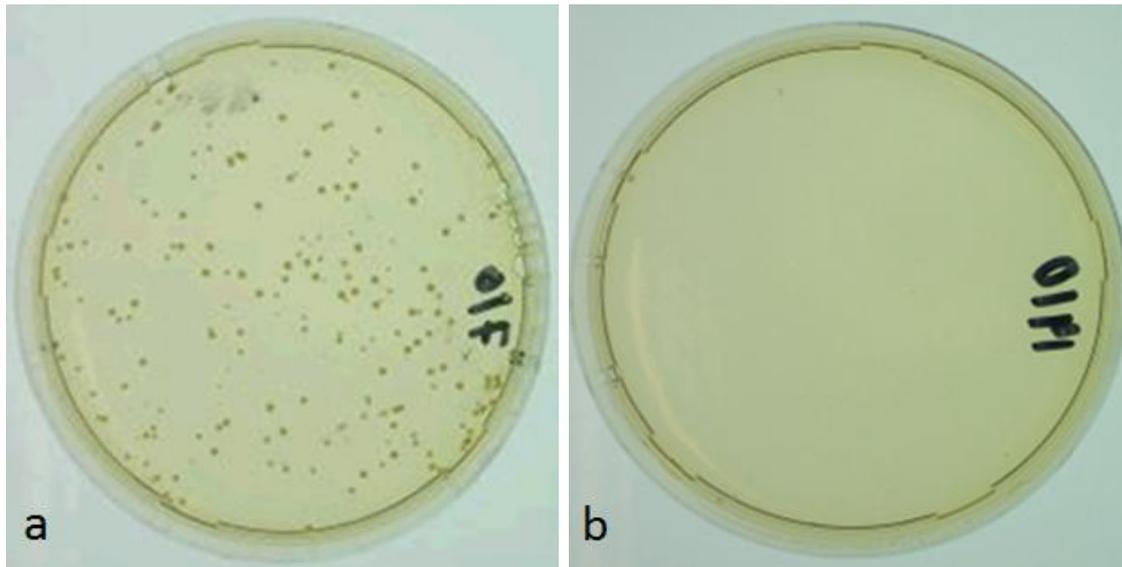


Abbildung 17: Sichtbares (a) bzw. nicht sichtbares (b) Wachstum von Bakterienkolonien auf den Nähragarplatten als Nachweis einer aufgetretenen bzw. ausgebliebenen Infektion

#### 2.5.6.4.1 Latexagglutinationstest

Zur Identifizierung der auf den Nähragarplatten gewachsenen Bakterienkolonien als *Staphylococcus-aureus*-Stamm dient zunächst der Latexagglutinationstest (Staphaurex Plus<sup>®</sup>, Remel Europe Ltd, Dartford, UK).

Einige Staphylokokken, auch und vor allem *Staphylococcus aureus*, besitzen ein zellwandgebundenes Protein, die sog. Staphylokoagulase, die enzymatisch eine Aktivierung der plasmatischen Gerinnung in ihrer unmittelbaren Umgebung im Wirtsorganismus bewirkt. Durch die Reaktion von Staphylokoagulase und Prothrombin im Plasma wird Staphylothrombin produziert, das seinerseits Prothrombin aktiviert, das wiederum die Entstehung von Fibrin aus Fibrinogen katalysiert, so dass ein schützender Fibrinwall um das Bakterium herum entsteht. Die Staphylokoagulase macht die besondere Pathogenität von *Staphylococcus aureus* im Vergleich zu anderen Staphylokokken aus [Kayser et al. 2005].

Bei dem Test werden – ähnlich wie bei der Ausführung des aus der klinischen Praxis bekannten Bedside-Tests vor Bluttransfusionen – zwei verschiedene Testreagenzien auf eine Reaktionskarte aufgebracht. Die erste der beiden Reagenzien enthält mit Fibrinogen, Immunglobulin G und spezifischen monoklonalen Antikörpern beschickte Latexpartikel, die zweite dient als Negativkontrolle. In beide Lösungen werden jeweils

1-3 von der Nähragarplatte entnommene Bakterienkolonien eingerieben. Bei Agglutination in dem Latexreagenz im ersten Kreis auf der Reaktionskarte gilt der Nachweis eines koagulase-positiven *Staphylococcus-aureus*-Stamms als erbracht, solange es bei der Negativkontrolle im zweiten Kreis zu keiner Agglutination kommt. Ist in keinem der beiden Kreise eine Agglutination erkennbar, handelt es sich um einen koagulase-negativen Bakterienstamm. Kommt es unabhängig vom Ergebnis des Latexreagenz im ersten Kreis zu einer Agglutination bei der Negativkontrolle im zweiten Kreis, ist der Test ungültig.

### **2.5.6.4.2 API®-Staph-Test**

Ein Test auf der Basis biochemischer Reaktionen, der ein breiteres Spektrum von Haufenbakterien (Staphylokokken, Mikrokokken) und verwandten Mikroorganismen als der Latexagglutinationstest nachweist, ist der API®-Staph-Test (Fa. bioMérieux, Marcy L'Etoile, Frankreich).

In die Mikroröhrchen des Teststreifens, in denen sich verschiedene dehydrierte Substrate befinden, wird die mit Hilfe eines mitgelieferten Mediums nach McFarland-Standard 0,5 (Trübungsstandard) hergestellte Bakteriensuspension pipettiert. Für den Nachweis anaerober Bakterien müssen danach einige Röhrchen mit Paraffinöl abgedichtet werden, um anaerobe Bedingungen zu schaffen. Nach Inkubation über 24 Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer wird in jedes Röhrchen ein Tropfen Indikator-Lösung gegeben, so dass sich ein Farbumschlag der Substrate einstellt, dessen Profil über alle Röhrchen Rückschlüsse auf den vorliegenden Bakterienstamm erlaubt (Tab. 3).

<b>Tests</b>	<b>Substrate</b>	<b>Reaktionen/Enzyme</b>	<b>Ergebnisse</b>	
			<b>positiv</b>	<b>negativ</b>
0	keine	Negativkontrolle	-	rot
GLU	D-Glukose	Positivkontrolle	gelb	rot
FRU	D-Fruktose	Säurebildung*	gelb	rot
MNE	D-Mannose	Säurebildung*	gelb	rot
MAL	D-Maltose	Säurebildung*	gelb	rot
LAC	D-Laktose	Säurebildung*	gelb	rot
TRE	D-Trehalose	Säurebildung*	gelb	rot
MAN	D-Mannit	Säurebildung*	gelb	rot
XLT	Xylit	Säurebildung*	gelb	rot
MEL	D-Melbiose	Säurebildung*	gelb	rot
NIT	Kaliumnitrat	Nitratreduktion zu Nitrit	NIT1 + NIT2 10min rot	NIT1 + NIT2 10min farblos-hellrosa
PAL	$\beta$ - Naphthylphosphat	Alkalische Phosphatase	ZYM A+ZYM B 10min violett	ZYM A+ZYM B 10min gelb
VP	Natriumpyruvat	Acetylmethylcarbin (Voges-Proskauer-Reaktion)	VP1 + VP2 10min violett-rosa	VP1 + VP2 10min farblos-hellrosa
RAF	D-Raffinose	Säurebildung*	gelb	rot
XYL	D-Xylose	Säurebildung*	gelb	rot
SAC	D-Saccharose	Säurebildung*	gelb	rot
MDG	Methyl- $\alpha$ D- Glukopyranosid	Säurebildung*	gelb	rot
NAG	N-Acetyl- Glukosamin	Säurebildung*	gelb	rot
ADH	L-Arginin	Arginin-Dihydrolase	orange-rot	gelb
URE	Harnstoff	Urease	rot-violett	gelb

Tabelle 3: API®-Staph-Test-Farbtabelle

#### 2.5.6.4.3 Molekulargenetischer Nachweis

Durch Identifikation spezifischer DNA-Sequenzen können einzelne Stämme einer Spezies zuverlässig voneinander unterschieden werden. Hierzu muß zunächst bekannt sein, welche spezifischen DNA-Sequenzen der nachzuweisende Keim grundsätzlich besitzt. Dies ist Voraussetzung für die Auswahl eines oder mehrerer geeigneter, sog. selten schneidender Restriktionsenzyme, die die für den Keim spezifischen Nukleotidsequenzen erkennen.

In der Polymerase-Ketten(Chain)-Reaktion (PCR) werden die Doppelstränge der DNA durch Erwärmung getrennt und mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen die erregerspezifischen Nukleotidsequenzen erkannt. Zugegebene genspezifische Primer hybridisieren mit unspezifischen Genabschnitten vor und hinter den spezifischen DNA-Sequenzen der Einzelstränge. Die spezifischen Abschnitte werden daraufhin von DNA-Polymerasen kopiert und komplementäre Einzelstränge hergestellt, die zusammen mit den kopierten Einzelsträngen wieder DNA-Doppelstränge bilden. Diese DNA-Doppelstrang-Fragmente werden durch erneute Erwärmung und weitere Zugabe von Restriktionsendonukleasen wieder getrennt und die Reaktion von vorne begonnen. Dadurch wird jede gewünschte spezifische DNA-Sequenz massenhaft vervielfältigt (Amplifikation) [Kayser et al. 2005; Petti et al. 2005].

Bei der molekulargenetischen Untersuchung auf Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) sind neben der 16s-rDNA-Sequenz die Genabschnitte *mecA*, *femB* und *coa* von besonderem Interesse, weil sie zusammen eine eindeutige und zuverlässige Identifizierung von MRSA erlauben. Prinzipiell müssen bei einem MRSA alle 3 Sequenzen nachweisbar sein, auch wenn meist nur ein Screening auf *mecA* und *femB* oder *mecA* und *coa* durchgeführt wird [Domann et al. 2000; Levi et al. 2003].

Beim Nachweis der 16s-rDNA handelt es sich um ein etabliertes Verfahren zum Nachweis erregerspezifischer ribosomaler Genomsequenzen. Einige Abschnitte der 16s-rDNA sind zwar bei allen Bakterien identisch, dazwischen liegen aber Abschnitte, die für eine Art oder Gattung spezifisch sind und deren Identifizierung erlauben [Kayser et al. 2005].

*mecA* ist ein Genabschnitt, der für das Penicillin-bindende Peptid (PBP) 2a in der bakteriellen Zellwand kodiert und bei Mutation die Resistenz eines Bakteriums gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Methicillin, Oxacillin) bedingt. Ist *mecA* nicht

nachweisbar, kann der Erreger nicht Methicillin-resistent sein, wobei das Testergebnis keinen Aufschluss über die Spezies gibt, weil *mecA* sowohl bei koagulase-positiven (MRSA) als auch bei koagulase-negativen (z.B. MRSE) Staphylokokken vorkommt [Huletsky et al. 2004; Jonas et al. 2002; Katayama et al. 2004].

*femB* ist eine *Staphylococcus-aureus*-spezifische Gensequenz, die für die Ausprägung der  $\beta$ -Laktam-Resistenz des Erregers kodiert. Der Nachweis von *femB* ist ein klares Indiz für das Vorliegen eines  $\beta$ -Laktam-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA). Gelingt der Nachweis des *femB*-Genabschnitts nicht, ist der Erreger kein *Staphylococcus aureus* und/oder nicht Methicillin-resistent [Berger-Bachi et al. 1998; Domann et al. 2000].

Die für die Staphylokoagulase kodierende Gensequenz *coa* kann nur bei koagulase-positiven Staphylokokken nachgewiesen werden und eignet sich daher für die Identifizierung von *Staphylococcus aureus* [Kayser et al. 2005; Kearns et al. 1999].

In der Praxis wurden die zu untersuchenden Bakterien über 24 Stunden bei 37°C auf Nähragar (BHI) angezüchtet. Die Extraktion des bakteriellen Genoms erfolgte durch Zentrifugation bei 12000 Umdrehungen pro Minute und Zugabe von Lysepuffer. Durch Erwärmung auf 95°C für 3 Minuten und weitere 30 Erwärmungszyklen auf 95°C für jeweils 1 Minute wurde die DNA denaturiert, d.h. in Einzelstränge zerlegt. Nachdem markierte Primer (dNTPs = Desoxytriphosphat-Primer) zugegeben worden waren, die an die unspezifischen DNA-Abschnitte der Einzelstränge binden und die Kopie der spezifischen DNA-Sequenzen durch eine DNA-Polymerase initiieren, wurde die Lösung zunächst auf ca. 50°C abgekühlt. Nach Zugabe der thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) wurde die Lösung für 1 Minute auf 72°C erwärmt, um die Zusammenlagerung der alten und neuen DNA-Einzelstränge zu beschleunigen. Um die dadurch entstandenen DNA-Doppelstrang-Sequenzen wieder zu trennen und die Polymerase-Chain-Reaktion (PCR) erneut zu starten, wurden die Lösung danach für weitere 5 Minuten bei 72°C inkubiert und anschließend Restriktionsendonukleasen zur Extraktion des Genoms zugegeben. Durch Inkubation bei 37°C für 1 Stunde, in der sich die Polymerase-Chain-Reaktion (PCR) tausendfach wiederholte, wurden die unterschiedlichen DNA-Sequenzen jeweils massenhaft vervielfältigt [Domann et al. 2000; Kayser et al. 2005; Krimmer et al. 1999].

#### **2.5.6.4.4 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)**

Um die DNA-Fragmente darstellen und den Erreger eindeutig identifizieren zu können, müssen die vervielfältigten unterschiedlichen DNA-Sequenzen aufgetrennt werden. Dazu werden sie in ein elektrisches Feld wechselnder Richtung gebracht, in dem sie sich ihrer Größe und Ladung entsprechend unterschiedlich schnell und weit fortbewegen. Das entstehende Verteilungsmuster (Banden) kann sichtbar gemacht werden (Mapping), so daß der Erreger identifiziert werden kann (genetischer Fingerprint).

Dazu wird das zu untersuchende Substanzgemisch in ein stabilisierendes Medium (Puffer), meist Agarose-Gel, gebracht, an das elektrischer Strom angelegt wird. Wenn die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Gels (Porengröße, pH-Wert, Ionisierung, Temperatur) keine Wechselwirkung auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Moleküls (Molekülgröße, pH-Wert) haben, hängt die elektrophoretische Mobilität eines Moleküls in dem Medium in erster Linie vom Ladungszustand des Moleküls ab. Sind dagegen zusätzlich die Poren des Gels nicht wesentlich größer als die wandernden Moleküle, werden größere Moleküle in ihrer Bewegung behindert. Deshalb wandern bei der Elektrophorese kleinere Moleküle grundsätzlich schneller und weiter als größere. Nachdem die Moleküle sichtbar gemacht wurden, können sie anhand ihres Verteilungsmusters eindeutig identifiziert werden [Lottspeich et al. 2008].

Bei der Pulsfeld-Gelelektrophorese handelt es sich um ein modifiziertes Typisierungsverfahren, mit dem hochmolekulare Nukleinsäuren analysiert werden können, die sich mit der konventionellen Gelelektrophorese nicht mehr auftrennen lassen. Dabei werden verschiedene Elektroden so angeordnet und abwechselnd (pulsierend) aktiviert und deaktiviert, dass ein elektrisches Feld ständig wechselnder Richtung erzeugt wird. Auf diese Weise werden auch sehr große Moleküle, die sich aufgrund ihrer Tertiärstruktur ineinander verhakt haben, voneinander gelöst und wandern der wechselnden Richtung des elektrischen Feldes folgend in einem Zickzack-Kurs durch das möglichst großporige Medium. Da DNA-Nukleotide zudem in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich viel Zeit benötigen, um bei Abschaltung des elektrischen Feldes in einen relaxierten Zustand überzugehen, bevor sie sich in der verbleibenden Zeit nach dem neuen elektrischen Feld ausrichten und darin bewegen können, wandern auch bei der Pulsfeld-Gelelektrophorese kleinere Moleküle schneller und weiter als größere [Lottspeich et al. 2008].

Für die erfolgreiche Auftrennung und korrekte Identifizierung der Nukleinsäure ist deren Integrität entscheidend. Deshalb müssen exogene Schädigungen der Nukleinsäuren unbedingt vermieden werden.

In der Vorbereitung der Pulsfeld-Gelelektrophorese wurden die zu untersuchenden Bakterienkulturen zunächst in 10ml BHI-Medium suspendiert und bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Um eine zu hohe Konzentration an DNA für die Laboruntersuchungen zu vermeiden, wurde die Bakteriensuspension danach 1:10 verdünnt und die optische Bakteriendichte in der verdünnten Suspension bei 600 nm im Spektralphotometer bestimmt. Anschließend wurde 1ml der Verdünnung für 10 Minuten bei 5400 Umdrehungen pro Minute (UPM) zentrifugiert, das entstehende Pellet in 1ml TEN-Puffer resuspendiert und danach erneut für 4 Minuten bei 15000 UPM zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, bevor das Pellet in 500µl EC-Puffer gebracht, mit 500µl Agarose gemischt und dieses Bakterien-Agarose-Gemisch in Blöckchen zu jeweils 100µl gegossen wurde, die zum Erkalten für 15 Minuten auf Eis gestellt wurden.

Die nachfolgende Zellyse erfolgte durch Überschichtung der Blöckchen mit Lysepuffer (844,4µl Lysepuffer, 55,6µl Lysostaphin und 100,0µl Lysozym) mit anschließender Inkubation bei 37°C für 17-24 Stunden unter leichtem Schütteln. Danach wurde der Überstand an Lysepuffer steril abpipettiert und die Blöckchen für zweimal 1 Stunde in Deproteinisierungspuffer (800µl Deproteinisierungspuffer, 100µl Proteinase K und 100µl Sarkosyl) äquilibriert. Auch hier wurde der überständige Deproteinisierungspuffer mit einer sterilen Pipette abgesaugt, bevor die Blöckchen in einem Wasserbad bei 55°C für 18 Stunden zur vollständigen Deproteinisierung inkubiert wurden. Nach einem dreimaligen Waschgang mit TE-Puffer wurden die Blöckchen zur Äquilibration einzeln für 30 Minuten in 1ml enzymfreien Restriktionspuffer gestellt, der Restriktionspuffer anschließend wieder abgesaugt, durch neuen ersetzt und 40 Einheiten (U) Restriktionsendonuklease zugegeben. Die Restriktion während der anschließenden Inkubation im Wasserbad bei 25°C wurde nach 18-22 Stunden durch Zugabe eines Inhibitionsuffers beendet.

