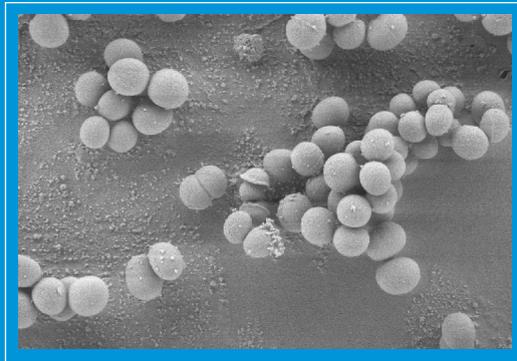


Antibiotika-haltige Knochenzemente:

In vitro Untersuchungen der Freisetzungskinetiken und antimikrobiellen Wirkung



INAUGURAL-DISSERTATION

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

URS RÜDIGER SCHIEFER

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

ISBN 3-89687-690-2

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2004

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

1st Edition 2004

© 2004 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Antibiotika-haltige Knochenzemente: In vitro Untersuchungen der Freisetzungskinetiken und antimikrobiellen Wirkung

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

vorgelegt von Urs Rüdiger Schiefer
aus Lich

Gießen 2004

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie,
Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Schnettler)
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Schnettler

Gutachter: Prof. Dr. Eikmann

Tag der Disputation: 12.01.2004

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	7
2	Die Biomaterial-assoziierte Infektion	9
2.1	Epidemiologie	9
2.2	Pathogenese	9
2.2.1	Biofilm und Biofilm-Wirt-Wechselwirkung	9
2.2.2	Wirt-Biomaterial-Wechselwirkung	11
2.3	Pathologie	12
2.4	Mikrobiologie	13
2.5	Klinische Symptomatik	14
2.6	Diagnose	15
2.6.1	Frühinfektionen	15
2.6.2	Spätinfektionen	16
2.7	Therapie	17
2.7.1	Frühinfektionen	17
2.7.2	Spätinfektionen	19
2.7.2.1	Exzisionsarthroplastik	19
2.7.2.2	Einzeitiger Wechsel	19
2.7.2.3	Zweizeitiger Wechsel	20
2.7.2.4	Arthrodesse und Amputation	20
2.7.2.5	Suppressionstherapie	20
2.8	Präventionsmöglichkeiten	21
2.8.1	Allgemeine Maßnahmen	21
2.8.2	Intravenöse Antibiotikagaben	21
2.8.3	Spätprophylaxe	21
2.8.4	Antibiotika-haltige Zemente	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Allgemeine Materialien (Prüfzylinder, Grasso-Modell)	23
3.1.1	Prüfzylinder	23
3.1.1.1	Zemente	23
3.1.1.2	Maße und Gewichte	23
3.1.1.3	Antibiotika	24
3.1.1.4	Antibiotikumdosis im Knochenzement	24
3.1.2	Grasso-Modell	24
3.1.2.1	Material	24
3.1.2.2	Versuchsanordnung	25
3.1.2.3	Allgemeine Einstellungen	25
3.2	Freisetzungskinetiken	25
3.2.1	Bestimmung der Freisetzungskinetik mittels kontinuierlicher Elution	25
3.2.1.1	Versuchsaufbau	25
3.2.1.2	Probenentnahme	26
3.2.2	Bestimmung der Freisetzungskinetik mittels statischer Elution	26
3.2.2.1	Material	26
3.2.2.2	Methode	26
3.2.3	Konzentrationsbestimmung mittels Bioassay	27
3.2.3.1	Agardiffusionstest	27
3.2.3.2	Material	27
3.2.3.3	Plattenherstellung	28
3.2.3.4	Beschicken der Platten	28
3.3	Diffusionsversuche	29