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese selbst wurde mit dem CHEF-DR II Pulsed Field Electrophoresis System (Fa. BioRad, München, Deutschland) durchgeführt. Die vorbereiteten Blöckchen und ein PFGE-Standardmarker wurden in Taschen mit erstarrtem Agarosegel 1% gegeben, um die Blöckchen mit einer Schutzschicht zu

überziehen, die Blöckchen dann in die mit Agarosegel gefüllte Laufkammer des Geräts gelegt und die Elektrophorese gestartet ( $U = 200 \text{ V}$ ,  $I = 0,1 \text{ A}$ , Pulszeit = 5-50 s). Nach 26 Stunden wurde der Vorgang beendet. Die Blöckchen wurden entnommen, für 30 Minuten in Ethidiumbromid gefärbt, anschließend für ebenfalls 30 Minuten wieder entfärbt und die unter UV-Licht nun sichtbaren Bandenmuster in den Blöckchen fotografiert und mit einer elektronischen Datenbank abgeglichen. Dabei gelten Isolate als genetisch identisch, wenn sich die Verteilungsmuster ihrer Banden gar nicht unterscheiden, als nah verwandt, wenn sich ihre Verteilungsmuster in maximal 3 Banden unterscheidet, als möglicherweise verwandt, wenn sich ihre Verteilungsmuster in 4-6 Banden unterscheiden, und als unterschiedlich, wenn sie sich in mehr als 6 Banden unterscheiden [Tenover et al. 1995].

### **2.5.6.5 Histologische Aufarbeitung**

Um die pathologischen Vorgänge im Knochen und am Knochen-Zement-Interface zu objektivieren, wurden die jeweils anderen Kortikalishälften der entnommenen Femora in der Reihenfolge abwechselnd in Karnofsky- oder 4%iger Paraformaldehyd(PFA)-Lösung eingelegt und zur Fixierung für 4 Wochen im jeweiligen Medium belassen. Die anschließende histologische Aufarbeitung und mikroskopische Untersuchung fand im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der Universität Gießen statt.

#### **2.5.6.5.1 Trenn-Dünnschliff-Technik**

Nach Fixation erfolgte die schrittweise Entwässerung der Präparate bei gleichzeitig schrittweiser Kunststoffinfiltration im Entwässerungs- und Infiltrationsgerät EXAKT 510 (Fa. EXAKT, Norderstedt, Deutschland). Dazu wurden die Kortikalishälften für jeweils 48 Stunden in Kunststoff-Alkohol-Mischungen (Technovit<sup>®</sup> und reines Ethanol) aufsteigender Mischverhältnisse von 30:70, 50:50, 70:30 und 100:0 gestellt. Danach erfolgte für 9 Tage die Infiltration von Technovit 7200 VLC<sup>®</sup> (Fa. Heraeus-Kulzer, Wehrheim, Deutschland), einem lichthärtenden Einkomponentenkunststoff auf Methylacrylat-Basis unter Zugabe des von der Polymerisation von PMMA-Knochenzement bekannten Polymerisationsbeschleunigers Dibenzoylperoxid (BPO) 1% (Fa. Heraeus-Kulzer, Wehrheim, Deutschland). Im nächsten Schritt wurden die Präparate in Einbettmulden gegeben, darin mit Fixationskleber Technovit 7230 VLC<sup>®</sup> (Fa. Heraeus-Kulzer, Wehrheim, Deutschland) fixiert und erneut mit Technovit 7200 VLC<sup>®</sup> und BPO 1% überzogen. Die Polymerisation des Kunststoffs erfolgte durch

Lichtbestrahlung im Lichtpolymerisationsgerät Histolux (Fa. EXAKT, Norderstedt, Deutschland), wobei eine 2-stündige Vorpolymerisierung durch Gelblight zur Vermeidung von Spannungsrissen während der anschließenden 4-stündigen Polymerisation durch Blaulight stattfand. Die vollständige endgültige Polymerisation der Präparatblöcke wurde durch Inkubation in einem Wärmeschrank bei 40°C für 16 Stunden erreicht.

Danach wurden die Blöcke aus den Einbettmulden herausgenommen und jeder Block so angeschnitten, dass ein untersuchungsrelevanter Querschnitt des eingebetteten Präparats an der Oberfläche des Schnitts erschien. An dieser Schnittfläche wurde der Block in einer Vakuum-Klebpresse (Fa. EXAKT, Norderstedt, Deutschland) auf einen Glasobjektträger aufgeklebt und anschließend mit Technovit 4000<sup>®</sup>, einem schnellhärtenden, kaltpolymerisierenden 3-Komponenten-Kunststoff auf Polyester-Basis, umgossen. Mit einem Mikroschleifgerät (Fa. EXAKT, Norderstedt, Deutschland) wurde der eingegossene, an dem Glasobjektträger haftende Präparatblock nun von der anderen Seite her in Planparallelität zum Glasobjektträger soweit heruntergeschliffen, bis ein Querschnitt mit allen untersuchungsrelevanten Präparatabschnitten an der Oberfläche erschien. An diese Schnittfläche wurde in der Vakuum-Klebpresse ein zuvor mit Alkohol gereinigter und entfetteter zweiter Glasobjektträger mit Technovit 7210 VLC<sup>®</sup> Präzisionskleber (Fa. Heraeus-Kulzer, Wehrheim, Deutschland) aufgebracht. Das zwischen den beiden parallelen Glasobjektträgern fixierte Präparat wurde nun mit einem Trennschleifsystem (Fa. EXAKT, Norderstedt, Deutschland), bei dem ein mit Diamanten besetztes Trennband unter Wasserkühlung die Probe durchsägt, so geschnitten, dass eine etwa 100 µm starke Präparatscheibe auf dem zweiten Objektträger verblieb. Auf die freie Schnittfläche des Präparatrests, an dessen anderer Seite der erste Objektträger anhaftete, wurde wiederum ein neuer gereinigter und entfetteter Objektträger aufgeklebt und mit dem Trennschleifsystem eine neue Probe mit einer 100 µm starken Präparatscheibe abgeschnitten. Auf diese Weise erhielt man von jeder aufbereiteten Kortikalishälfte mehrere histologische Präparate, die im Mikroschleifgerät auf die gewünschte Stärke von 5 µm heruntergeschliffen und poliert wurden. Die zwei nach Augenschein qualitativ besten Präparate wurden jeweils für die weitere Bearbeitung ausgewählt [Donath et al. 1982].

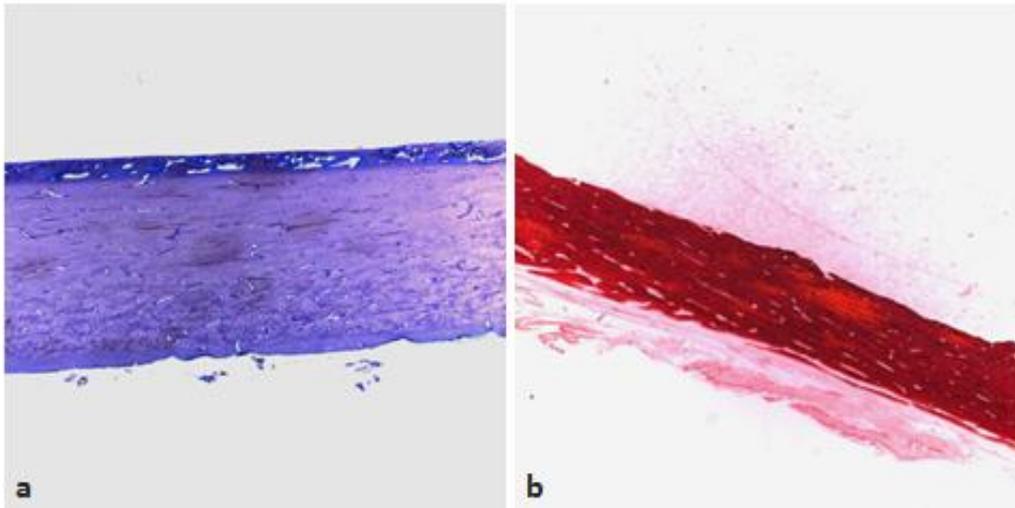
### **2.5.6.5.2 Präparate-Färbung**

Die pro Kortikalishälfte ausgewählten histologischen Präparate wurden zunächst für 10 Minuten mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10% angeätzt, um später eine intensivere

Anfärbung zu erzielen. Nach Spülung mit destilliertem Wasser (aqua dest.) wurde jeweils ein Präparat mit Toluidinblau, das andere mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, um im Falle einer Infektion zum Einen Reaktionen des Knochens und des Periosts, zum Anderen die Lokalisation und Menge der inokulierten Bakterien bestimmen zu können (Abb. 18).

Dazu wurde Toluidinblau für 15 Minuten auf den Objektträger mit dem zu färbenden Präparat aufgebracht, anschließend mit Aqua dest. abgespült, der Objektträger getrocknet und das Präparat mit einem Glasplättchen abgedeckt.

Bei der HE-Färbung wirkte zunächst Hämalaun für 5 – 10 Minuten auf das Präparat ein, bevor der Objektträger für 1 Minute in Eisessigwasser 1% geschwenkt wurde. Die Blaufärbung tritt in den folgenden 10 Minuten in Leitungswasser ein, bevor das Präparat anschließend für 1 Minute in Eosin gefärbt, der Objektträger anschließend mit Aqua dest. gespült, danach getrocknet und auch dieses Präparat mit einem Glasplättchen abgedeckt wird.



*Abbildung 18: Toluidinblau- (a) und HE-Färbung (b) eines Knochenpräparats*

### **2.5.6.5.3 Kriterien der histologischen Beurteilung**

Der histologische Nachweis einer bakteriellen Infektion galt als erbracht, wenn in der Toluidin-Färbung Abszesse oder Sequester kortikaler Knochenstrukturen oder des Markraums, ein Verlust der lamellären Knochenschichtung mit subperiostaler Knochenneubildung und Periostabhebung oder Nekrosen mit leeren

Osteozytenlakunen zu sehen waren, in der HE-Färbung bei der Identifizierung von Bakterien und von Zellen des Immunsystems wie neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und mehrkernigen Riesenzellen.

### **2.5.6.6 Statistische Auswertung**

Alle erhobenen Daten und Befunde wurden protokolliert, später in EXCEL-Tabellen übertragen und schließlich mit SPSS 12.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) ausgewertet. Die Ergebnisse daraus wurden in eine Vierfelder-Kontingenztafel (MRSA  $10^7$  / MRSA  $10^8$ , MikroSilber-PMMA 1% / Gentamicin-PMMA 2,5%) übertragen unter der Hypothese, dass die inokulierte MRSA-Konzentration und die Art des verwendeten Knochenzements hinsichtlich des Auftretens einer Infektion stochastisch unabhängig voneinander sind. Der Nachweis, dass die Ergebnisse bzw. Zahlen der Vierfelder-Kontingenztafel sich gegenseitig nicht beeinflussen, sondern stochastisch unabhängig voneinander sind und die Hypothese damit richtig ist, ist Bedingung für die Validität einer Studie.

Da bei nur 20 Versuchstieren nicht in allen vier Feldern eine Anzahl von mindestens 5 Tieren zu verzeichnen war, was als Voraussetzung für die Anwendung des konventionellen Chi-Quadrat( $\chi^2$ )-Vierfelder-Tests gilt, wurde die Berechnung mit dem Fisher's Exact Test, einem modifizierten Chi-Quadrat-Test für kleine Zahlen auf Kontingenztafeln, durchgeführt [Schumacher et al. 2002]. Als Signifikanz-Niveau wurde  $p=0,05$  festgelegt.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Pilotstudie**

In der dem Hauptversuch vorausgehenden Testreihe, bei der PMMA-Knochenzement ohne Zusatz antibiotisch wirksamer Substanzen und Keimdosen von  $10^4$  bis  $10^7$  MRSA EDCC 5246 bei jeweils 2 Kaninchen appliziert wurden, um die Dosis zu bestimmen, die bei möglichst jedem Versuchstier zu einer Infektion führt, zeigten 4 der 8 Tiere eindeutige Zeichen einer manifesten Infektion (Tab. 4).

##### **3.1.1 Klinischer Befund**

Neben Rötung, Schwellung und Überwärmung im Operationsgebiet wies eines der Kaninchen, die  $10^7$  MRSA EDCC 5246 inokuliert bekommen hatten, zusätzlich putride Sekretion aus der Operationswunde auf. Während alle 4 Tiere, die keine klinischen Infektzeichen boten, im Beobachtungszeitraum an Gewicht zunahmen und das Kaninchen, das bei einer Keimdosis von  $10^5$  klinische Infektzeichen aufwies, ein konstantes Körpergewicht zeigte, nahmen die anderen 3 Kaninchen, insbesondere die mit der Inokulationsdosis  $10^7$  MRSA EDCC 5246 deutlich an Gewicht ab und wurden als infiziert eingestuft.

##### **3.1.2 Röntgenverlaufskontrolle**

Sowohl die beiden Tiere, die  $10^7$  MRSA EDCC 5246 inokuliert bekommen hatten, als auch die Tiere, die  $10^5$  bzw.  $10^6$  MRSA EDCC 5246 erhalten und klinisch eine Infektion entwickelt hatten, wiesen in der radiologischen Verlaufskontrolle unmittelbar nach der Tötung Osteolysen, Kortikalisverdickungen und Periostauftreibungen als Zeichen einer Infektion auf und wurden entsprechend klassifiziert. Die beiden Kaninchen, denen  $10^4$  MRSA EDCC 5246 appliziert worden war, und die Tiere, die  $10^5$  bzw.  $10^6$  MRSA EDCC 5246 erhalten und klinisch keine Infektion entwickelt hatten, boten auch radiologisch keine Hinweise auf eine Infektion (Tab. 4).

## Ergebnisse

Tier	MRSA	Zement	klinisch	radiologisch	mikrobiologisch	histopathologisch
6	10 <sup>4</sup>	Plain PMMA	Gewichtszunahme	-	-	Normale Knochenstruktur, einzelne Immunozyten
4	10 <sup>4</sup>	Plain PMMA	Gewichtszunahme	-	-	Normale Knochenstruktur, einzelne Immunozyten
3	10 <sup>5</sup>	Plain PMMA	Gewichtszunahme	-	-	Kleine Markraumsequester, normale Knochen-schichtung, vereinzelt Bakterien und Immunozyten
7	10 <sup>5</sup>	Plain PMMA	Gewicht konstant, Rötung, Schwellung, Überwärmung	Osteolyse distal, Kortikalisverdickung	Keimwachstum	Minimaler Abszess, Kortikalisauftreibung, Periostreaktion, vereinzelt Bakterien, reichlich Immunozyten
1	10 <sup>6</sup>	Plain PMMA	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung, Wunddehiszenz	Osteolyse distal, Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Abszess, Sequester, Kortikalisauftreibung, Periostreaktion, reichlich Bakterien und Immunozyten
8	10 <sup>6</sup>	Plain PMMA	Gewichtszunahme	-	-	Minimaler Abszess, Markraumsequester, normale Knochen-schichtung, vereinzelt Immunozyten
2	10 <sup>7</sup>	Plain PMMA	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung	Osteolyse distal, Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Abszess, Sequester, Kortikalisauftreibung, Knochenneubildung, Periostreaktion, mass. Bakt. u. Immunozyten
5	10 <sup>7</sup>	Plain PMMA	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung, Wunddehiszenz, putride Sekretion	Osteolysen distal und proximal, Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Abszess, Sequester, Kortikalisauftreibung, Knochenneubildung, Periostreaktion, mass. Bakt. u. Immunozyten

*Tabelle 4: Ergebnisse der Pilotstudie*

### **3.1.3 Mikrobiologische Auswertung**

Bei den 4 Tieren, die klinisch und radiologisch Zeichen einer Infektion aufgewiesen hatten, zeigte sich auf den Nähragarplatten Wachstum von *S.-aureus*-Kolonien als Nachweis einer manifesten Infektion. Bei den Tieren hingegen, die klinisch und radiologisch keinen Anhalt für eine Infektion geboten hatten, zeigte sich auch kein Bakterienwachstum auf den Nähragarplatten.

In den biochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen (Latex-Agglutinationstest, API<sup>®</sup>-Staph-Test, PCR und Pulsfeldgelelektrophorese) zur Identifikation der auf den Nähragarplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurde in allen Fällen bestätigt, dass es sich um den inokulierten MRSA-Stamm EDCC 5246 handelte. Die betroffenen Tiere galten dementsprechend als infiziert.

### **3.1.4 Histologische Auswertung**

Bei allen 4 Tieren, bei denen sich bereits klinisch, radiologisch und mikrobiologisch eindeutige Infektionszeichen fanden, waren in der Toluidinblau-Färbung Abszesse, Kortikalissequester, subperiostale Knochenneubildung, Periostabhebungen oder Nekrosen sowie in der HE-Färbung Bakterien und Immunozyten nachweisbar. Der histopathologische Befund der Tiere ohne klinische, radiologische und mikrobiologische Infektzeichen war dagegen blande.

Da erst die Inokulationsdosis von  $10^7$  MRSA EDCC 5246 bei beiden Tieren, die diese Dosis erhalten hatten, zum Auftreten einer manifesten Infektion führte (Tab. 5), wurden für die Hauptstudie Keimdosens von  $10^7$  und  $10^8$  MRSA EDCC 5246 verwendet.

## Ergebnisse

Inokulierter Keim	Art des Knochenzements	Inokulationsdosis	Anzahl Tiere mit Infektion
MRSA EDCC 5246	Plain PMMA	$10^4$	0/2
		$10^5$	1/2
		$10^6$	1/2
		$10^7$	2/2

*Tabelle 5: Anzahl infizierter Tiere in der Pilotstudie*

### 3.2 Hauptstudie

Die für die Hauptstudie zur Verfügung stehenden 20 Kaninchen waren randomisiert in 2 Gruppen zu jeweils 10 Tieren eingeteilt worden, von denen entsprechend dem Ergebnis der Pilotstudie die eine Gruppe die Keimdosis von  $10^7$ , die andere Gruppe die Keimdosis von  $10^8$  MRSA EDCC 5246 inokuliert bekommen hatte. Aus jeder Gruppe war jeweils 5 Kaninchen als Knochenzement Gentamicin-PMMA 2,5%, den anderen 5 Kaninchen MikroSilber 1% appliziert worden.

#### 3.2.1 Klinischer Befund

Alle Kaninchen aus der Gentamicin-2,5%-Gruppe zeigten schwere, teilweise präseptische Krankheitsverläufe. Bei 2 Tieren, die Gentamicin-PMMA 2,5% und  $10^8$  MRSA EDCC 5246 erhalten hatten, wurde deshalb im postoperativen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen mehrfach die vorzeitige Tötung erwogen. Sie wiesen nicht nur massive lokale Infektzeichen in Form von Rötung, Schwellung, Überwärmung und Dehiszenz der Wundränder mit putriden Sekretion, sondern auch Fieber, starken Gewichtsverlust und Apathie als Zeichen einer schweren systemischen Infektion auf (Tab. 6).

## Ergebnisse

Tier	MRSA	Zement	klinisch	radiologisch	mikrobiologisch	histopathologisch
1	10 <sup>8</sup>	Silber	Gewichtszunahme	-	-	Normale Knochenstruktur, vereinzelt Immunozyten
2	10 <sup>7</sup>	Silber	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung	Osteolyse prox., Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Markraumsequester, Kortikalisauftreibung, Periostreaktion, reichlich Bakterien und Immunozyten
3	10 <sup>7</sup>	Gentamicin	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung, Wunddehiszenz, putride Sekretion	Osteolysen prox. und distal, Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Markraumsequester, Kortikalisauftreibung, Periostreaktion, Knochenneubildung, mass. Bakt./Immunozyt.
4	10 <sup>8</sup>	Gentamicin	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Wunddehiszenz, putride Sekretion, schwer erkrankt	Osteolysen prox. und distal, Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Markraumabszess, Kortikalisauftreibung, Knochenneubildung, Periostreaktion, mass. Bakt./Immunozyt.
5	10 <sup>8</sup>	Gentamicin	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung, Wunddehiszenz, putride Sekretion	Osteolyse prox., Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Minimaler Abszess, Kortikalisauftreibung, Knochenneubildung, Periostreaktion, mass. Bakt./Immunozyt.
6	10 <sup>8</sup>	Gentamicin	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Wunddehiszenz, putride Sekretion, schwer erkrankt	Osteolysen prox. und distal, Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Abszess, Sequester, Kortikalisauftreibung, Knochenneubildung, Periostreaktion, mass. Bakt./Immunozyt.
7	10 <sup>7</sup>	Gentamicin	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung, Wunddehiszenz	Osteolysen prox. und distal, Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Markraumsequester, Kortikalisauftreibung, Knochenneubildung, reichlich Bakterien und Immunozyten
8	10 <sup>7</sup>	Silber	Gewichtszunahme	-	-	Normale Knochenstruktur
9	10 <sup>7</sup>	Silber	Gewichtszunahme	-	-	Normale Knochenstruktur, vereinzelt Immunozyten
10	10 <sup>7</sup>	Gentamicin	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung	Osteolyse prox., Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Markraumsequester, Kortikalisauftreibung, Periostreaktion, reichlich Bakterien und Immunozyten

## Ergebnisse

Tier	MRSA	Zement	klinisch	radiologisch	mikrobiologisch	histopathologisch
11	10 <sup>7</sup>	Silber	Gewichtszunahme	-	-	Normale Knochenstruktur
12	10 <sup>8</sup>	Silber	Gewichtszunahme	-	-	Normale Knochenstruktur, einzelne Immunozyten
13	10 <sup>7</sup>	Gentamicin	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung, Wunddehiszenz, putride Sekretion	Osteolysen prox. und distal, Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Abszess, Sequester, Kortikalisauftreibung, Knochenneubildung, Periostreaktion, reichl. Bakt./Immunozyt.
14	10 <sup>8</sup>	Silber	Gewichtszunahme	-	-	Normale Knochenstruktur, vereinzelt Immunozyten
15	10 <sup>7</sup>	Gentamicin	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung	Osteolysen prox. und distal, Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Abszess, Sequester, Kortikalisauftreibung, Knochenneubildung, Periostreaktion, mass. Bakt./Immunozyt.
16	10 <sup>8</sup>	Silber	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung	Osteolyse prox., Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Minimaler Abszess, Sequester, Kortikalisauftreibung, Knochenneubildung, Periostreaktion, reichl. Bakt./Immunozyt.
17	10 <sup>8</sup>	Gentamicin	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Wunddehiszenz, putride Sekretion, schwer erkrankt	Osteolysen prox. und distal, Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Abszess, Sequester, Kortikalisauftreibung, Knochenneubildung, Periostreaktion, mass. Bakt./Immunozyt.
18	10 <sup>8</sup>	Silber	Gewichtszunahme	-	-	Normale Knochenstruktur
19	10 <sup>7</sup>	Silber	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung	Osteolyse prox., Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Markraumsequester, Kortikalisauftreibung, Periostreaktion, reichlich Bakterien und Immunozyten
20	10 <sup>8</sup>	Gentamicin	Gewichtsabnahme, Rötung, Schwellung, Überwärmung, Wunddehiszenz	Osteolysen prox. und distal, Kortikalisverdickung, Periostauftreibung	Keimwachstum	Abszess, Sequester, Kortikalisauftreibung, Knochenneubildung, Periostreaktion, mass. Bakt./Immunozyt.

*Tabelle 6: Ergebnisse der Hauptstudie*

Neben allen Kaninchen der Gentamicin-2,5%-Gruppe traten auch bei 2 Tieren, die MikroSilber 1% und  $10^7$  MRSA EDCC 5246 erhalten hatten, sowie bei 1 Tier, dem MikroSilber 1% und  $10^8$  MRSA EDCC 5246 appliziert worden waren, deutliche lokale und systemische Infektzeichen auf.

Von den übrigen 7 Tieren, bei denen MikroSilber 1% verwendet worden war, zeigten weder die 3, die  $10^7$  MRSA EDCC 5246, noch die 4, die  $10^8$  MRSA EDCC 5246 erhalten hatten, lokale oder systemische Zeichen einer manifesten Infektion, sondern waren lebhaft, nahmen an Gewicht zu und boten jederzeit reizlose Wundverhältnisse. Sie wurden deshalb als klinisch infektfrei eingestuft.

### 3.2.2 Röntgenverlaufskontrolle

Alle 13 Tiere, die klinische Infektzeichen aufwiesen, zeigten auch in der unmittelbar nach der Tötung durchgeführten Röntgenkontrolle des operierten Femurs eindeutige radiologische Infektzeichen in Form von Osteolysen des Femurs distal bis proximal der Zementplombe, Kortikalisverdickungen und reaktive Periostauftreibungen (Abb. 19a).

Bei den 7 Tieren aus der MikroSilber-1%-Gruppe, die keine klinischen Infektzeichen entwickelt hatten, ergab sich auch radiologisch kein Hinweis auf eine manifeste Infektion, so dass sie als infektfrei galten (Abb. 19b).



*Abbildung 19: Periostabhebung durch subperiostale Knochenneubildung am proximalen Femur über dem Knochenzement als Ausdruck einer Infektion (a). Unauffälliger Röntgenbefund ohne Infektionszeichen (b)*

### 3.2.3 Mikrobiologische Auswertung

Bei allen 13 Tieren, bei denen eindeutige klinische und radiologische Zeichen einer Infektion festgestellt wurden, zeigte sich auch Wachstum von Bakterienkolonien auf den Nähragarplatten. Dies galt sowohl für die Ausstriche der Verdünnungsstufen  $10^0$ ,  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  der jeweiligen Homogenisate aus den zermahlenden Femurhälften als auch für die Nähragarplatten mit den eingegossenen Zementplomben. In allen Fällen bestätigten die molekulargenetischen Untersuchungen, dass es sich bei den auf und in den Nähragarplatten gewachsenen Bakterienkolonien um den inokulierten MRSA-Stamm EDCC 5246 handelte (Abb. 20).

Für die 7 Tiere, die MikroSilber 1% appliziert bekommen und weder klinische noch radiologische Infektionszeichen entwickelt hatten, war weder auf den Nähragarplatten der ausgestrichenen Verdünnungsstufen der Homogenisate noch in den Nähragarplatten mit den eingegossenen Zementplomben ein Keimwachstum nachweisbar. Sie wurden als mikrobiologisch infektfrei klassifiziert.

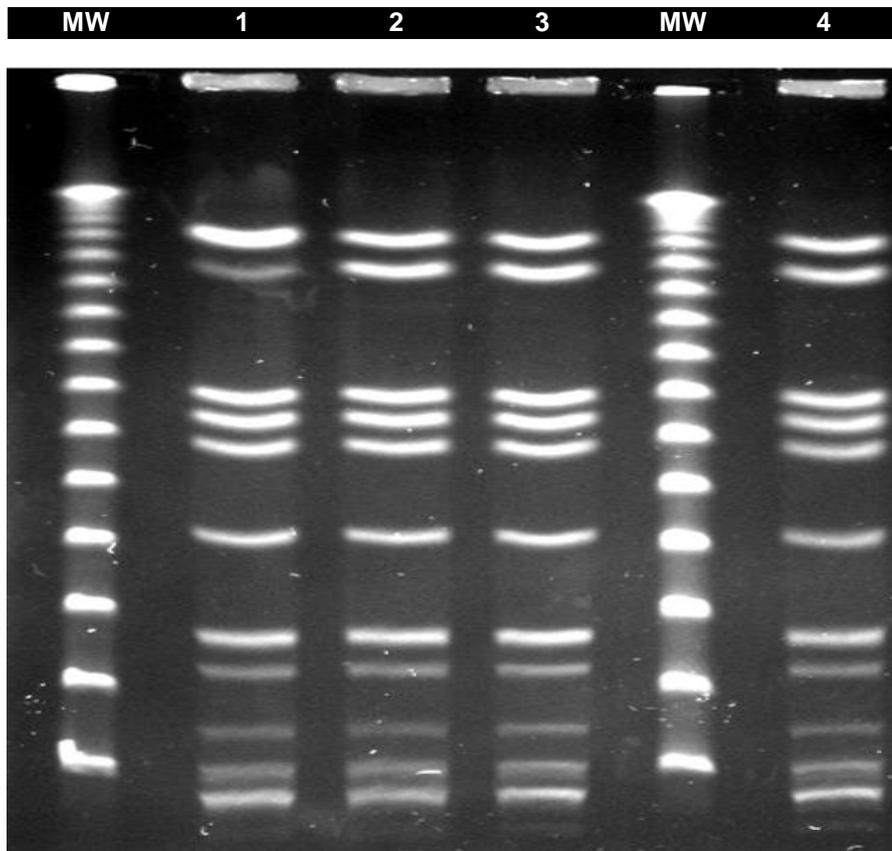
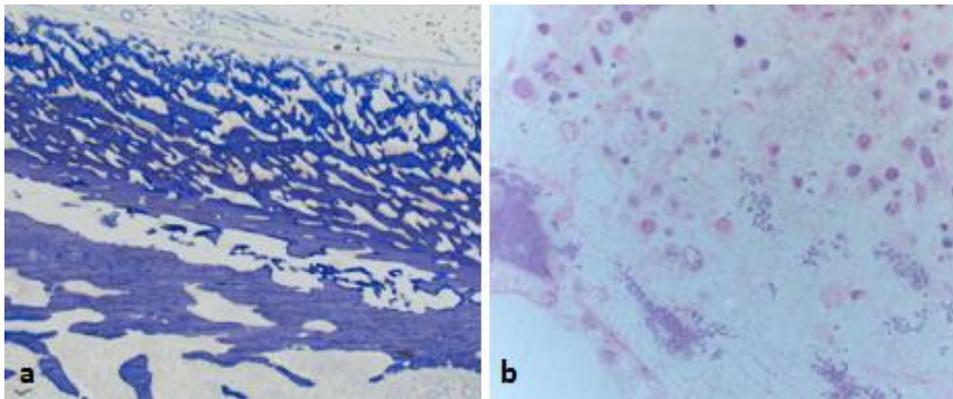


Abbildung 20: Darstellung des Ergebnisses der Pulsfeldgelelektrophorese:  
 (MW) Molecular Weight Marker (Lambda Ladder), (1) Tier Nr. 2,  
 (2) Tier Nr. 5, (3) Tier Nr. 13, (4) MRSA EDCC 5246

### 3.2.4 Histologische Auswertung

Die zur Objektivierung morphologischer Veränderungen in den Kaninchenfemora angefertigten histologischen Schnittpräparate zeigten bei allen Tieren, die Gentamicin-PMMA 2,5% erhalten hatten, und bei den 3 Kaninchen aus der MikroSilber-1%-Gruppe, die klinische, radiologische und mikrobiologische Infektzeichen aufgewiesen hatten, deutliche Entzündungsreaktionen. Neben Osteolysen, die distal der Zementplombe stärker ausgeprägt waren als proximal, Markraumsequestern, Markraumnekrosen und Abszessformationen mit Nachweis von teilweise massenhaft Bakterien und neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und mehrkernigen Riesenzellen imponierten insbesondere der Verlust der lamellären Kortikalisschichtung und die zu beobachtenden Stadien der subperiostalen Knochenneubildung (Abb. 21).



*Abbildung 21: Verlust der lamellären Kortikalisschichtung, Sequesterbildung und subperiostale Knochenneubildung, Toluidin-Blau-Färbung, Vergrößerung 2,5fach (a). Nachweis von Bakterien, Immunozyten und Knochenmarksnekrosen, H.E.-Färbung, Vergrößerung 100fach (b)*

In den Präparaten der 7 Tiere aus der MikroSilber-1%-Gruppe, die klinisch, radiologisch und mikrobiologisch keine Infektzeichen aufgewiesen hatten, fand sich auch histopathologisch kein Anhalt für eine manifeste Infektion, so dass diese Tiere als histologisch infektfrei eingestuft wurden.

### 3.2.5 Statistische Auswertung

Von den 20 Versuchstieren der Hauptstudie blieben 7 Tiere infektfrei. Die übrigen 13 Kaninchen wiesen klinisch, radiologisch, mikrobiologisch und histopathologisch

## Ergebnisse

Zeichen einer manifesten Infektion auf (65%). Betroffen waren alle 10 Kaninchen, die Gentamicin-PMMA 2,5% erhalten hatten (100%), und 3 von 10 Kaninchen, die MikroSilber 1% erhalten hatten (30%). Die MikroSilber-1%-Gruppe wies damit eine um 70% geringere Infektionsrate auf als die Gentamicin-2,5%-Gruppe.

Inokulierter Keim	Art des Knochenzements	Inokulationsdosis	Anzahl Tiere mit Infektion
MRSA EDCC 5246	Gentamicin-PMMA	$10^7$	5/5
		$10^8$	5/5
	MikroSilber-PMMA	$10^7$	2/5
		$10^8$	1/5

*Tabelle 7: Anzahl infizierter Tiere in der Hauptstudie*

Alle 13 Tiere, die als infiziert eingestuft wurden, boten klinisch, radiologisch, mikrobiologisch und histopathologisch jeweils eindeutige Zeichen einer Infektion. Bei allen 7 Tieren, die als infektfrei galten, waren weder klinisch, radiologisch, mikrobiologisch noch histopathologisch eindeutige Infektionszeichen festzustellen. Keines der infektfreien Tiere wies in einer dieser Kategorien Infektionszeichen auf. Die Korrelation zwischen den klinischen und radiologischen, den klinischen und mikrobiologischen, den klinischen und histopathologischen, den radiologischen und mikrobiologischen, den radiologischen und histopathologischen sowie den mikrobiologischen und histopathologischen Ergebnissen sowohl für den positiven als auch für den negativen Nachweis einer Infektion betrug also jeweils +1.

Für die Hypothese, dass bei der Verwendung von MikroSilber 1% weniger MRSA-Infektionen auftreten als bei der Verwendung von Gentamicin-PMMA 2,5%, ergab der Fisher's Exact Test für kleine Zahlen auf Kontingenztafeln eine Wahrscheinlichkeit für die gegenseitige Abhängigkeit der Werte von  $p=0,003$ . Als Signifikanz-Niveau war  $p=0,05$  festgelegt worden. Die Werte waren also hochsignifikant unabhängig voneinander und die Hypothese damit bestätigt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Infektionsprophylaxe in der Endoprothetik

Infektionen sind medizinisch und gesundheitsökonomisch als schwerwiegendes Ereignis und insbesondere in der Endoprothetik als fatale Komplikation anzusehen [Garvin et al. 1999]. Dies gilt vor allem, wenn es sich um Infektionen durch antibiotikaresistente Bakterien wie den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) handelt [Engemann et al. 2003; Gould 2006; König et al. 1999; Kopp et al. 2004]. Es liegt also sowohl im unmittelbaren Interesse von Patient und behandelndem Arzt als auch im mittelbaren Interesse der Allgemeinheit als Kostenträger des Gesundheitssystems, durch konsequente Prophylaxemaßnahmen und effektive Behandlungsregime derartige Infektionen zu verhindern bzw. erfolgreich zu behandeln.

Die Infektionsrate in der primären Endoprothetik war anfänglich zu Beginn der 1960er Jahre sehr hoch und betrug etwa 5 – 10 % [Carlsson et al. 1977; Josefsson et al. 1981; Lidgren 2001; Lidwell et al. 1984; Pavel et al. 1974]. Es wurden deshalb in der Folgezeit oral und parenteral Antibiotika verabreicht und mehrere Placebo-kontrollierte Studien durchgeführt, die belegen konnten, dass die prophylaktische Anwendung systemischer Antibiose eine deutliche Reduktion der Infektionsrate in der Endoprothetik bewirkt [Doyon et al. 1987; Hill et al. 1981; Pavel et al. 1977].

Buchholz und Engelbrecht verwandten seit 1970 im klinischen Einsatz Knochenzement mit Antibiotikazusatz und konnten in eigenen Studien zeigen, dass dies zu besseren Resultaten führt als die Verwendung antibiotikafreien Knochenzements (plain cement) [Buchholz et al. 1970; Rottger et al. 1979]. Auch andere große Studien bestätigten bereits Ende der 1970er Jahre den signifikanten Rückgang der hohen Infektionsrate in der primären Endoprothetik bei Verwendung gentamicinhaltigen Knochenzements im Vergleich zu leerem Knochenzement [Elson 1979; Thierse 1978; Wannske et al. 1979]. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, dass bei der Verwendung antibiotikahaltigen Knochenzements keine Häufung aseptischer Lockerungen auftritt [Espehaug et al. 1997; Garvin et al. 1988; Josefsson et al. 1993; McQueen et al. 1990]. Im Gegenteil treten aseptische Lockerungen nach der Verwendung von antibiotikahaltigem Knochenzement seltener auf als nach der Verwendung antibiotikafreien Knochenzements [Havelin et al. 1995]. Grund dafür könnte sein, dass die häufig gestellte Diagnose der aseptischen Lockerung wahrscheinlich weder begrifflich noch in der Kausalkette, in der sie erklärt wird, zutrifft,

weil in großen Studien sowohl die systemische als auch die lokale Verabreichung von Antibiotika die Zahl der Revisionsfälle reduzierte, bei denen kein Keimnachweis geführt werden konnte. Dementsprechend handelt es sich bei aseptischen Lockerungen vermutlich eher um geringgradige, klinisch und diagnostisch nicht fassbare Infektionen (low-grade infection), die sich im Bereich kleinster Knochen- und Weichteilnekrosen etablieren, die ihrerseits durch toxische Effekte des Knochenzements oder die Hitzeentwicklung während des Polymerisationsvorgangs verursacht werden [Engesaeter et al. 2003; Engesaeter et al. 2006; Hope et al. 1989; Mjoberg 1997].