3.3.1	Material	29
3.3.2	Keime	30
3.3.3	Methode.....	30
3.4	Wachstumskinetik im Grasso-Modell.....	31
3.4.1	Versuchsansatz	31
3.4.2	Keim	31
3.4.3	Probenentnahme	31
3.4.4	Reihenverdünnung und Ausplattierung.....	31
3.4.5	Auszählung.....	32
3.5	Infektionsversuche (Teil 1)	32
3.5.1	Material	32
3.5.2	Zemente	32
3.5.3	Keim	33
3.5.4	Versuchsansatz	33
3.5.5	Infektionsdosis	33
3.5.6	Probenentnahme	33
3.5.6.1	Testzylinder	33
3.5.6.2	Eluat	34
3.5.7	Reihenverdünnungstest und Ausplattierung.....	34
3.5.8	Auszählung.....	34
3.6	Infektionsversuche (Teil 2)	35
3.6.1	Material	35
3.6.2	Zemente	35
3.6.3	Keim	35
3.6.4	Versuchsansatz	35
3.6.5	Infektionsdosis und -zeitschema	36
3.6.6	Probenentnahme	37
3.6.6.1	Testzylinder	37
3.6.6.2	Eluat	37
3.6.7	Reihenverdünnungstest und Ausplattierung.....	37
3.6.8	Auszählung.....	38
3.7	Fluoreszenz-Mikroskopie (live/dead-Farbstoff)	38
3.7.1	Zemente	38
3.7.2	Keim	38
3.7.3	Versuchsansatz	38
3.7.4	Infektionsdosis	39
3.7.5	Ansatz des Farbstoffs	39
3.7.6	Methode.....	39
3.8	Rasterelektronenmikroskopie des Biofilms auf den Testzylindern.....	39
3.8.1	Zemente	39
3.8.2	Material	40
3.8.3	Herstellung der Ausgangslösungen.....	40
3.8.4	Herstellung der Fixierlösungen	40
3.8.5	Methode.....	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Kontinuierliche Elution	43
4.1.1	Refobacin Palacos R.....	44
4.1.2	VersaBond AB	45
4.1.3	VersaBond mit 2g Gentamicin	46
4.1.4	VersaBond mit 1g Clindamycin	47
4.1.5	VersaBond mit 2g Clindamycin.....	48

4.2	Statische Elution.....	49
4.2.1	Refobacin Palacos R.....	50
4.2.2	VersaBond AB	51
4.2.3	VersaBond mit 2g Gentamicin.....	52
4.2.4	VersaBond mit 1g Clindamycin.....	53
4.2.5	VersaBond mit 2g Clindamycin.....	54
4.3	Diffusionsversuche.....	55
4.3.1	Refobacin Palacos R (Biomet Merck).....	56
4.3.2	VersaBond AB (Smith & Nephew).....	57
4.3.3	Palacos mit Gentamicin (Schering).....	58
4.4	Bakterielles Wachstum im Grasso-Modell	59
4.5	Infektionsversuche (Teil 1)	60
4.6	Infektionsversuche (Teil 2)	62
4.6.1	Palacos R.....	62
4.6.2	Refobacin Palacos R.....	63
4.6.3	VersaBond.....	64
4.6.4	VersaBond AB	65
4.6.5	VersaBond mit 2g Gentamicin.....	66
4.7	Fluoreszenzmikroskopie.....	67
4.8	Rasterelektronenmikroskopie.....	69
5	Diskussion	74
5.1	Antibiotika-haltige Knochenzemente.....	74
5.1.1	Geschichtlicher Überblick.....	74
5.1.2	Eigenschaften	75
5.1.3	Gewebepenetration.....	76
5.1.4	Klinische Anwendungen	77
5.1.5	Arthroplastik.....	77
5.1.6	Risiken und Probleme	78
5.2	Diskussion der eigenen Ergebnisse.....	80
5.2.1	Freisetzungskinetiken.....	80
5.2.1.1	Kontinuierliche Freisetzung.....	80
5.2.1.2	Statische Freisetzung.....	81
5.2.2	Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung.....	81
5.2.2.1	Diffusionsversuche.....	81
5.2.2.2	Infektionsversuche	82
5.2.2.3	Fluoreszenzmikroskopie (live/dead-Farbstoff).....	82
5.2.2.4	Rasterelektronenmikroskopie.....	83
6	Zusammenfassung.....	84
7	Summary.....	87
8	Literaturverzeichnis.....	89
9	Anhang	93
	Danksagung.....	96
	Lebenslauf.....	97
	Erklärung.....	98