Beim Vergleich beider Applikationsformen (systemisch oder lokal) wurde in prospektiven, randomisierten, aber nicht blinden Studien nachgewiesen, dass die alleinige Verabreichung systemischer Antibiose wesentlich stärker als die alleinige Verwendung antibiotikahaltigen Knochenzements die Rate subkutaner epifaszialer Infektionen reduziert, da bei der Anwendung antibiotikahaltigen Knochenzements allenfalls geringfügige Mengen Antibiotika in oberflächliche Weichteilschichten vordringen [Josefsson et al. 1981; Josefsson et al. 1990; Josefsson et al. 1993; McQueen et al. 1990]. Antibiotikahaltiger Knochenzement dagegen zeigte im Vergleich zu systemischer Antibiose einen besseren prophylaktischen Effekt gegen tiefe Protheseninfektionen [Josefsson et al. 1981; Josefsson et al. 1993]. Umgekehrt wurde retrospektiv bei Infektionen, die trotz Prophylaxe auftraten, beobachtet, dass bei oberflächlichen Infektionen überwiegend nur antibiotikahaltiger Knochenzement, bei tiefen Protheseninfektionen hingegen oft nur systemische Antibiose appliziert worden war [Josefsson et al. 1990]. Dass die meisten Infektionen in der Endoprothetik innerhalb der ersten 6 Monate postoperativ klinisch apparent werden, ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass Infektionen hauptsächlich durch Keimeintritt in den Operationssitus induziert werden und der Kampf zwischen dem Immunsystem unterstützt durch Antibiotika einerseits und dem Keim begünstigt durch Fremdkörperoberflächen und lokale Nekrosen andererseits bereits kurz nach dem Eingriff entschieden wird [Josefsson et al. 1981; Lynch et al. 1987]. Sind Nekrosen erst einmal resorbiert und liegt an der Fremdkörperoberfläche langstreckig vitales Gewebe an, sind kaum noch geeignete Voraussetzungen für die Neuentstehung und Ausbreitung einer Infektion gegeben, selbst wenn kein antimikrobiell wirksamer Antibiotika-Spiegel aus systemischer oder lokaler Antibiotika-Applikation mehr vorliegt [Engesaeter et al. 2006]. Die These, dass die Infektinduktion vorwiegend perioperativ stattfindet, wird auch von Untersuchungen zum Einfluss der Operationszeit auf die Infektionsrate gestützt: Operationszeiten („Schnitt-Naht-Zeit“) von 51 – 70 min führten

dabei zu einer signifikant niedrigeren Infektionsrate als längere Operationszeiten [Engesaeter et al. 2006].

In Europa ist in der orthopädischen Chirurgie die Kombination aus systemischer und lokaler Antibiose Standard. Für die Endoprothetik liegen hierzu Ergebnisse zahlreicher Studien vor, die eindeutig belegen, dass die gleichzeitige Anwendung systemischer Antibiose und antibiotikahaltigen Knochenzements den bestmöglichen Benefit hinsichtlich der Reduktion der Infektionsrate bringt. In einer Studie des Norwegischen Endoprothesen-Registers, die mehr als 14000 Patienten erfasste, zeigte sich bei Patienten, die sowohl antibiotikahaltigen Knochenzement als auch systemische Antibiose erhielten, die niedrigste Komplikationsrate (Infektionen und aseptische Lockerungen), wenn die systemische Antibiose 4 Mal nur am Operationstag appliziert wurde [Chiu et al. 2002; Engesaeter et al. 2003; Lidgren 2001]. In einer weiteren Studie des Norwegischen Endoprothesen-Registers, die mehr als 22000 Patienten erfasste (Abb. 22), trat wiederum bei den Patienten, die sowohl antibiotikahaltigen Knochenzement als auch systemische Antibiose erhalten hatten, die niedrigste Komplikationsrate auf. Bei Patienten, die entweder antibiotikahaltigen Knochenzement oder systemische Antibiose allein erhielten, war die Komplikationsrate im Vergleich dazu deutlich höher, wobei systemische Antibiose eine geringfügig niedrigere Komplikationsrate aufwies als antibiotikahaltiger Knochenzement. Patienten, die weder antibiotikahaltigen Knochenzement noch systemische Antibiose erhielten, hatten regelhaft die höchste Komplikationsrate zu verzeichnen [Engesaeter et al. 2003].

Diese Ergebnisse sind ein weiteres Indiz für die perioperative Infektinduktion und zeigen, dass auch infiziertes Weichteilgewebe, das von systemischer Antibiose, nicht aber von antibiotikahaltigem Knochenzement erreicht wird, die Entstehung von Endoprotheseninfektionen begünstigt [Clarke et al. 2004; Davis et al. 1999; Engesaeter et al. 2006; Josefsson et al. 1993; Maathuis et al. 2005].

## Diskussion

Antibiotic prophylaxis regime	THAs	Revisions	10 year-revision <sup>a</sup>	RR <sup>a</sup>	95% CI	P-value
All reasons for revision as endpoint	22,170	696				
Systemic+cement	15,676	391	4.6%	1	–	–
Systemic only	5,960	274	6.0%	1.4	1.1–1.7	0.001
Cement only	254	15	6.1%	1.3	0.8–2.3	0.3
No antibiotic	280	16	7.3%	1.7	1.0–3.1	0.07
Aseptic loosening as endpoint	22,170	440				
Systemic+cement	15,676	245	3.1%	1	–	–
Systemic only	5,960	172	3.8%	1.3	1.0–1.7	0.02
Cement only	254	11	4.5%	1.4	0.8–2.6	0.3
No antibiotic	280	12	4.5%	1.7	0.8–3.3	0.1
Infection as endpoint	22,170	102				
Systemic+cement	15,676	50	0.4%	1	–	–
Systemic only	5,960	46	0.7%	1.8	1.1–3.0	0.01
Cement only	254	3	1.2%	2.7	0.8–8.7	0.1
No antibiotic	280	3	2.0%	4.9	1.2–20.2	0.03

<sup>a</sup> Adjusted in the Cox model for gender, age, cement- and prosthesis-brand, type of operating room and duration of operation. The number of THAs included in the Cox analyses was reduced to 21,717 because of cases with missing values in covariates.

*Abbildung 22: Komplikationsrate in der Hüftendoprothetik in Abhängigkeit von der Art der Antibiotika-Prophylaxe. Aus: Engesaeter et al. 2003*

Während sich die Gabe systemischer Antibiose in der Endoprothetik und der Chirurgie etabliert hat und inzwischen zumindest der therapeutische Nutzen antibiotikahaltigen Knochenzements in der Revisionsendoprothetik zur Sanierung eines bereits bestehenden Infekts weltweit anerkannt ist, wird der prophylaktische Wert antibiotikahaltigen Knochenzements in der primären Endoprothetik teilweise immer noch kontrovers diskutiert [Doyon et al. 1989; Espehaug et al. 1997; Kaiser 1986; Norden 1985; Oishi et al. 1993; Strachan 1995; van de Belt et al. 2001].

Als vorrangiges Argument wird von Kritikern bemängelt, dass keine randomisierten, doppelblinden Studien vorliegen, die den Nachweis des prophylaktischen Nutzens von antibiotikahaltigem Knochenzement erbracht haben [Jiranek et al. 2006]. Solche Studien beim Menschen und mit ausreichend großen Patientenzahlen in der Zukunft noch nachzuholen, dürfte logistisch schwierig und angesichts der deutlichen Hinweise auf den Nutzen antibiotikahaltigen Zements ethisch kaum zu vertreten sein.

Des Weiteren führen Skeptiker einzelne experimentelle Untersuchungen an, die zu dem Ergebnis kamen, dass die Beimischung von Antibiotika den Knochenzement biomechanisch schwäche, wohingegen die meisten anderen Studien lediglich zu vernachlässigende oder gar keine Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften von Knochenzement durch den Zusatz von Antibiotika fanden [Buchholz et al. 1970;

Josefsson et al. 1981; Lautenschlager et al. 1976; Lee et al. 1978; Marks et al. 1976; Weinstein et al. 1976]. Dies gilt vor allem für die heute gängige Standardbeimischung von 2g Antibiotikum auf 40g PMMA-Knochenzement [Josefsson et al. 1981; Lee et al. 1978; Weinstein et al. 1976].

Der dritte Hauptkritikpunkt ist die Wirkstofffreisetzung aus Knochenzement [Henry et al. 1995]. Obwohl *in vitro* nachgewiesen werden konnte, dass Gentamicin über Jahre in messbaren Mengen aus Knochenzement freigesetzt wird, kommt es im Verlauf bereits innerhalb der ersten 6 Monate zu einem so starken Abfall der freigesetzten Antibiotikamenge, dass der initial hohe antibiotisch wirksame Spiegel nicht aufrechterhalten werden kann [Torholm et al. 1983; Wahlig et al. 1978; Wahlig et al. 1980]. Bereits nach 2 Jahren ist der Nutzen von Gentamicin-Knochenzement gegen tiefe Protheseninfektionen sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch der Verabreichung systemischer Antibiose nur noch ebenbürtig, nach 5 Jahren lässt sich mit der weiter abnehmenden Antibiotika-Freisetzung nicht einmal mehr ein Vorteil gegenüber antibiotikafreiem Knochenzement feststellen [Buchholz et al. 1984; Espehaug et al. 1997; Josefsson et al. 1990; Lynch et al. 1987].

Es bleibt festzuhalten, dass eine Infektionsprophylaxe in der Endoprothetik sinnvoll und notwendig ist. In diesem Zusammenhang hat sich eine Kombination aus systemischer und lokaler Antibiose bewährt und als den einzelnen Komponenten allein jeweils überlegen gezeigt. Problematisch ist aber nicht nur, dass es keine randomisierten Doppelblindstudien gibt und die Wirkstofffreisetzung aus Knochenzement innerhalb kurzer Zeit rapide sinkt, sondern auch, dass nicht alle Antibiotika für die Beimischung zu Knochenzement geeignet sind, weil viele durch die Hitzeentwicklung während des Polymerisationsvorgangs zerstört werden [Anguita-Alonso et al. 2006; Balint et al. 2006; van de Belt et al. 2000]. Darüber hinaus führt sowohl die systemische als auch die lokale Verabreichung von Antibiotika im Laufe der Zeit unweigerlich zu einer Selektion resistenter Bakterienstämme, selbst wenn Antibiotika sachgemäß angewandt werden [Bertazzoni Minelli et al. 2002; Livermore 2000; Thomes et al. 2002].

Ein neues lokales Agens in der Endoprothetik muss deshalb hitzebeständig sein und langfristig antibiotisch gegen ein breites Erregerspektrum einschließlich multiresistenter Bakterien wirken, darf dabei aber die biomechanischen Eigenschaften des Knochenzements nicht beeinträchtigen und weder zu lokalen noch systemischen unerwünschten Nebenwirkungen führen.

## 4.2 Konzipierung von Silberknochenzement

Aufgrund des komplexen Wirkmechanismus von Silber auf Zellen und der bereits bei der Darstellung der in der Endoprothetik verwendeten Metalle beschriebenen systemischen Nebenwirkungen durch Metallionen sind auch für den klinischen Einsatz von Silber eine differenzierte Betrachtungsweise und ein sorgfältig durchdachtes Konzept notwendig.

Silber ist hochtoxisch, so dass es in der Medizin so angewendet werden muss, dass gewünschte Effekte eintreten, unerwünschte dagegen möglichst vermieden werden („Therapeutisches Fenster“). Die unerwünschte Wirkung von Silber auf Zellen und Zellsysteme muss deshalb als Zytotoxizität definiert und auf einer Ebene mit der antimikrobiellen Wirksamkeit als erwünschter Wirkung auf pathogene Keime gesehen werden. Dadurch wird verständlich, dass die aktuelle Literatur zum Einsatz und der Wirkung von Silber entweder über eine hohe antimikrobielle Wirksamkeit mit entsprechend hohen zytotoxischen Nebenwirkungen oder eine geringe antimikrobielle Wirksamkeit ohne Auftreten zytotoxischer Effekte berichtet. Um eine möglichst hohe antimikrobielle Wirksamkeit bei möglichst geringen zytotoxischen Nebenwirkungen zu erzielen, muss die Wirkung von Silber so konzipiert werden, dass sie auf das jeweilige Implantat bzw. Fremdmaterial beschränkt bleibt, um dieses antimikrobiell abzuschirmen, Silber dabei aber nicht in anliegendes Weichteilgewebe vordringt und dort Nekrosen verursacht.

Ziel der vorliegenden *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien war es einen PMMA-Knochenzement mit Silberzusatz zu entwickeln und zu testen, der zuverlässig jede Art von bakteriellem Wachstum auf dem Knochenzement unterdrückt, dabei aber möglichst geringe, bestenfalls keine zytotoxischen Effekte in anliegendem körpereigenen Gewebe verursacht. Hierfür müssen konsequent die drei wesentlichen Einflussgrößen Partikelgröße, elektrische Ladung und Konzentration berücksichtigt werden.

Die um das Hundertfache geringere Größe von MikroSilber-Partikeln ermöglicht eine wesentlich feinere Verteilung des Silbers im Knochenzement als bei herkömmlichen Silberpartikeln. Außerdem kommt es zu einer deutlichen Vergrößerung der aktiven Oberfläche, so dass bei MikroSilber insgesamt wesentlich weniger Silber als bei der Verwendung herkömmlicher Silberpartikel benötigt wird, um eine bestimmte Fläche oder ein Volumen abzudecken (Abb. 23).

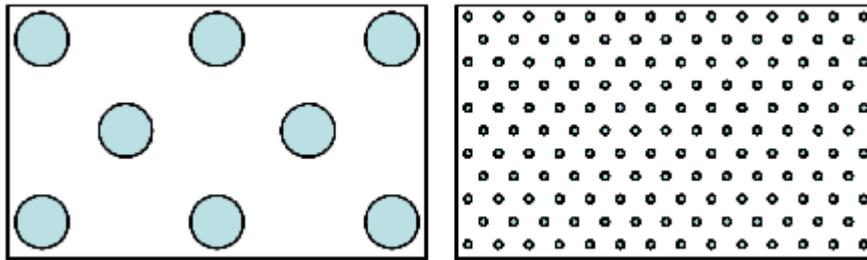


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Verteilung von herkömmlichen ionischen Silberpartikeln (links) und von MikroSilber (rechts) in Knochenzement im Vergleich

MikroSilber liegt in elementaren, d. h. elektrisch ungeladenen Primärpartikeln vor, was zu einem stabileren chemischen Gleichgewicht ( $\text{Ag} \leftrightarrow \text{Ag}^+ + \text{e}^-$ ) und dadurch zu einer sehr viel langsameren und gleichmäßigeren Freisetzung von Silberionen führt, die das eigentlich wirksame Agens darstellen, als beim direkten Vorliegen von Silber in ionischer Form. Die erhöhte Freisetzung von Silberionen aus ionischen Silberpartikeln kann zu zytotoxischen Effekten in angrenzendem Gewebe führen. Bei der kontrollierten Freisetzung aus elementarem mikroporösen Silber bleibt die Wirkung der Silberionen auf die Zementoberfläche beschränkt, die homogen und intervallfrei abgeschirmt wird (Abb. 24).

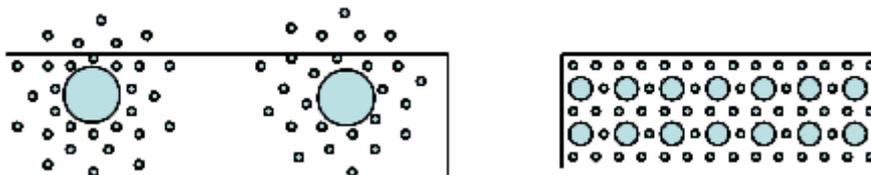


Abbildung 24: Freisetzung von Silberionen aus ionischen Silberpartikeln (links) und aus MikroSilber (rechts) in Knochenzement im Vergleich

Da sich antibakterielle Wirksamkeit und Zytotoxizität nur in der Begrifflichkeit für ein und denselben Wirkmechanismus unterscheiden, musste eine möglichst geringe, gerade ausreichende MikroSilber-Konzentration für die Beimischung zu PMMA-Knochenzement gefunden werden, bei der die Partikelgröße und das metallische Vorliegen von MikroSilber zu einer vollständigen Inhibition der bakteriellen Besiedlung und des bakteriellen Wachstums auf dem Knochenzement führen, diese Wirkung aber auf die Zementoberfläche beschränkt bleibt und zytotoxische Auswirkungen minimiert werden. Da sich die  $\text{Ag}^+$ -Ionen nach ihrer Freisetzung aus den Silberpartikeln radiär ausbreiten, sind bei der Beimischung entsprechend großer Mengen herkömmlicher

Silberionen-Partikel zur vollständigen antibakteriellen Abdeckung der Zementoberfläche zytotoxische Effekte auf angrenzendes Gewebe unvermeidbar. Wird die beigefügte Menge herkömmlichen ionischen Silbers dagegen so gering gewählt, dass keine zytotoxischen Effekte in angrenzendem Gewebe auftreten, ist die Zementoberfläche ungeschützt vor bakterieller Besiedlung.

#### **4.3 *In-vitro*-Untersuchung**

Es wurde deshalb geplant, elementares Silber in Nanometer großen Partikeln gewöhnlichem PMMA-Knochenzement beizumengen, um im Gegensatz zur Verwendung von herkömmlichem ionischen Silberpulver mit Mikrometer großen Partikeln eine gleichmäßigere, kontrollierte antibakterielle Abschirmung des Knochenzements zu erreichen und das Vordringen der Ag<sup>+</sup>-Ionen über die Zementoberfläche hinaus und damit unerwünschte zytotoxische Effekte in anliegendem Gewebe zu minimieren. Dazu wurde in der *in-vitro*-Versuchsreihe die gewichtsbezogene Konzentration von MikroSilber in antibiotikafreiem PMMA-Knochenzement in kleinsten Schritten gesteigert. Schon bei MikroSilber 0,5% konnte eine deutliche Verzögerung im Wachstum des verwendeten MRSA-Stamms EDCC 5246 beobachtet werden. Bereits MikroSilber 1% hemmte das bakterielle Wachstum in allen Testungen vollständig, so dass für die Pilotstudie und die Hauptstudie der *in-vivo*-Untersuchung MikroSilber 1% auf antibakterielle Wirksamkeit getestet wurde. MikroSilber 1% wies darüber hinaus *in vitro* keine zytotoxischen Effekte auf und kann deshalb als sehr gut biokompatibel bezeichnet werden. Allerdings muss dies *in vivo* erst noch bestätigt werden.

#### **4.4 *in-vivo*-Untersuchung**

Der Nachweis einer Knocheninfektion im Tiermodell erfordert die Entnahme des infizierten Knochens zur anschließenden Untersuchung. Deshalb mussten die Versuchstiere getötet werden. Um im Rahmen der gesetzlichen Vorgaben und des zur Verfügung stehenden Budgets dennoch möglichst viele Versuchstiere einsetzen zu können, um statistisch verwertbare Ergebnisse zu erzielen, wurde ein Kleintiermodell gewählt.

Das von Nijhof (Utrecht, Niederlande) entwickelte und mehrfach publizierte Kaninchenmodell erschien für die geplante Herbeiführung intramedullärer Knocheninfektionen am besten geeignet [Nijhof et al. 2001]. Zum Einen sind Kaninchen mit kalkulierbarem Aufwand gut zu halten und zu überwachen, zum

Anderen liefert das Kaninchenfemur ausreichend Knochensubstanz, um sowohl eine mikrobiologische als auch eine histopathologische Untersuchung durchführen und deren Ergebnisse vergleichen zu können. Dadurch wird die Anzahl falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse reduziert, d.h. die Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse erhöht. Außerdem ist der von Nijhof beschriebene Zugang zum Kaninchenfemur operationstechnisch unkompliziert und stellt bei entsprechender Beherrschung keine signifikante Einflussgröße in den Versuchsreihen dar. Entsprechende Beherrschung des Operationsverfahrens wurde während eines mehrtägigen Aufenthalts bei Nijhof erworben.

Dass die verwendeten Kaninchen allesamt untereinander verwandte Stubenkaninchen aus einem Zuchtbetrieb ohne natürliche Umweltexposition waren, lässt zumindest die theoretische Überlegung zu, dass bei den Versuchstieren immunologische Defizite, eventuell auch genetisch bedingt, vorgelegen haben könnten. Für die Ergebnisse der durchgeführten Pilot- und Hauptstudie spielt dies allerdings insofern keine Rolle, als eine ähnliche Immunkompetenz und eine geringe Exposition gegenüber anderen als dem in den Versuchen verwendeten Keim zu einer Minimierung der interindividuellen Varianz der Immunantwort auf die Keiminduktion führen und deshalb für die Aussagekraft der Studienergebnisse eher vorteilhaft sind.

Die hohe Pathogenität von *Staphylococcus aureus* und die klinische Erfahrung teilweise fataler Verläufe von *Staphylococcus-aureus*-Infektionen waren der Grund, in den vorliegenden Studien einen Methicillin-resistenten *Staphylococcus-aureus*-Stamm (MRSA) zur Induktion der Knocheninfektion zu verwenden. Es wurde ein MRSA-Stamm (EDCC 5246) ausgewählt, der im Rahmen eines Revisionseingriffs aus einer Fußwunde beim Menschen gewonnen worden war und sich durch eine breite Antibiotika-, insbesondere hohe Gentamicin-Resistenz (MIC > 64 µg/ml) auszeichnete. Dadurch sollte bei möglichst vielen Tieren, die keinen Silberknochenzement appliziert bekommen hatten, eine Infektion hervorgerufen werden, um die etwaige Immunkompetenz eines Tieres und die Wirksamkeit von Gentamicin in Gentamicin-PMMA 2,5% als Ursachen für ein Ausbleiben einer Knocheninfektion ausschließen und damit die antibakterielle Wirksamkeit von Silberknochenzement bestimmen zu können.

Klinisch schwer zu beherrschende Infektionen werden auch durch andere Keime als den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) hervorgerufen. Hierzu zählen insbesondere der Methicillin-resistente *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) und Betalaktamase(ESBL)-produzierende

Enterobacteriaceae. Ob und inwiefern Silber eine antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber solchen anderen Problemkeimen besitzt, die zum Teil sehr unterschiedliche Eigenschaften und Charakteristika aufweisen, sollte Gegenstand weiterführender Forschung auf Grundlage der vorliegenden Untersuchung sein.

In der *in-vitro*-Versuchsreihe war die Silberkonzentration schrittweise von 0,1% über 0,5% bis 1,0% soweit gesteigert worden, bis bereits bei einer gewichtsbezogenen Beimischung von 1,0% mikroporösem Silber zu Polymethylmethacrylat(PMMA)-Knochenzement kein bakterielles Wachstum mehr nachgewiesen werden konnte. Eine möglichst geringe Silberbeimischung ist dabei anzustreben, um zytotoxische Effekte zu minimieren und die biomechanischen Eigenschaften des Knochenzements, insbesondere die Festigkeit bei Verformung unter zyklisch wiederkehrender Belastung (fatigue behaviour), nicht zu verändern. Da Silber ein weiches, gut verformbares Metall ist, ist nicht auszuschließen, dass die Festigkeit von Silberknochenzement abnimmt, je größer die Silberkonzentration darin ist. Das Fatigue-Verhalten von MikroSilber-Knochenzement 1% sollte deshalb in weiterführenden Studien untersucht werden.

Für die *in-vivo*-Versuchsreihe standen Gentamicin-PMMA 2,5% und antibiotikafreier Knochenzement (Plain PMMA) als Kontrolle zur Verfügung. Gentamicin-PMMA 2,5% wurde ausgewählt, weil zum Einen in Deutschland und anderen europäischen Ländern nicht nur in der Revisions-, sondern auch in der Primärendoprothetik antibiotikahaltiger Knochenzement verwendet wird, weil dies analog den Ergebnissen des Norwegischen Endoprothesenregisters zur geringsten Komplikationsrate führt. Somit spiegelt die Verwendung von Gentamicin-PMMA 2,5% in der Hauptstudie die klinisch gängige Praxis wider. Zum Anderen bot Gentamicin-PMMA 2,5% gegenüber antibiotikafreiem Knochenzement (Plain PMMA) den Vorteil, dass durch den Gentamicin-Zusatz die Kontamination mit Gentamicin-sensiblen Umgebungskeimen peri- und postoperativ reduziert und dadurch das Wachstum des inokulierten MRSA-Stamms EDCC 5246 nicht limitiert wird.

Um die antimikrobielle Wirksamkeit von MikroSilber 1% im Vergleich zu Gentamicin 2,5% zu testen und dabei die individuelle Immunkompetenz der Tiere als Parameter auszuschalten, musste zunächst in einer Pilotstudie die Dosis MRSA EDCC 5246 bestimmt werden, die bei möglichst allen Versuchstieren zu einer klinisch manifesten Infektion führt. Dazu hätte man die zur Verfügung stehenden 8 Kaninchen in 2 Gruppen zu je 4 Tieren aufteilen und von vornherein nur hohe Keimdosen ( $10^7$  und  $10^8$ ) testen können. Um aber gerade die zur sicheren Infektinduktion notwendige Keimdosis zu

ermitteln und vorzeitige Verluste durch septische Todesfälle sowohl in der Pilotstudie als auch im Hauptversuch zu vermeiden, sollte auch hier die Keimdosis MRSA EDCC 5246 nur so lange schrittweise gesteigert werden, bis alle Tiere der Gruppe eine klinisch fassbare Infektion entwickeln. Die Kaninchen wurden deshalb in 4 Gruppen zu je 2 Tieren aufgeteilt. Dass kein Versuchstier nach Inokulation von  $10^4$  MRSA EDCC 5246 Infektzeichen aufwies, bei  $10^5$  und  $10^6$  jeweils nur 1 Tier erkrankte und erst die Keimdosis von  $10^7$  MRSA bei beiden Kaninchen zu einer klinisch manifesten Infektion führte, ist ein plausibles Ergebnis, aufgrund dessen im Hauptversuch Keimdosen von  $10^7$  und  $10^8$  MRSA EDCC 5246 verwendet wurden.

Für den Hauptversuch wurde der Einsatz von 20 Tieren genehmigt, so dass bei 10 Tieren MikroSilber 1% und als Negativkontrolle bei 10 Tieren Gentamicin-PMMA 2,5% getestet werden konnte. Im Sinne der statistischen Auswertung wäre eine größere Anzahl als 20 Tiere zwar wünschenswert gewesen, um auf der Vierfelder-Kontingenztafel in jedem Feld zumindest wenigstens 5 Tiere verzeichnen zu können und insgesamt dezidiere Ergebnisquotienten zu erhalten. Die Zahl von 20 Tieren erwies sich jedoch als ausreichend, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen.

Die operativen Eingriffe selbst verliefen komplikationslos. Während der Pilotstudie zeigte sich allerdings, dass es nach der Inokulation der Keimdosis bei der Einbringung des Knochenzements zu einem geringfügigen Austritt des Inokulats kommt, so dass das Operationsverfahren noch in der Pilotstudie dahingehend modifiziert wurde, dass zuerst eine geringe Menge Knochenzement in der Mitte des Bohrkanals im Femur als Pfropf zum Verschluss des Markraums eingebracht wurde und dann, solange der Zement noch weich war, die Keimdosis durch den Zementpfropf hindurch in die Tiefe des Bohrkanals injiziert und erst dann der Markraum vollständig auszementiert wurde. Auf diese Weise konnte gewährleistet werden, dass bei allen Tieren die vorgesehene Keimdosis vollständig appliziert wurde.

Die Kontrolle und Protokollierung der Aktivität, Futter- und Wasseraufnahme, Körpertemperatur, des Körpergewichts und der Wundverhältnisse erfolgte täglich. Die Feststellung eines schweren septischen Krankheitsverlaufs hätte zur vorzeitigen Tötung der Tiere zur Vermeidung von Schmerzen und Leiden geführt. Die Kaninchen wurden vor der tödlichen Injektion von Nembutal i.p. in Narkose versetzt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass alle Tiere vor und bei Eintritt des Todes tief bewusstlos waren und kein Todeskampf stattfand.

Die mikrobiologisch und histopathologisch aufwendige Aufarbeitung und Beurteilung der gewonnenen Proben war notwendig, um nicht nur eine Infektion an sich nachzuweisen, sondern durch Identifikation individueller DNA-Sequenzen und Darstellung des DNA-Musters in der Pulsfeld-Gelelektrophorese den inokulierten MRSA-Stamm eindeutig wiederzuerkennen und eine Infektion durch Kontamination mit anderen Keimen als dem inokulierten MRSA-Stamm auszuschließen.

### 4.5 Fazit

In der durchgeführten Pilot- und Hauptstudie zeigten sich bei allen Tieren entweder in allen oder keiner Kategorie Infektionszeichen. Es lag eine vollständige Übereinstimmung von klinischem, röntgenologischem, mikrobiologischem und histopathologischem Befund vor, so dass alle Ergebnisse als richtig positiv oder richtig negativ anzusehen sind. Die Sensitivität und die Spezifität der Versuchsreihen beträgt somit jeweils 100%.

Die überzeugende Wirksamkeit von MikroSilber 1% aus den *in-vitro*-Versuchen zeigte sich auch *in vivo* beim Kaninchen. Die Pathogenität und Gentamicin-Resistenz des inokulierten MRSA EDCC 5246 waren hoch genug, um bei jedem Tier, das Gentamicin-Knochenzement appliziert bekam, eine klinisch manifeste Infektion hervorzurufen. Dass bei 7 von 10 Tieren aus der MikroSilber-Gruppe kein Infekt nachzuweisen war, kann deshalb weder auf Zufall noch eine höhere Immunkompetenz der entsprechenden Tiere, sondern allein auf die antimikrobielle Wirksamkeit von MikroSilber 1% in PMMA-Knochenzement zurückgeführt werden. Im Unterschied zu herkömmlichem Silberpulver liegt MikroSilber 1% aufgrund der geringen Größe seiner Primärpartikel homogen verteilt in Knochenzement vor. Das metallische, ungeladene Vorliegen der MikroSilber-Partikel führt darüber hinaus zu einer wesentlich kontrollierteren Freisetzung von Silberionen als bei der Verwendung von Silbersalzen, wodurch die Oberfläche des MikroSilber-Knochenzements insgesamt gleichmäßig durch gerade so viele Silberionen antimikrobiell abgeschirmt wird, dass bakterielles Wachstum vollständig gehemmt wird, aber keine zytotoxischen Effekte in anliegendem Gewebe auftreten.

Da die Wirkung von MikroSilber in Knochenzement auf den Knochenzement beschränkt bleibt, dient MikroSilber-Knochenzement primär der Prophylaxe bakterieller Infektionen. Für die Therapie bereits manifester Infektionen kann MikroSilber-

Knochenzement nur in Kombination mit anderen Strategien (chirurgisches Debridement, lokale und systemische Antibiose) eingesetzt werden.

### 5 Schlussfolgerung

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit von elementarem, ungeladenem Silber in Form von Mikropartikeln wurde eine Versuchsreihe geplant und durchgeführt, bei der zunächst in einer *in-vitro*-Studie nachgewiesen wurde, dass eine gewichtsbezogene Beimischung von 1,0% MikroSilber ausreicht, um das Wachstum eines MRSA-Stamms mit hoher Antibiotika-Resistenz auf PMMA-Knochenzement vollständig zu inhibieren, ohne zytotoxische Effekte auf anliegende Fibroblasten zu verursachen.

In der nachfolgenden *in-vivo*-Pilotstudie zeigte sich, dass eine Keimdosis von mindestens  $10^7$  KBE desselben MRSA-Stamms notwendig ist, um bei allen eingesetzten Kaninchen eine manifeste Infektion herbeizuführen.

In der *in-vivo*-Hauptstudie schließlich führte die Applikation von MikroSilber-Knochenzement 1% zu einer um 70% geringeren Rate an Infektionen, die durch Keimdosen von  $10^7$  und  $10^8$  KBE MRSA induziert worden waren, als die Verwendung von Gentamicin-Knochenzement 2,5%. Das Ergebnis ist statistisch signifikant.

Die Planung, Vorbereitung und Durchführung der Versuchsreihen verlief komplikationslos, insbesondere der vorzeitige Verlust von Versuchstieren konnte vermieden werden. Die geringe Anzahl an Kaninchen (8 für die Pilotstudie, 20 für die Hauptstudie), die genehmigt wurde, erwies sich als ausreichend, um ein valides Ergebnis zu erzielen.

Für künftige Untersuchungen ist zu beachten, dass die Fatigue-Eigenschaften von PMMA-Knochenzement durch die Zugabe von Silber möglicherweise verändert werden und deshalb genau geprüft werden müssen. Außerdem sind analog der *in-vitro*-Studie auch *in-vivo*-Biokompatibilitätsuntersuchungen notwendig, um zytotoxische Effekte auszuschließen. Von besonderem wissenschaftlichen und klinischen Interesse ist, ob antibiotikaresistente Keime wie MRSA im Lauf der Zeit auch gegenüber Silber Resistenzen entwickeln.

## 6 Zusammenfassung

Infektionen durch antibiotikaresistente Bakterien wie den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) stellen schwerwiegende Komplikationen in der Endoprothetik dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, silberhaltigen Knochenzement auf antimikrobielle Wirksamkeit zu testen. Silber lag hierbei elementar und ungeladen in Mikropartikeln (MikroSilber) vor. Die Silberkonzentration sollte gerade ausreichen, um das Wachstum eines MRSA-Stamms mit hoher Gentamicin-Resistenz vollständig zu hemmen, zytotoxische Effekte in anliegendem Gewebe aber zu vermeiden.

*In vitro* wurde zunächst mit Hilfe eines Proliferations-Assays die Silberkonzentration bestimmt, die zur vollständigen Inhibition bakteriellen Wachstums auf PMMA-Knochenzement-Proben führte. In der folgenden *in-vivo*-Pilotstudie wurde in einem Kaninchenmodell die Keimdosis bestimmt, die bei jedem Versuchstier eine manifeste Infektion hervorrief. In der *in-vivo*-Hauptstudie wurden den Tieren eine von zwei verschiedenen MRSA-Dosen und Gentamicin- oder MikroSilber-Knochenzement appliziert. Nach 14 Tagen wurden die Tiere geopfert und anhand klinischer, radiologischer, mikrobiologischer und histopathologischer Kriterien als infiziert oder nicht infiziert eingestuft.

Es zeigte sich, dass eine Silberkonzentration von 1,0% in PMMA-Knochenzement ausreichte, um das Wachstum von MRSA *in vitro* vollständig zu hemmen. Zytotoxische Effekte in anliegenden Zellen traten nicht auf. Zur Induktion einer manifesten Infektion war eine Keimdosis von  $10^7$  KBE MRSA notwendig. Bei der Verwendung von MikroSilber-Knochenzement 1% zeigte sich eine um 70% geringere Rate an Infektionen, die durch  $10^7$  und  $10^8$  KBE MRSA induziert worden waren, als bei der Verwendung von Gentamicin-Knochenzement 2,5%. Das Ergebnis ist statistisch signifikant.

Werden die biomechanischen Eigenschaften von PMMA-Knochenzement durch die Zugabe von MikroSilber nicht beeinträchtigt, sind auch *in vivo* keine zytotoxischen Effekte in anliegendem Gewebe nachweisbar, und kommt es zu keiner bakteriellen Resistenzentwicklung gegenüber Silber, steht mit MikroSilber-Knochenzement ein neues Biomaterial für die Prophylaxe von Infektionen in der Endoprothetik zur Verfügung.

## 7 Summary

Infections caused by antibiotic resistant bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pose fatal complications in joint arthroplasty. The aim of this work was to test the antimicrobial efficacy of bone cement containing microparticles of elementary, unloaded silver (MicroSilver). The silver concentration was intended to be sufficient to inhibit completely the proliferation of a MRSA strain with high gentamicin resistance, while avoiding cytotoxic effects in adjacent tissue.

First, by means of a proliferation assay the silver concentration necessary to inhibit bacterial proliferation completely on PMMA bone cement samples was determined *in vitro*. In the consecutively performed *in vivo* pilot study, the germ dose necessary to provoke an apparent infection was assessed using a rabbit model. In the *in vivo* main study, the animals then received one of two different MRSA doses, and bone cement containing either Gentamicin or MicroSilver. After 14 days the animals were sacrificed and judged infected or non-infected on the basis of clinical, radiologic, microbiologic, and histopathologic criteria.