1 Einleitung und Problemstellung

Der Einsatz von Biomaterialien auf Basis unterschiedlicher Werkstoffe (Metalle [Stahl, Titan], Polyethylen, Polyester [Dacron], Polymethylmethacrylat [PMMA, Knochenzement]) ist in vielen Bereichen der Medizin nicht mehr wegzudenken. So werden diese Materialien zum Ersatz von Blutgefäßen, Herzklappen, als Stents und für Arthroplastiken (Hüfte, Knie, Schulter) verwendet.

Eine gefürchtete Komplikation bei Verwendung von Biomaterialien ist das Auftreten bakterieller Infektionen, sogenannter Biomaterial-assoziiertes (BAI) oder auch Polymer-assoziiertes Infektionen (PAI). Sie sind in vielen Fällen langwierig und schwer therapierbar, häufig bleibt als einziger Ausweg die Entfernung des Implantats. Nicht selten stirbt der Patient infolge einer Sepsis. Neben den sozialen sind auch die ökonomischen Konsequenzen enorm.

Die Mehrzahl (40-75%) dieser BAI wird von niedrig virulenten Koagulase-negativen Staphylokokken hervorgerufen, insbesondere durch *Staphylococcus epidermidis*. Man unterscheidet frühe und späte Infektionen. Frühe Infektionen sind häufig durch intraoperative Verunreinigungen mit nachfolgender sekundärer Wundheilung verursacht. Späte Infektionen werden meist durch passagere Bakteriämien hervorgerufen, die entweder spontan auftreten oder z.B. durch Endoskopien, invasive Maßnahmen und Operationen im Oropharyngeal- oder Urogenitalbereich, wie Zahnextraktionen und transurethrale Prostataresektionen, verursacht werden. Ursache können ebenfalls während der Operation eingebrachte Keime sein, die in der Umgebung des Biomaterials ruhend blieben und nach Monaten oder Jahren aktiviert wurden, wenn sich das Verhältnis zwischen Bakterien und körpereigener Abwehr zugunsten der Bakterien verändert.

Entscheidend für die Prävention Biomaterial-assoziiertes Infektionen sind eine optimale gewebeschonende chirurgische Technik, z.B. bei der Arthroplastik, und die Disziplin im OP-Saal. Eine weitere wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Prävention ist die perioperative intravenöse Antibiotikagabe. Darüber hinaus spielt die Verwendung Antibiotika-haltiger Zemente, wobei das Antibiotikum in das umgebende Gewebe diffundiert, hohe lokale Gewebsspiegel induziert und den Gesamtorganismus nicht übermäßig belastet, eine wesentliche Rolle.

Zur Zeit sind nur Knochenzemente handelsüblich, die als Antibiotikum Gentamicin (z.B. Refobacin Palacos R, Fa. Biomet Merck) enthalten. Eine neuere Entwicklung ist ein Zement,

der sowohl Gentamicin als auch Clindamycin enthält (Copal, Biomet Merck). Das Spektrum ätiologischer Erreger und die Zunahme der Antibiotika-Resistenzen bei den Bakterien, die hauptsächlich für Infektionen orthopädischer Implantate, aber auch für Osteomyelitiden verantwortlich sind, führten zu einem gestiegenen Interesse an effektiveren antimikrobiellen Substanzen zur Untermischung unter Knochenzemente auf PMMA-Basis.

Neben der handelsüblichen fixen Kombination (Refobacin Palacos R: 0,5g Gentamicin auf 40g Polymerpulver) werden bei nachgewiesenen Infektionen vom Chirurgen entsprechend der Empfindlichkeit der Erreger ausgewählte Antibiotika in flüssiger oder Pulverform von Hand zugemischt. Diese selbst hergestellten Mischungen sind jedoch inhomogen, da sich Antibiotika nur bei maschinellem Mischen homogen im Zementpulver verteilen.

Ziel ist, verschiedene Antibiotika als höher konzentrierte Vormischungen (Antibiotika in einer kleinen Menge Polymerpulver) herzustellen. Diese Vormischungen könnten in geeigneten Zementmischsystemen homogen in einer größeren Menge Zementpulver verteilt werden. Der Chirurg hätte damit die Möglichkeit, entsprechend dem Antibiogramm die geeignete homogene Mischung einzusetzen. Durch Zumischung von zwei Antibiotika-Polymer-Portionen könnte die Antibiotika-Dosis zusätzlich erhöht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein neuer Knochenzement (VersaBond, Smith & Nephew) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Gentamicin und Clindamycin *in vitro* untersucht. Als Vergleichszemente dienen die handelsüblichen Produkte Palacos R und Refobacin Palacos R (Biomet Merck).

Die Freisetzungskinetiken und die antimikrobielle Wirkung werden gegenüber zugegebenen Keimen bestimmt, die auf den Prüfzylindern haftenden Bakterien durch Beschallen abgelöst und semiquantitativ analysiert. Der auf den Zementplättchen haftende Biofilm ist von großer Wichtigkeit hinsichtlich Bakteriendichte und Anheftung vitaler oder toter Bakterien. Er wird mit Hilfe optischer Methoden dargestellt.

Die Knochenzemente werden statisch und kontinuierlich in einem nach GRASSO et al. (1978) modifizierten System eluiert und die freigesetzten Antibiotika-Konzentrationen in einem mikrobiologischen Verfahren (Bioassay) ermittelt.

Anschließend erfolgen in separaten Versuchsansätzen simulierte Infektionsversuche. Dabei wird der Biofilm auf den Prüfzylindern untersucht und mit Hilfe der Rasterelektronen- und Fluoreszenzmikroskopie dargestellt.

2 Die Biomaterial-assoziierte Infektion

2.1 Epidemiologie

Die Infektionsraten für Hüft- und Knie-Arthroplastiken betragen 0,5-1% bzw. 1-2%. Die meisten Infektionen ereignen sich in den ersten 5 Jahren nach Implantation, allerdings bilden Arthroplastiken ein Leben lang ein Risiko für Infektionen. Das Risiko steigt vermutlich beim Beginn des mechanischen Versagens. Folglich hängt die Ermittlung der Infektionsrate von der Dauer und Sorgfalt der Nachuntersuchungen und den Diagnosekriterien ab. Risikofaktoren sind verzögerte Wundheilung, rheumatoide Arthritis und Revisionsoperationen, da diese häufig lang dauern und kompliziert sind (BERENDT, 1999).

2.2 Pathogenese

Nach Implantation von Biomaterialien kommt es zu einem „race for the surface“, bei dem Zell- und Gewebsintegration und bakterielle Adhäsion zeitlich konkurrieren. Oberflächen, die von Bindegewebszellen besiedelt sind, können einer Infektion widerstehen. Entscheidend für die Ausbreitung einer Infektion, z.B. aufgrund einer Wundkontamination, sind die ersten zwei bis fünf Stunden. Während dieser Zeit werden die Keime durch die Immunzellen bekämpft. Hierbei wirken Antibiotika durch Reduktion der Keimzahl unterstützend. Nach dieser initialen Phase ist die Wirksamkeit der Antibiotika begrenzt (GRISTINA et al., 1989; KÖNIG et al., 1998).

2.2.1 Biofilm und Biofilm-Wirt-Wechselwirkung

Initial kommt es zur Adhäsion von Bakterien auf der Oberfläche der Biomaterialien. Dafür verantwortlich sind bakterielle Faktoren, Oberflächeneigenschaften der Implantate und Wirtsfaktoren.

Zu den bakteriellen Faktoren gehören elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, u.a. Van-der-Waals-Kräfte, zwischen den Keimen und der Oberfläche der Materialien (VAN DE BELT et al., 2001). Stärkere Hydrophobizität von *Staphylococcus epidermidis* geht mit stärkerer Adhäsion einher. Weiterhin wird die Adhäsion durch Kapsel-Polysaccharide und Fimbrien-ähnliche Oberflächenkomponenten der Erreger vermittelt.