A silver concentration of 1.0% in PMMA bone cement appeared sufficient to inhibit MRSA proliferation completely *in vitro*. Cytotoxic effects in adjacent cells were not observed. A germ dose of  $10^7$  colony forming units (CFU) was necessary to induce an apparent infection in each animal. With the application of 1% MicroSilver bone cement the rate of infections induced by  $10^7$  and  $10^8$  CFU MRSA was reduced by 70% compared to the application of 2.5% Gentamicin bone cement. The result is statistically significant.

Unless the biomechanical properties of PMMA bone cement are impaired by the adding of MicroSilver, cytotoxic side-effects in adjacent tissue are detected *in vivo*, and bacteria develop resistance against silver, MicroSilver bone cement represents a new biomaterial available for the prophylaxis of infections in joint arthroplasty surgery.

**8 Abbildungsverzeichnis**

*Abbildung 1: Wachstum der Weltbevölkerung bis 2150 (Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung 2008)*  
..... 1

*Abbildung 2: Altersaufbau der in Deutschland lebenden Bevölkerung zwischen dem 19. und 21. Jahrhundert (Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung 2008)*..... 2

*Abbildung 3: Fortgeschrittene Coxarthrose auf der rechten Seite mit Verschmälerung des Hüftgelenkspalts, subchondraler Sklerosierung, osteophytären Randanbauten des Pfannendachs und Deformierung des Hüftkopfs* ..... 3

*Abbildung 4: Strukturformeln von Methylmethacrylat (a) und Polymethylmethacrylat (b). Aus: www.wikipedia.de*..... 14

*Abbildung 5: PMMA-Pulver wird MMA in wässriger Lösung zugegeben (a). Nach dem Anrühren (b) muss der Knochenzement zügig appliziert werden, bevor er aushärtet.* ..... 16

*Abbildung 6: Elektronenmikroskopie eines Staphylokokken-Biofilms. Aus dem Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen* ..... 21

*Abbildung 7: Girdlestone-Situation linksseitig mit Abstützung des Trochanter minor im Acetabulum und des Trochanter major am Os ilium* ..... 22

*Abbildung 8: Partikelgröße von MikroSilber (a) und herkömmlichem kommerziellen Silber (b) im Vergleich*  
..... 28

*Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Darstellung der aktiven Oberfläche und hohen Porosität von MikroSilber. Aus dem Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen* ..... 29

*Abbildung 10: Antimikrobielle Aktivität von Silberknochenzement 0,1%, 0,5% und 1,0% gegen MRSA. Aus: Alt et al. 2004* ..... 31

*Abbildung 11: Anzahl vitaler Fibroblasten im Zytotoxizitätstest. Aus: Alt et al. 2004* ..... 32

*Abbildung 12: Desinfektion des rasierten OP-Gebiets*..... 37

*Abbildung 13: Aufbohrung (a) und Auszementierung des proximalen Femurs (b) und Inokulation der MRSA-Bakterien (c)* ..... 38

*Abbildung 14: Postoperative Röntgenkontrolle*..... 39

*Abbildung 15: Kortikalishälften mit Zementplombe*..... 41

*Abbildung 16: Zermahlung des Knochenpräparats* ..... 42

*Abbildung 17: Sichtbares (a) bzw. nicht sichtbares (b) Wachstum von Bakterienkolonien auf den Nähragarplatten als Nachweis einer aufgetretenen bzw. ausgebliebenen Infektion*..... 43

*Abbildung 18: Toluidinblau- (a) und HE-Färbung (b) eines Knochenpräparats* ..... 52

*Abbildung 19: Periostabhebung durch subperiostale Knochenneubildung am proximalen Femur über dem Knochenzement als Ausdruck einer Infektion (a). Unauffälliger Röntgenbefund ohne Infektionszeichen (b)*  
..... 60

*Abbildung 20: Darstellung des Ergebnisses der Pulsfeldgelelektrophorese: (MW) Molecular Weight Marker (Lambda Ladder), (1) Tier Nr. 2, (2) Tier Nr. 5, (3) Tier Nr. 13, (4) MRSA EDCC 5246* ..... 61

## Abbildungsverzeichnis

---

<i>Abbildung 21: Verlust der lamellären Kortikalisschichtung, Sequesterbildung und subperiostale Knochenneubildung, Toluidin-Blau-Färbung, Vergrößerung 2,5fach (a). Nachweis von Bakterien, Immunozyten und Knochenmarksnekrosen, H.E.-Färbung, Vergrößerung 100fach (b) .....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 22: Komplikationsrate in der Hüftendoprothetik in Abhängigkeit von der Art der Antibiotika-Prophylaxe. Aus: Engesaeter et al. 2003 .....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 23: Schematische Darstellung der Verteilung von herkömmlichen ionischen Silberpartikeln (links) und von MikroSilber (rechts) in Knochenzement im Vergleich.....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 24: Freisetzung von Silberionen aus ionischen Silberpartikeln (links) und aus MikroSilber (rechts) in Knochenzement im Vergleich .....</i>	<i>70</i>

**9 Tabellenverzeichnis**

*Tabelle 1: Protokoll der Pilotstudie* ..... 33

*Tabelle 2: Protokoll der Hauptstudie* ..... 34

*Tabelle 3: API®-Staph-Test-Farbtabelle*..... 45

*Tabelle 4: Ergebnisse der Pilotstudie* ..... 55

*Tabelle 5: Anzahl infizierter Tiere in der Pilotstudie* ..... 57

*Tabelle 6: Ergebnisse der Hauptstudie* ..... 59

*Tabelle 7: Anzahl infizierter Tiere in der Hauptstudie*..... 63

## 10 Literaturverzeichnis

1. Alanis AJ (2005) Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* 36:697-705.
2. Albrektsson T, Johansson C (2001) Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 Suppl 2:S96-101.
3. Alt V, Bechert T, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E, Schnettler R (2004) An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 25:4383-4391.
4. Alt V, Bechert T, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E, Schnettler R (2004) In vitro testing of antimicrobial activity of bone cement. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4084-4088.
5. Alt V, Bechert T, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Scheddin D, Domann E, Schnettler R (2004) [Nanoparticulate silver. A new antimicrobial substance for bone cement]. *Orthopade* 33:885-892.
6. Amstutz HC, Le Duff MJ, Beaulé PE (2004) Prevention and treatment of dislocation after total hip replacement using large diameter balls. *Clin Orthop Relat Res* 429:108-116.
7. Anguita-Alonso P, Hanssen AD, Patel R (2005) Prosthetic joint infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 3:797-804.
8. Anguita-Alonso P, Rouse MS, Piper KE, Jacofsky DJ, Osmon DR, Patel R (2006) Comparative study of antimicrobial release kinetics from polymethylmethacrylate. *Clin Orthop Relat Res* 445:239-244.
9. Antti-Poika I, Josefsson G, Konttinen Y, Lidgren L, Santavirta S, Sanzen L (1990) Hip arthroplasty infection. Current concepts. *Acta Orthop Scand* 61:163-169.
10. Archibeck MJ, Surdam JW, Schultz SC Jr, Junick DW, White RE (2006) Cementless total hip arthroplasty in patients 50 years or younger. *J Arthroplasty* 21:476-483.
11. Austin MS, Hozack WJ, Sharkey PF, Rothman RH (2003) Stability and leg length equality in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 18:88-90.
12. Bader R, Steinhauser E, Zimmermann S, Mittelmeier W, Scholz R, Busch R (2004) Differences between the wear couples metal-on-polyethylene and ceramic-on-ceramic in the stability against dislocation of total hip replacement. *J Mater Sci Mater Med* 15:711-718.
13. Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG (2002) Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 180:5-22.

14. Balint L, Koos Z, Horvath G, Szabo G (2006) Detection of gentamicin emission from bone cement in the early postoperative period following total hip arthroplasty. *Orthopedics* 29:432-436.
15. Barceloux DG (1999) Chromium. *J Toxicol Clin Toxicol* 37:173-194.
16. Barceloux DG (1999) Molybdenum. *J Toxicol Clin Toxicol* 37:231-237.
17. Barrack RL, Burak C, Skinner HB (2004) Concerns about ceramics in THA. *Clin Orthop Relat Res* 429:73-79.
18. Barrack RL, Sawhney J, Hsu J, Cofield RH (1999) Cost analysis of revision total hip arthroplasty. A 5-year followup study. *Clin Orthop Relat Res* 369:175-178.
19. Bauer TW, Schils J (1999) The pathology of total joint arthroplasty. I. Mechanisms of implant fixation. *Skeletal Radiol* 28:423-432.
20. Beatson SA, Walker MJ (2014) Microbiology. Tracking antibiotic resistance. *Science* 345:1454-1455.
21. Bechert T, Boswald M, Lugauer S, Regenfus A, Greil J, Guggenbichler JP (1999) The Erlanger silver catheter: in vitro results for antimicrobial activity. *Infection* 27 Suppl 1:S24-29.
22. Bechert T, Steinrucke P, Guggenbichler JP (2000) A new method for screening anti-infective biomaterials. *Nat Med* 6:1053-1056.
23. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Springer Verlag Heidelberg, 6. Auflage, 2007.
24. Berger-Bachi B, Tschierske M (1998) Role of fem factors in methicillin resistance. *Drug Resist Updat* 1:325-335.
25. Bernard AA, Zrinzo LU (1999) Joint replacement. The final solution? *Adv Exp Med Biol* 455:451-461.
26. Bertazzoni Minelli E, Caveiari C, Benini A (2002) Release of antibiotics from polymethylmethacrylate cement. *J Chemother* 14:492-500.
27. Best M, Neuhauser D (2004) Ignaz Semmelweis and the birth of infection control. *Qual Saf Health Care* 13:233-234.
28. Bierma-Zeinstra SM, Koes BW (2007) Risk factors and prognostic factors of hip and knee osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3:78-85.
29. Bijlsma JW, Knahr K (2007) Strategies for the prevention and management of osteoarthritis of the hip and knee. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 21:59-76.
30. Bizot P, Nizard R, Hamadouche M, Hannouche D, Sedel L (2001) Prevention of wear and osteolysis: alumina-on-alumina bearing. *Clin Orthop Relat Res* 393:85-93.
31. Bordenave G (2003) Louis Pasteur (1822-1895). *Microbes Infect* 5:553-560.

32. Boswald M, Lugauer S, Regenfus A, Braun GG, Martus P, Geis C, Scharf J, Bechert T, Greil J, Guggenbichler JP (1999) Reduced rates of catheter-associated infection by use of a new silver-impregnated central venous catheter. *Infection* 27 Suppl 1:S56-60.
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* 87:1746-1751.
34. Bragg PD, Rainnie DJ (1974) The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 20:883-889.
35. Bratzler DW, Houck PM (2005) Antimicrobial prophylaxis for surgery: an advisory statement from the National Surgical Infection Prevention Project. *Am J Surg* 189:395-404.
36. Breusch SJ, Aldinger PR, Thomsen M, Ewerbeck V, Lukoscsek M (2000) [Anchoring principles in hip endoprostheses. I: Prosthesis stem]. *Unfallchirurg* 103:918-931.
37. Breusch SJ, Aldinger PR, Thomsen M, Lukoscsek M, Ewerbeck V (2000) [Anchoring principles in hip prosthesis implantation. II: Acetabulum components]. *Unfallchirurg* 103:1017-1031.
38. Buchholz HW, Elson RA, Heinert K (1984) Antibiotic-loaded acrylic cement: current concepts. *Clin Orthop Relat Res* 190:96-108.
39. Buchholz HW, Engelbrecht H (1970) [Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins]. *Chirurg* 41:511-515.
40. Calhoun JH, Manring MM (2005) Adult osteomyelitis. *Infect Dis Clin North Am* 19:765-786.
41. Calligaro KD, Dougherty MJ, Ryan S, Booth RE (2003) Acute arterial complications associated with total hip and knee arthroplasty. *J Vasc Surg* 38:1170-1177.
42. Campbell P, Shen FW, McKellop H (2004) Biologic and tribologic considerations of alternative bearing surfaces. *Clin Orthop Relat Res* 418:98-111.
43. Capello WN, D'Antonio JA, Manley MT, Feinberg JR (1998) Hydroxyapatite in total hip arthroplasty. Clinical results and critical issues. *Clin Orthop Relat Res* 355:200-211.
44. Carlsson AK, Lidgren L, Lindberg L (1977) Prophylactic antibiotics against early and late deep infections after total hip replacements. *Acta Orthop Scand* 48:405-410.
45. Cascella T, Giallauria F, Tafuri D, Lombardi G, Colao A, Vigorito C, Orio F (2006) [Cardiovascular complications of obesity]. *Monaldi Arch Chest Dis* 66:270-274.

46. Chambers HF (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* 7:178-182.
47. Chang JK, Chen CH, Huang KY, Wang GJ (2006) Eight-year results of hydroxyapatite-coated hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 21:541-546.
48. Charnley J (1961) Arthroplasty of the hip. A new operation. *Lancet* 1:1129-1132.
49. Chiu FY, Chen CM, Lin CF, Lo WH (2002) Cefuroxime-impregnated cement in primary total knee arthroplasty: a prospective, randomized study of three hundred and forty knees. *J Bone Joint Surg Am* 84:759-762.
50. Christel PS (1992) Biocompatibility of surgical-grade dense polycrystalline alumina. *Clin Orthop Relat Res* 282:10-18.
51. Chu CS, McManus AT, Pruitt BA Jr, Mason AD Jr (1988) Therapeutic effects of silver nylon dressings with weak direct current on *Pseudomonas aeruginosa*-infected burn wounds. *J Trauma* 28:1488-1492.
52. Clark CR, Huddleston HD, Schoch EP 3<sup>rd</sup>, Thomas BJ (2006) Leg-length discrepancy after total hip arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg* 14:38-45.
53. Clarke IC, Good V, Williams P, Schroeder D, Anissian L, Stark A, Oonishi H, Schuldies J, Gustafson G (2000) Ultra-low wear rates for rigid-on-rigid bearings in total hip replacements. *Proc Inst Mech Eng H* 214:331-347.
54. Clarke MT, Lee PT, Roberts CP, Gray J, Keene GS, Rushton N (2004) Contamination of primary total hip replacements in standard and ultra-clean operating theaters detected by the polymerase chain reaction. *Acta Orthop Scand* 75:544-548.
55. Clarke SR, Foster SJ (2006) Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv Microb Physiol* 51:187-224.
56. Colwell CW Jr (2006) Thromboprophylaxis in orthopedic surgery. *Am J Orthop* S1-9; quiz 10-1.
57. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711-745.
58. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
59. Crockarell JR, Hanssen AD, Osmon DR, Morrey BF (1998) Treatment of infection with débridement and retention of the components following hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 80:1306-1313.
60. Cuckler JM (2005) The rationale for metal-on-metal total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 441:132-136.
61. Cunha BA (2002) Osteomyelitis in elderly patients. *Clin Infect Dis* 35:287-293.

62. Davies J, Davies D (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:417-433.
63. Davies J, Wright GD (1997) Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol* 5:234-240.
64. Davis N, Curry A, Gambhir AK, Panigrahi H, Walker CR, Wilkins EG, Worsley MA, Kay PR (1999) Intraoperative bacterial contamination in operations for joint replacement. *J Bone Joint Surg Br* 81:886-889.
65. De Aza AH, Chevalier J, Fantozzi G, Schehl M, Torrecillas R (2002) Crack growth resistance of alumina, zirconia and zirconia toughened alumina ceramics for joint prostheses. *Biomaterials* 23:937-945.
66. de Lalla F (2001) Antibiotic prophylaxis in orthopedic prosthetic surgery. *J Chemother* 13 Spec No 1:48-53.
67. DiVincenzo GD, Giordano CJ, Schriever LS (1985) Biologic monitoring of workers exposed to silver. *Int Arch Occup Environ Health* 56:207-215.
68. Dobzyniak M, Fehring TK, Odum S (2006) Early failure in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 447:76-78.
69. Domann E, Hossain H, Fussle R, Chakraborty T (2000) Rapid and reliable detection of multiresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by multiplex PCR. *Dtsch Med Wochenschr* 125:613-618.
70. Dominguez LJ, Galioto A, Ferlisi A, Pineo A, Putignano E, Belvedere M, Costanza G, Barbagallo M (2006) Ageing, lifestyle modifications, and cardiovascular disease in developing countries. *J Nutr Health Aging* 10:143-149.
71. Donath K, Breuner G (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 11:318-326.
72. Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8:881-890.
73. Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167-193.
74. Doorn PF, Campbell PA, Worrall J, Benya PD, McKellop HA, Amstutz HC (1998) Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles. *J Biomed Mater Res* 42:103-111.
75. Dorr LD, Wan Z, Longjohn DB, Dubois B, Murken R (2000) Total hip arthroplasty with use of the Metasul metal-on-metal articulation. Four to seven-year results. *J Bone Joint Surg Am* 82:789-798.
76. Dorr LD, Wolf AW, Chandler R, Conaty JP (1983) Classification and treatment of dislocations of total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 173:151-158.

77. Doyon F, Evrard J, Mazas F (1989) [Evaluation of therapeutic trials published apropos of antibiotic prophylaxis in orthopedic surgery]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 75:72-76.
78. Doyon F, Evrard J, Mazas F, Hill C (1987) Long-term results of prophylactic cefazolin versus placebo in total hip replacement. *Lancet* 1:860.
79. Dueland R, Spadaro JA, Rahn BA (1982) Silver antibacterial bone cement. Comparison with gentamicin in experimental osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 169:264-268.
80. Dunn PM (2000) Dr Carl Crede (1819-1892) and the prevention of ophthalmia neonatorum. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 83:F158-159.
81. Elek SD, Conen PE (1957) The virulence of *Staphylococcus pyogenes* for man; a study of the problems of wound infection. *Br J Exp Pathol* 38:573-586.
82. Ellington JK, Harris M, Webb L, Smith B, Smith T, Tan K, Hudson M (2003) Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br* 85:918-921.
83. Elson RA (1979) [Prophylactic use of gentamycin-Palacos in the Northern General Hospital, Sheffield, England]. *Aktuelle Probl Chir Orthop* 12:206.
84. Engemann JJ, Carmeli Y, Cosgrove SE, Fowler VG, Bronstein MZ, Trivette SL, Briggs JP, Sexton DJ, Kaye KS (2003) Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Clin Infect Dis* 36:592-598.
85. Engesaeter LB, Espehaug B, Lie SA, Furnes O, Havelin LI (2006) Does cement increase the risk of infection in primary total hip arthroplasty? Revision rates in 56,275 cemented and uncemented primary THAs followed for 0-16 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop* 77:351-358.
86. Engesaeter LB, Lie SA, Espehaug B, Furnes O, Vollset SE, Havelin LI (2003) Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop Scand* 74:644-651.
87. Espehaug B, Engesaeter LB, Vollset SE, Havelin LI, Langeland N (1997) Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Review of 10,905 primary cemented total hip replacements reported to the Norwegian arthroplasty register, 1987 to 1995. *J Bone Joint Surg Br* 79:590-595.
88. Fair RJ, Tor Y (2014) Antibiotics and bacterial resistance in the 21<sup>st</sup> century. *Perspect Medicin Chem* 6:25-64.
89. Farrell CM, Springer BD, Haidukewych GJ, Morrey BF (2005) Motor nerve palsy following primary total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 87:2619-2625.

90. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO (2000) A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 52:662-668.
91. Friedman RJ (2007) Optimal duration of prophylaxis for venous thromboembolism following total hip arthroplasty and total knee arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg* 15:148-155.
92. Frommelt L (2006) Principles of systemic antimicrobial therapy in foreign material associated infection in bone tissue, with special focus on periprosthetic infection. *Injury* 37 Suppl 2:S87-94.
93. Frotscher B, Frotscher S: *Keramik und Porzellan*. Dtv-Atlas, Deutscher Taschenbuch Verlag, München, 2003.
94. Früh HJ, Willmann G, Pfaff HG (1997) Wear characteristics of ceramic-on-ceramic for hip endoprostheses. *Biomaterials* 18:873-876.
95. Furno F, Morley KS, Wong B, Sharp BL, Arnold PL, Howdle SM, Bayston R, Brown PD, Winship PD, Reid HJ (2004) Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *J Antimicrob Chemother* 54:1019-1024.
96. Garino JP (2000) Modern ceramic-on-ceramic total hip systems in the United States: early results. *Clin Orthop Relat Res* 379:41-47.
97. Garstang SV, Stitik TP (2006) Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil* 85:S2-11.
98. Garvin KL, Hinrichs SH, Urban JA (1999) Emerging antibiotic-resistant bacteria. Their treatment in total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 369:110-123.
99. Garvin KL, Salvati EA, Brause BD (1988) Role of gentamicin-impregnated cement in total joint arthroplasty. *Orthop Clin North Am* 19:605-610.
100. Geffers C, Gastmeier P, Daschner F, Ruden H (2001) [Prevention of postoperative wound infections. Evidence-based recommendations]. *Zentralbl Chir* 126:84-92.
101. Gelbard A, Haub C (1998) Population "explosion" not over for half the world. *Popul Today* 26:1-2.
102. Gelbard A, Haub C, Kent MM (1999) World population beyond six billion. *Popul Bull* 54:1-44.
103. Gentry LO (1988) Osteomyelitis: options for diagnosis and management. *J Antimicrob Chemother* 21SC:115-131.
104. Goldberg SH, Studders EM, Cohen MS (2007) Ultrasonic cement removal in revision arthroplasty. *Orthopedics* 30:632-635.
105. Gould IM (2006) Costs of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its control. *Int J Antimicrob Agents* 28:379-384.

106. Gristina AG (1987) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237:1588-1595.
107. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E (2006) Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368:874-885.
108. Gunther KP (2001) Surgical approaches for osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15:627-643.
109. 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* 14:242-277.
110. Hallab N, Merritt K, Jacobs JJ (2001) Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am* 83:428-436.
111. Hannouche D, Hamadouche M, Nizard R, Bizot P, Meunier A, Sedel L (2005) Ceramics in total hip replacement. *Clin Orthop Relat Res* 430:62-71.
112. Hansis M (1996) Pathophysiology of infection – a theoretical approach. *Injury* 27S3:SC5-8.
113. Hansis M, Arens S (1996) [Prophylactic and therapeutic use of antibiotics in trauma surgery]. *Unfallchirurg* 99:316-322.
114. Hanssen AD (2006) Infected hip arthroplasty: “maximizing its solution: once burned, twice learned”. *Orthopedics* 29:799-800.
115. Hanssen AD, Osmon DR (1999) The use of prophylactic antimicrobial agents during and after hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 369:124-138.
116. Hanssen AD, Rand JA (1999) Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty. *Instr Course Lect* 48:111-122.
117. Hanssen AD, Spangehl MJ (2004) Treatment of the infected hip replacement. *Clin Orthop Relat Res* 420:63-71.
118. Harris WH, Sledge CB (1990) Total hip and total knee replacement (2). *N Engl J Med* 323:801-807.
119. Hart JA (2004) Joint replacement surgery. *Med J Aust* 180:S27-30.
120. Havelin LI, Espehaug B, Vollset SE, Engesaeter LB (1995) The effect of the type of cement on early revision of Charnley total hip prostheses. A review of eight thousand five hundred and seventy-nine primary arthroplasties from the Norwegian Arthroplasty Register. *J Bone Joint Surg Am* 77:1543-1550.
121. Hawker GA (2006) Who, when, and why total joint replacement surgery? The patient’s perspective. *Curr Opin Rheumatol* 18:526-530.

122. Hawn MT, Gray SH, Vick CC, Itani KM, Bishop MJ, Ordin DL, Houston TK (2006) Timely administration of prophylactic antibiotics for major surgical procedures. *J Am Coll Surg* 203:803-811.
123. Haynes DR, Crotti TN, Potter AE, Loric M, Atkins GJ, Howie DW, Findlay DM (2001) The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Br* 83:902-911.
124. Henry SL, Galloway KP (1995) Local antibacterial therapy for the management of orthopaedic infections. Pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 29:36-45.
125. Hill C, Flamant R, Mazas F, Evrard J (1981) Prophylactic cefazolin versus placebo in total hip replacement. Report of a multicentre double-blind randomised trial. *Lancet* 1:795-796.
126. Holzegel K (1970) [Argyrosis of the skin and mucous membranes in chemical industry]. *Z Gesamte Hyg* 16:440-447.
127. Homesley HD, Minnich JM, Parvizi J, Hozack WJ (2004) Total hip arthroplasty revision: a decade of change. *Am J Orthop* 33:389-392.
128. Hope PG, Kristinsson KG, Norman P, Elson RA (1989) Deep infection of cemented total hip arthroplasties caused by coagulase-negative staphylococci. *J Bone Joint Surg Br* 71:851-855.
129. Hsu LY, Kwa AL, Lye DC, Chlebicki MP, Tan TY, Ling ML, Wong SY, Goh LG (2008) Reducing antimicrobial resistance through appropriate antibiotic usage in Singapore. *Singapore Med J* 49:749-755.
130. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, Gagnon F, Truchon K, Bastien M, Picard FJ, van Belkum A, Ouellette M, Roy PH, Bergeron MG (2004) New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol* 42:1875-1884.
131. Ipsen T, Jorgensen PS, Damholt V, Torholm C (1991) Gentamicin-collagen sponge for local applications. 10 cases of chronic osteomyelitis followed for 1 year. *Acta Orthop Scand* 62:592-594.
132. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K (2003) Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* 6:41-52.
133. Jacobs JJ, Gilbert JL, Urban RM (1998) Corrosion of metal orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am* 80:268-282.
134. Jacobs JJ, Hallab NJ, Urban RM, Wimmer MA (2006) Wear particles. *J Bone Joint Surg Am* 88 Suppl 2:99-102.
135. Jensen EJ, Rungby J, Hansen JC, Schmidt E, Pedersen B, Dahl R (1988) Serum concentrations and accumulation of silver in skin during three months treatment with an anti-smoking chewing gum containing silver acetate. *Hum Toxicol* 7:535-540.

136. Jiranek WA, Hanssen AD, Greenwald AS (2006) Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *J Bone Joint Surg Am* 88:2487-2500.
137. Jonas D, Speck M, Daschner FD, Grundmann H (2002) Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening swabs. *J Clin Microbiol* 40:1821-1823.
138. Josefsson G, Gudmundsson G, Kolmert L, Wijkstrom S (1990) Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. A five-year survey of 1688 hips. *Clin Orthop Relat Res* 253:173-178.
139. Josefsson G, Kolmert L (1993) Prophylaxis with systematic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. A ten-year survey of 1,688 hips. *Clin Orthop Relat Res* 292:210-214.
140. Josefsson G, Lindberg L, Wiklander B (1981) Systemic antibiotics and gentamicin-containing bone cement in the prophylaxis of postoperative infections in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 159:194-200.
141. Judet R (1954) Notre expérience des arthroplasties de la hanche par prothèse acrylique depuis 1946. 6e Congrès Soc. Internat. Chir. Orthop. Traumatol., Berne.
142. Kadoya Y, Kobayashi A, Ohashi H (1998) Wear and osteolysis in total joint replacements. *Acta Orthop Scand* 69:435-436.
143. Kaiser AB (1986) Antimicrobial prophylaxis in surgery. *N Engl J Med* 315:1129-1138.
144. Kalicke T, Kutscha-Lissberg F, Frangen TM, Muhr G, Arens S (2004) [Pathophysiology of posttraumatic osteitis]. *Orthopade* 33:405-410.
145. Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ (2000) Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs* 59:1223-1232.
146. Katayama Y, Zhang HZ, Chambers HF (2004) PBP 2a mutations producing very-high-level resistance to beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 48:453-459.
147. Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM: *Medizinische Mikrobiologie. Verstehen – Lernen – Nachschlagen. Ideal für die neue AO.* Thieme Verlag, Stuttgart, 11., überarbeitete und erweiterte Ausgabe, 2005.
148. Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M (1999) Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by multiplex PCR. *J Hosp Infect* 43:33-37.
149. Kilgus DJ, Howe DJ, Strang A (2002) Results of periprosthetic hip and knee infections caused by resistant bacteria. *Clin Orthop Relat Res* 404:116-124.
150. Kircher J, Bergschmidt P, Bader R, Kluess D, Besser-Mahuzir E, Leder A, Mittelmeier W (2007) [The importance of wear couples for younger endoprosthesis patients]. *Orthopade* 36:337-346.

151. Klekamp J, Dawson JM, Haas DW, DeBoer D, Christie M (1999) The use of vancomycin and tobramycin in acrylic bone cement: biomechanical effects and elution kinetics for use in joint arthroplasty. *J Arthroplasty* 14:339-346.
152. Klemm K (1979) [Gentamicin-PMMA-beads in treating bone and soft tissue infections (author's transl)]. *Zentralbl Chir* 104:934-942.
153. Knaepler H, Klemm K, Dingeldein E, Wahlig H (1985) [Gentamicin PMMA minichains in septic bone and soft tissue surgery]. *Unfallchirurg* 88:457-464.
154. Koeppen P, Sterk P: *Chirurgisches 1x1. Arbeitstechniken für die operativen Fachgebiete*. Verlag Urban & Fischer bei Elsevier, München, 2005.
155. Kollenberg W: *Technische Keramik – Grundlagen, Werkstoffe, Verfahrenstechnik*. Vulkan Verlag, Essen, 1. Auflage, 2004.
156. König DP, Randerath O, Hackenbroch MH (1999) [Nosocomial infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and epidermidis (MRSE) strains. Their importance, prophylaxis and therapy in orthopedic surgery]. *Unfallchirurg* 102:324-328.
157. Kopp BJ, Nix DE, Armstrong EP (2004) Clinical and economic analysis of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Ann Pharmacother* 38:1377-1382.
158. Krackow KA (2004) Osteoporosis: an unsolved problem in total hip arthroplasty. *Orthopedics* 27:955-956.
159. Krimmer V, Merkert H, von Eiff C, Frosch M, Eulert J, Lohr JF, Hacker J, Ziebuhr W (1999) Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 37:2667-2673.
160. Kühn KD: *Bone Cements*. Springer Verlag, Berlin, 2000.
161. Kurtz SM: *The UHMWPE Handbook: Ultra-High Molecular Weight Polyethylene in Total Joint Replacement*. Elsevier Academic Press, London – San Diego, 2004.
162. Kutscha-Lissberg F, Hebler U, Kalicke T, Arens S (2004) [Principles of surgical therapy concepts for postoperative and chronic osteomyelitis]. *Orthopade* 33:439-454.
163. Lamp K (1996) Antibigrams. *Pharm Pract Manag Q* 16:52-56.
164. Lansdown A, Williams A (2007) Bacterial resistance to silver-based antibiotics. *Nurs Times* 103:48-49.
165. Lansdown AB (2002) Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care* 11:125-130.
166. Lassus J, Salo J, Jiranek WA, Santavirta S, Nevalainen J, Matucci-Cerinic M, Horak P, Konttinen Y (1998) Macrophage activation results in bone resorption. *Clin Orthop Relat Res* 352:7-15.

167. Lautenschlager EP, Jacobs JJ, Marshall GW, Meyer PR Jr (1976) Mechanical properties of bone cements containing large doses of antibiotic powders. *J Biomed Mater Res* 10:929-938.
168. Lazzarini L, Mader JT, Calhoun JH (2004) Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg Am* 86:2305-2318.
169. Lee AJ, Ling RS, Vangala SS (1978) Some clinically relevant variables affecting the mechanical behaviour of bone cement. *Arch Orthop Trauma Surg* 92:1-18.
170. Lentino JR (2003) Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis* 36:1157-1161.
171. Levi K, Bailey C, Bennett A, Marsh P, Cardy DL, Towner KJ (2003) Evaluation of an isothermal signal amplification method for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patient-screening swabs. *J Clin Microbiol* 41:3187-3191.
172. Levina A, Lay PA (2008) Chemical properties and toxicity of chromium(III) nutritional supplements. *Chem Res Toxicol* 21:563-571.
173. Lew DP, Waldvogel FA (2004) Osteomyelitis. *Lancet* 364:369-379, 2004.
174. Lewis K (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45:999-1007.
175. Lidgren L (2001) Joint prosthetic infections: a success story. *Acta Orthop Scand* 72:553-556.
176. Lidwell OM, Lowbury EJ, Whyte W, Blowers R, Stanley SJ, Lowe D (1984) Infection and sepsis after operations for total hip or knee-joint replacement: influence of ultraclean air, prophylactic antibiotics and other factors. *J Hyg (Lond)* 93:505-529.
177. Livermore DM (2000) Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* 16 Suppl 1:S3-10.
178. Long WT (2005) The clinical performance of metal-on-metal as an articulation surface in total hip replacement. *Iowa Orthop J* 25:10-16.
179. Lottspeich F, Engels JW, Simeon A: *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2. Auflage, 2008.
180. Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520-532.
181. Lüllmann H, Mohr K, Hein L: *Taschenatlas der Pharmakologie*. 5., überarbeitete und erweiterte Ausgabe, Thieme Verlag, Stuttgart, 2004.
182. Lutz W, Qiang R (2002) Determinants of human population growth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:1197-1210.

183. Lynch M, Esser MP, Shelley P, Wroblewski BM (1987) Deep infection in Charnley low-friction arthroplasty. Comparison of plain and gentamicin-loaded cement. *J Bone Joint Surg Br* 69:355-360.
184. Maathuis PG, Neut D, Busscher HJ, van der Mei HC, van Horn JR (2005) Perioperative contamination in primary total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 433:136-139.
185. MacDonald SJ (2004) Metal-on-metal total hip arthroplasty: the concerns. *Clin Orthop Relat Res* 429:86-93.
186. Mack D, Rohde H, Harris LG, Davies AP, Horstkotte MA, Knobloch JK (2006) Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* 29:343-359.
187. Mahan J, Seligson D, Henry SL, Hynes P, Dobbins J (1991) Factors in pin tract infections. *Orthopedics* 14:305-308.
188. Makinen TJ, Veiranto M, Lankinen P, Moritz N, Jalava J, Tormala P, Aro HT (2005) In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from osteoconductive bone defect filler. *J Antimicrob Chemother* 56:1063-1068.
189. Maloney WJ, Keeney JA (2004) Leg length discrepancy after total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 19:108-110.
190. Mancuso CA, Ranawat CS, Esdaile JM, Johanson NA, Charlson ME (1996) Indications for total hip and total knee arthroplasties. Results of orthopaedic surveys. *J Arthroplasty* 11:34-46.
191. Mandell GL (2005) Uptake, transport, delivery, and intracellular activity of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy* 25:130S-133S.
192. Marculescu CE, Osmon DR (2005) Antibiotic prophylaxis in orthopedic prosthetic surgery. *Infect Dis Clin North Am* 19:931-946.
193. Marks KE, Nelson CL, Lautenschlager EP (1976) Antibiotic-impregnated acrylic bone cement. *J Bone Joint Surg Am* 58:358-364.
194. McKee GK, Watson-Farrar J (1966) Replacement of arthritic hips by the McKee-Farrar prosthesis. *J Bone Joint Surg Br* 48:245-259.
195. McKellop H, Park SH, Chiesa R, Doorn P, Lu B, Normand P, Grigoris P, Amstutz H (1996) In vivo wear of three types of metal on metal hip prostheses during two decades of use. *Clin Orthop Relat Res* 329S:128-140.
196. McKellop H, Shen FW, Lu B, Campbell P, Salovey R (2000) Effect of sterilization method and other modifications on the wear resistance of acetabular cups made of ultra-high molecular weight polyethylene. A hip-simulator study. *J Bone Joint Surg Am* 82:1708-1725.
197. McKellop HA (2001) Bearing surfaces in total hip replacements: state of the art and future developments. *Instr Course Lect* 50:165-179.