Von der Wirtsseite her wird die Adhäsion von Bakterien durch Bestandteile aus Serum und Gewebsflüssigkeiten, wie z.B. Fibronectin, Fibrinogen, Kollagen, Vitronectin und Laminin, die das eingebrachte Biomaterial überziehen, gefördert.

Der zweite Schritt ist durch die Bildung extrazellulärer Schleimsubstanz (ESS) oder Exopolysaccharide (EPS) durch die Bakterien gekennzeichnet. Diese Glykokalix von *Staphylococcus epidermidis* besteht unter anderem aus Glycerolphosphat, D-Alanin, Glukose und N-Acetylglukosamin (KLOOS et al., 1994). Das Resultat ist ein Biofilm, der sowohl mono- als auch polymikrobiell sein kann (BERENDT, 1999; CHARACKLIS et al., 1990; COSTERTON et al., 1999; DONLAN, 2002; O’GARA et al., 2001).

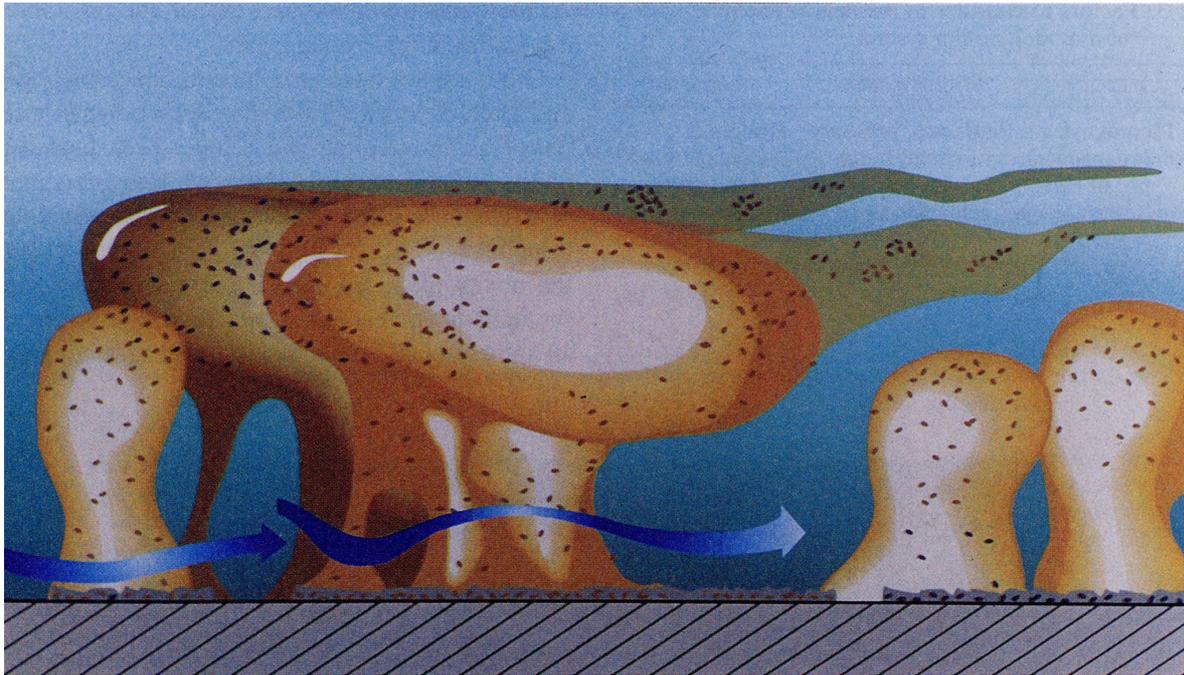


Abbildung 1. Biofilmstruktur (DONLAN et al., 2002)

Hat sich nun ein Biofilm auf einer Oberfläche gebildet, ist es schwer, ihn wieder zu entfernen. Der Biofilm stellt einen potentiellen Streuherd dar, der zu Sepsis, einer späteren Lockerung der Prothese und zur Zerstörung des Knochens im Rahmen einer Osteomyelitis führen kann.

In den Biofilm eingebettete Bakterien sind metabolisch weitgehend inaktiv und deshalb geringer empfindlich gegenüber Antibiotika, obwohl der Biofilm selbst von kleinen Kanälchen durchzogen ist und keineswegs eine undurchlässige Barriere für Antibiotika darstellt (COSTERTON, 1999; DONLAN et al., 2002) (siehe Abb. 1).

Der Biofilm von *Staphylococcus epidermidis* beeinträchtigt die körpereigene Abwehr. Die Proliferation peripherer mononukleärer Zellen, hauptsächlich T-Zellen, wird (via Prostaglandin E₂-Produktion stimulierter Monozyten) inhibiert. Ferner beeinflusst der Biofilm Opsonisierung und Phagozytose. Die Fähigkeit polymorphkerniger neutrophiler Leukozyten (PMNL), in Richtung eines chemotaktischen Stimulus zu wandern, wird gehemmt. Es kommt

zur Degranulation spezifischer Granula, die möglicherweise zu einer reduzierten intrazellulären Abtötung der Bakterien führt. Die Opsonisierung, ein wichtiger Schritt bei Phagozytose und Abtötung, wird inhibiert (KLOOS et al., 1994).

2.2.2 Wirt-Biomaterial-Wechselwirkung

Neben den beschriebenen Bakterien-Wirt-Wechselwirkungen gibt es auch Interaktionen zwischen Wirt und eingebrachtem Biomaterial, unabhängig von einer bakteriellen Besiedelung.

Polymorphkernige neutrophile Leukozyten sind Teil der körpereigenen Abwehr. Ihre Aufgabe besteht darin, eingedrungene Keime zu phagozytieren und abzutöten. Nach Aktivierung durch Bakterien, aber auch durch die Oberflächen implantierter Biomaterialien, produzieren sie mit Hilfe der Enzyme in ihren Zellmembranen sowie in ihren primären und sekundären Granula u.a. reaktive Stickstoff- und Sauerstoffintermediärprodukte und -radikale (RNI, ROI), hypochlorige Säure und Proteasen. Sie setzen antibakterielle Peptide frei, die als HNP (human neutrophil peptides) oder Defensine bekannt sind. Deren physiologische Aufgabe bei der antimikrobiellen Abwehr besteht darin, sich durch Aggregation in mikrobielle Zellmembranen einzubauen, Spannungs-abhängige Kanäle zu bilden und die Zellmembran zu durchlöchern. Experimentelle Arbeiten zeigten, dass Defensine, die aus Biomaterial-assoziierten PMNL freigesetzt wurden, ein ungünstiges Milieu für frisch einwandernde PMNL schaffen und deren Phagozytose beeinträchtigen (KAPLAN et al., 1999).

BOELENS et al. (2000) zeigten, daß Biomaterial eine Persistenz von wahrscheinlich replikationsfähigen *Staphylococcus epidermidis* in Makrophagen induziert. Vermutlich bilden Gewebsmakrophagen in der Umgebung von Biomaterialien eine Nische für *Staphylococcus epidermidis* und damit einen Herd für späte/spätere Infektionen.

Implantierte Biomaterialien begünstigen die Entwicklung postoperativer Infekte (BURRI, 1979). Die natürliche Resistenz von Knochen gegenüber Infektionen wird durch implantierte Biomaterialien um den Faktor 1000 reduziert (RÜTER et al., 1995). Die Schwellenkeimzahl/Infektionsdosis beträgt 10^8 Keime, um eine Infektion des gesunden Knochens hervorzurufen. Im Bereich implantierter Biomaterialien beträgt diese Zahl jedoch 10^5 Keime.

Knochenzement reduziert die für die Infektion erforderliche Schwellen-Keimzahl, indem nicht abgebundene, freie Rest-Monomere mit einigen Komplementfaktoren zusammen die Migrations- und Lebensfähigkeit der Leukozyten negativ beeinflussen.