198. McQueen MM, Hughes SP, May P, Verity L (1990) Cefuroxime in total joint arthroplasty. Intravenous or in bone cement. *J Arthroplasty* 5:169-172.
199. Meek RM, Allan DB, McPhillips G, Kerr L, Howie CR (2006) Epidemiology of dislocation after total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 447:9-18.
200. Mendel RR, Bittner F (2006) Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta* 1763:621-635.
201. Merritt K, Brown SA (1996) Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions. *Clin Orthop Relat Res* 329S:233-243.
202. Meyers BR, Berson BL, Gilbert M, Hirschman SZ (1973) Clinical patterns of osteomyelitis due to gram-negative bacteria. *Arch Intern Med* 131:228-233.
203. Mjoberg B (1997) The theory of early loosening of hip prostheses. *Orthopedics* 20:1169-1175.
204. Moyer CA, Brentano L, Gravens DL, Margraf HW, Monafu WW Jr (1965) Treatment of large human burns with 0.5 per cent silver nitrate solution. *Arch Surg* 90:812-867.
205. Munch R (2003) Robert Koch. *Microbes Infect* 5:69-74.
206. Myrvold HE, Brandberg A (1977) Microembolism in experimental septic shock. Distribution of platelets and fibrinogen after intravenous injection of disintegrated *Pseudomonas* bacteria to dogs. *Eur Surg Res* 9:34-47.
207. Naudie D, Roeder CP, Parvizi J, Berry DJ, Egli S, Busato A (2004) Metal-on-metal versus metal-on-polyethylene bearings in total hip arthroplasty: a matched case-control study. *J Arthroplasty* 19S2:35-41.
208. Nicas TI, Zeckel ML, Braun DK (1997) Beyond vancomycin: new therapies to meet the challenge of glycopeptide resistance. *Trends Microbiol* 5:240-249.
209. Nickel JC, Wright JB, Ruseska I, Marrie TJ, Whitfield C, Costerton JW (1985) Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing a urinary catheter in vitro. *Eur J Clin Microbiol* 4:213-218.
210. Nijhof MW, Dhert WJ, Fler A, Vogely HC, Verbout AJ (2000) Prophylaxis of implant-related staphylococcal infections using tobramycin-containing bone cement. *J Biomed Mater Res* 52:754-761.
211. Nijhof MW, Fler A, Hardus K, Vogely HC, Schouls LM, Verbout AJ, Dhert WJ (2001) Tobramycin-containing bone cement and systemic cefazolin in a one-stage revision. Treatment of infection in a rabbit model. *J Biomed Mater Res* 58:747-753.
212. Nijhof MW, Stallmann HP, Vogely HC, Fler A, Schouls LM, Dhert WJ, Verbout AJ (2000) Prevention of infection with tobramycin-containing bone cement or systemic cefazolin in an animal model. *J Biomed Mater Res* 52:709-715.

213. Norden CW (1985) Prevention of bone and joint infections. *Am J Med* 78:229-232.
214. O'Connor MI (2006) Osteoarthritis of the hip and knee: sex and gender differences. *Orthop Clin North Am* 37:559-568.
215. Oishi CS, Carrion WV, Hoaglund FT (1993) Use of parenteral prophylactic antibiotics in clean orthopaedic surgery. A review of the literature. *Clin Orthop Relat Res* 296:249-255.
216. Paisley JW, Lauer BA (1994) Pediatric blood cultures. *Clin Lab Med* 14:17-30.
217. Pakyz AL (2007) The utility of hospital antibiograms as tools for guiding empiric therapy and tracking resistance. *Pharmacotherapy* 27:1306-1312.
218. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 48:585-617.
219. Pavel A, Smith RL, Ballard A, Larsen IJ (1974) Prophylactic antibiotics in clean orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Am* 56:777-782.
220. Pavel A, Smith RL, Ballard A, Larson IJ (1977) Prophylactic antibiotics in elective orthopedic surgery: a prospective study of 1,591 cases. *South Med J* 70 Suppl 1:50-55.
221. Peacock AJ: *Handbook of Polyethylene: Structures, Properties, and Applications*. Marcel Dekker Inc., New York, 2000.
222. Peersman G, Laskin R, Davis J, Peterson M (2001) Infection in total knee replacement: a retrospective review of 6489 total knee replacements. *Clin Orthop Relat Res* 392:15-23.
223. Persson U, Persson M, Malchau H (1999) The economics of preventing revisions in total hip replacement. *Acta Orthop Scand* 70:163-169.
224. Petit A, Catelas I, Antoniou J, Zukor DJ, Huk OL (2002) Differential apoptotic response of J774 macrophages to alumina and ultra-high-molecular-weight polyethylene particles. *J Orthop Res* 20:9-15.
225. Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P (2005) The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol* 43:6123-6125.
226. Piconi C, Maccauro G (1999) Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials* 20:1-25.
227. Plitz W (2007) [Metal/metal coupling in total hip arthroplasty. Progress or setback?]. *Orthopade* 36:212-219.
228. Pohler OE (2000) Unalloyed titanium for implants in bone surgery. *Injury* 31S4:7-13.

229. Powell A, Teichtahl AJ, Wluka AE, Cicuttini FM (2005) Obesity: a preventable risk factor for large joint osteoarthritis which may act through biomechanical factors. *Br J Sports Med* 39:4-5.
230. Powers KA, Terpenning MS, Voice RA, Kauffman CA (1990) Prosthetic joint infections in the elderly. *Am J Med* 88:9N-13N.
231. Pschyrembel W: *Klinisches Wörterbuch*. De Gruyter Verlag, Berlin New York, 261., neu bearbeitete Auflage, 2007.
232. Rader CP, Sterner T, Jakob F, Schutze N, Eulert J (1999) Cytokine response of human macrophage-like cells after contact with polyethylene and pure titanium particles. *J Arthroplasty* 14:840-848.
233. Ramage G, Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR (2003) Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. *Biomaterials* 24:3221-3227.
234. Ring PA (1968) Complete replacement arthroplasty of the hip by the ring prosthesis. *J Bone Joint Surg Br* 50:720-731.
235. Robertsson O, Dunbar MJ, Knutson K, Lidgren L (2000) Past incidence and future demand for knee arthroplasty in Sweden: a report from the Swedish Knee Arthroplasty Register regarding the effect of past and future population changes on the number of arthroplasties performed. *Acta Orthop Scand* 71:376-380.
236. Robson MC (1979) Infection in the surgical patient: an imbalance in the normal equilibrium. *Clin Plast Surg* 6:493-503.
237. Roesgen M, Hierholzer G, Hax PM (1989) Post-traumatic osteomyelitis. Pathophysiology and management. *Arch Orthop Trauma Surg* 108:1-9.
238. Romagnoli S (2002) Press-fit hip arthroplasty: a European alternative. *J Arthroplasty* 17:108-112.
239. Rosenman KD, Moss A, Kon S (1979) Argyria: clinical implications of exposure to silver nitrate and silver oxide. *J Occup Med* 21:430-435.
240. Rottger J, Buchholz HW, Engelbrecht E, Siegel A (1979) [Gentamycin-PMMA in joint prosthesis. Indication and technic in the use of Refobacin-Palacos in joint prosthesis]. *Aktuelle Probl Chir Orthop* 12:197-200.
241. Rubenstein AH (2005) Obesity: a modern epidemic. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 116:103-111.
242. Rungby J (1990) An experimental study on silver in the nervous system and on aspects of its general cellular toxicity. *Dan Med Bull* 37:442-449.
243. Sanfilippo JA, Austin MS (2006) Implants for total hip arthroplasty. *Expert Rev Med Devices* 3:769-776.
244. Santavirta S, Bohler M, Harris WH, Konttinen YT, Lappalainen R, Muratoglu O, Rieker C, Salzer M (2003) Alternative materials to improve total hip replacement tribology. *Acta Orthop Scand* 74:380-388.

245. Savarino L, Padovani G, Ferretti M, Greco M, Cenni E, Perrone G, Greco F, Baldini N, Giunti A (2008) Serum ion levels after ceramic-on-ceramic and metal-on-metal total hip arthroplasty: 8-year minimum follow-up. *J Orthop Res* Jul 16 (Epub ahead of print).
246. Schierholz JM, Morsczeck C, Brenner N, König DP, Yucel N, Korenkov M, Neugebauer E, Rump AF, Waalenkamp G, Beuth J, Pulverer G, Arens S (2004) [Special aspects of implant-associated infection in orthopedic surgery. From the pathophysiology to custom-tailored prevention strategies]. *Orthopäde* 33:397-404.
247. Schinsky MF, Macaulay W, Parks ML, Kiernan H, Nercessian OA (2001) Nerve injury after primary total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 16:1048-1054.
248. Schmidt M, Weber H, Schön R (1996) Cobalt chromium molybdenum metal combination for modular hip prostheses. *Clin Orthop Relat Res* 329S:35-47.
249. Schmitt W (1982) [Robert Koch; man and work (author's transl)]. *Zentralbl Chir* 107:251-259.
250. Schnettler R, Alt V, Dingeldein E, Pfefferle HJ, Kilian O, Meyer C, Heiss C, Wenisch S (2003) Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials* 24:4603-4608.
251. Schnettler R, Steinau HU: *Septische Knochenchirurgie*. Thieme Verlag, Stuttgart New York, 2004.
252. Schreurs WJ, Rosenberg H (1982) Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 152:7-13.
253. Schuh A, Jezussek D, Fabijani R, Honle W (2007) [Conservative Therapy of Knee Osteoarthritis]. *MMW Fortschr Med* 149:31-32.
254. Schumacher M, Schulgen G: *Methodik klinischer Studien. Statistik und ihre Anwendungen*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1. Auflage, 2002.
255. Schwartz M (2001) The life and works of Louis Pasteur. *J Appl Microbiol* 91:597-601.
256. Schwister K: *Taschenbuch der Chemie*. Fachbuchverlag Leipzig, 3., neu bearbeitete Auflage, 2005.
257. Shahgaldi BF, Heatley FW, Dewar A, Corrin B (1995) In vivo corrosion of cobalt-chromium and titanium wear particles. *J Bone Joint Surg Br* 77:962-966.
258. Sibbald MJ, Ziebandt AK, Engelmann S, Hecker M, de Jong A, Harmsen HJ, Raangs GC, Stokroos I, Arends JP, Dubois JY, van Dijk JM (2006) Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:755-788.

259. Sierra RJ, Trousdale RT, Pagnano MW (2003) Above-the-knee amputation after a total knee replacement: prevalence, etiology, and functional outcome. *J Bone Joint Surg Am* 85:1000-1004.
260. Silber JH, Rosenbaum PR, Trudeau ME, Chen W, Zhang X, Lorch SA, Kelz RR, Mosher RE, Even-Shoshan O (2005) Preoperative antibiotics and mortality in the elderly. *Ann Surg* 242:107-114.
261. Silverstein A, Donatucci CF (2003) Bacterial biofilms and implantable prosthetic devices. *Int J Impot Res* 15 Suppl 5:S150-154.
262. Skurray RA, Firth N (1997) Molecular evolution of multiply-antibiotic-resistant staphylococci. *Ciba Found Symp* 207:167-183; discussion 183-191.
263. Slawson RM, Lee H, Trevors JT (1990) Bacterial interactions with silver. *Biol Met* 3:151-154.
264. Smith SC Jr (2007) Multiple risk factors for cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Am J Med* 120:S3-11.
265. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, Tenover FC, Zervos MJ, Band JD, White E, Jarvis WR (1999) Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. *N Engl J Med* 340:493-501.
266. Spadaro JA, Webster DA, Becker RO (1979) Silver polymethyl methacrylate antibacterial bone cement. *Clin Orthop Relat Res* 143:266-270.
267. Stevenson S (1999) Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am* 30:543-552.
268. Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358:135-138.
269. Stille W, Brodt HR, Groll A: Antibiotika-Therapie. Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung. Schattauer Verlag, 11., komplett aktualisierte und erweiterte Ausgabe, 2005.
270. Stoodley P, Ehrlich GD, Sedghizadeh PP, Hall-Stoodley L, Baratz ME, Altman DT, Sotereanos NG, Costerton JW, Demeo P (2011) Orthopaedic biofilm infections. *Curr Orthop Pract* 22:558-563.
271. Strachan CJ (1995) The prevention of orthopaedic implant and vascular graft infections. *J Hosp Infect* 30 Suppl:54-63.
272. Sudmann E, Vik H, Rait M, Todnem K, Andersen KJ, Julsham K, Flesland O, Rungby J (1994) Systemic and local silver accumulation after total hip replacement using silver-impregnated bone cement. *Med Prog Technol* 20:179-184.
273. Sun Y, Sturmer T, Gunther KP, Brenner H (1997) [Incidence and prevalence of cox- and gonarthrosis in the general population]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 135:184-192.

274. Tan SY, Brown J (2006) Ignac Philipp Semmelweis (1818-1865): handwashing saves lives. *Singapore Med J* 47:6-7.
275. Tang SS, Apisamthanarak A, Hsu LY (2014) Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev* [Epub ahead of print].
276. Tang WM, Chiu KY, Ng TP, Yau WP, Ching PT, Seto WH (2003) Efficacy of a single dose of cefazolin as a prophylactic antibiotic in primary arthroplasty. *J Arthroplasty* 18:714-718.
277. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233-2239.
278. Thierse L (1978) [Experiences with Refobacin-Palacos with regard to deep late infections following hip-joint endoprosthesis surgery. A 4-years' study (author's transl)]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 116:847-852.
279. Thomes B, Murray P, Bouchier-Hayes D (2002) Development of resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* on gentamicin-loaded bone cement in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 84:758-760.
280. Torholm C, Lidgren L, Lindberg L, Kahlmeter G (1983) Total hip joint arthroplasty with gentamicin-impregnated cement. A clinical study of gentamicin excretion kinetics. *Clin Orthop Relat Res* 181:99-106.
281. Trampuz A, Osmon DR, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R (2003) Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clin Orthop Relat Res* 414:69-88.
282. Universitätsarchiv Tübingen, [www.uni-tuebingen.de/UAT/archiv1.htm](http://www.uni-tuebingen.de/UAT/archiv1.htm)
283. van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ (2000) Gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Acta Orthop Scand* 71:625-629.
284. van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ (2001) Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. *Acta Orthop Scand* 72:557-571.
285. Verband der Keramischen Industrie e.V.: Brevier Technische Keramik. Fahner Verlag, Lauf an der Pegnitz, 4., veränderte Auflage, 2003.
286. Vik H, Andersen KJ, Julshamn K, Todnem K (1985) Neuropathy caused by silver absorption from arthroplasty cement. *Lancet* 1:872.
287. Vincent JB (2004) Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proc Nutr Soc* 63:41-47.

288. Wahlig H, Dingeldein E (1980) Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthop Scand* 51:49-56.
289. Wahlig H, Dingeldein E, Bergmann R, Reuss K (1978) The release of gentamicin from polymethylmethacrylate beads. An experimental and pharmacokinetic study. *J Bone Joint Surg Br* 60:270-275.
290. Wahlig H, Dingeldein E, Buchholz HW, Buchholz M, Bachmann F (1984) Pharmacokinetic study of gentamicin-loaded cement in total hip replacements. Comparative effects of varying dosage. *J Bone Joint Surg Br* 66:175-179.
291. Walker PS, Gold BL (1996) The tribology (friction, lubrication and wear) of all-metal artificial hip joints. 1971. *Clin Orthop Relat Res* 329S:4-10.
292. Walker PS, Salvati E, Hotzler RK (1974) The wear on removed McKee-Farrar total hip prostheses. *J Bone Joint Surg Am* 56:92-100.
293. Walter G: Implantat-assoziierte Infektionen in Orthopädie und Unfallchirurgie. Teil 1: Diagnostik. Zertifizierte Fortbildung, Hessisches Ärzteblatt, Ausgabe 9, 2008.
294. Wannske M, Tscherne H (1979) [Results of prophylactic use of Refobacin-Palacos in implantation of endoprotheses of the hip joint in Hannover]. *Aktuelle Probl Chir Orthop* 12:201-205.
295. Wearing SC, Hennig EM, Byrne NM, Steele JR, Hills AP (2006) Musculoskeletal disorders associated with obesity: a biomechanical perspective. *Obes Rev* 7:239-250.
296. Weber BG (1996) Experience with the Metasul total hip bearing system. *Clin Orthop Relat Res* 329S:69-77.
297. Weinstein AM, Bingham DN, Sauer BW, Lunceford EM (1976) The effect of high pressure insertion and antibiotic inclusions upon the mechanical properties of polymethylmethacrylate. *Clin Orthop Relat Res* 121:67-73.
298. Willmann G (2000) Ceramic femoral head retrieval data. *Clin Orthop Relat Res* 379:22-28.
299. Wilson JS, Miranda A, Johnson BL, Shames ML, Back MR, Bandyk DF (2003) Vascular injuries associated with elective orthopedic procedures. *Ann Vasc Surg* 17:641-644.
300. Wirth CJ, Mutschler WE: *Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie*. Thieme Verlag, Stuttgart, 2007.
301. Worz R (2006) [Obesity is not merely a cardiovascular risk factor! Knee and hip joints and the back are also stressed]. *MMW Fortschr Med* 148:25.
302. Wyatt D, McGowan DN, Najarian MP (1990) Comparison of a hydrocolloid dressing and silver sulfadiazine cream in the outpatient management of second-degree burns. *J Trauma* 30:857-865.

303. Yee AJ, Kreder HK, Bookman I, Davey JR (1999) A randomized trial of hydroxyapatite coated prostheses in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 366:120-132.
304. Zeller V, Ghorbani A, Strady C, Leonard P, Mamoudy P, Desplaces N (2007) *Propionibacterium acnes*: an agent of prosthetic joint infection and colonization. *J Infect* 55:119-124.
305. Zhao G, Stevens SE Jr (1998) Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals* 11:27-32.
306. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE (2004) Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 351:1645-1654.

## 11 Publikationsverzeichnis

Stefan Meißner, Volker Alt, Peter Steinrücke, Thorsten Bechert, Michael Wagener, Peter Seidel, Eugen Domann, Reinhard Schnettler: Antimikrobielle Aktivität und Zellverträglichkeit von nanopartikulärem Silberknochenzement. Eine *in-vitro*-Untersuchung.

Postervortrag DGU/DGOC, Berlin, 2004.

# 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.“

# Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. med. Dr. med. vet. Dr. h.c. Reinhard Schnettler gilt zuerst mein Dank für die Überlassung des Promotionsthemas und die vorbehaltlose Unterstützung der Tierexperimente. Regelmäßige Dienstbefreiung für einen Doktoranden ist nicht selbstverständlich und verdient besondere Anerkennung.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. biol. hom. Volker Alt als Doktorvater und Betreuer danke ich ganz herzlich für die konsequente Anleitung zu wissenschaftlichem Arbeiten und das persönliche, freundschaftliche Verhältnis, das wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, sowie für die obligatorische Thüringer Bratwurst auf dem Rückweg von Bad Langensalza nach Gießen abends bei Eis und Schnee.

Dank gebührt der BioGate AG, Nürnberg, für die Bereitstellung von MikroSilber und der Coripharm GmbH & Co. KG, Dieburg, für die Lieferung von PMMA-Knochenzement. Das Engagement der Herren Dr. Peter Seidel, Edgar Wüst und Christoph Sattig sei dabei besonders hervorgehoben.

In Liebe danke ich meiner Mutter, die meinen Geschwistern und mir nicht nur das Abitur und ein Hochschulstudium ermöglichte, sondern auch meine Auslandsaufenthalte in Santiago de Compostela und an der Yale University sicherstellte, die mich menschlich und fachlich nachhaltig geprägt haben.