Implantiertes Biomaterial ist immer dem Risiko einer bakteriellen Besiedlung und nachfolgenden Infektion ausgesetzt und bleibt damit lebenslang ein „locus minoris resistentiae“.

2.3 Pathologie

Haben sich Keime an der Oberfläche von Biomaterialien angesiedelt, folgt eine chronische Infektion mit hauptsächlich zwei pathologischen Merkmalen:

- um das Implantat entwickelt sich eine akut entzündliche Antwort mit allen Zeichen einer Infektion,
- die Aktivierung von Osteoklasten und Rekrutierung von Zellen, die von Monozyten abstammen, und Knochen-resorbierenden Zellen führen zu Knochenverlust an der Kontaktfläche zum Implantat.

Die normalerweise dünne Schicht eines schlecht oder gering vaskularisierten Bindegewebes zwischen Wirtsgewebe und Implantat oder dem das Implantat verankernden Knochenzement (generell von Chirurgen als „Membran“ oder „Interface“ bezeichnet) wird deutlich dicker und stärker vaskularisiert. Echtes Granulationsgewebe kann sich neben dem Implantat entwickeln, und schließlich kann sich sogar freier Eiter bilden. Bei Infektion eines Gelenkimplantats führen diese Prozesse zum septischen Verlust der Prothese als Folge einer chronischen Entzündungsreaktion auf abgesplitterte Teilchen von Knochenzement oder Polyethylen (Pfanne). Die chronische Entzündung mit mononukleären Zellen und Riesenzellen führt ebenfalls zur Knochenresorption. Hauptcharakteristikum der Implantatinfektion ist folglich die Anwesenheit eines akuten entzündlichen Infiltrates, das wiederum von einer chronischen Entzündung überlagert werden kann.

2.4 Mikrobiologie

Infektionen von Arthroplastiken werden in frühe, verzögerte und späte Infektionen eingeteilt (Tabelle 1).

Frühinfektion (bis 1 Monat postoperativ)	<i>Staphylococcus aureus</i> aerobe Gram-negative Keime Koagulase-negative Staphylokokken
Verzögerte Infektion (2 bis 12 Monate postoperativ)	Koagulase-negative Staphylokokken andere Hautkommensale
Spätinfektion einschließlich hämatogener Absiedelung (mehr als 12 Monate postoperativ)	Koagulase-negative Staphylokokken andere Hautkommensale <i>Staphylococcus aureus</i> aerobe Gram-negative Keime Anaerobier

Tabelle 1. Infektionen von Arthroplastiken: Zeitpunkt klinischer Manifestation und Spektrum ätiologischer Erreger

Frühe Infektionen manifestieren sich gewöhnlich (und beginnen häufig) als Wundinfektionen. Verursacht werden sie eher durch höher virulente Keime, die postoperative Hämatome und Verletzungen der Haut zur Invasion und Vermehrung nutzen können. *Staphylococcus aureus*, einschließlich Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), und aerobe Gram-negative Keime überwiegen.

Verzögerte Infektionen (2-12 Monate postoperativ) mit Schmerzen und Schwellungen in der Umgebung der verheilten Wunde werden häufiger durch Koagulase-negative Staphylokokken (CNS) und andere Hautkommensalen verursacht, die als Keime geringerer Virulenz längere Zeit benötigen, eine kritische Keimzahl zu erreichen und eine klinisch manifeste Infektion hervorzurufen.

Spätinfektionen, die mehr als 12 Monate postoperativ auftreten, werden in der Regel durch Gram-positive Hautkeime hervorgerufen, können aber auch infolge hämatogener Streuung bei Bakteriämie entstehen.

Unabhängig vom Zeitpunkt der Infektion sind Mischinfektionen nicht selten (etwa 20% der Fälle) mit unterschiedlichen Anteilen von aeroben Gram-negativen Keimen, anspruchsvollen Anaerobiern und Fäulen, bei denen angelegte Kulturen negativ sind.

Falsch-negative Kulturen können auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden: Vorgehende antimikrobielle Therapie kann die Keimlast unter die Nachweisgrenze der entsprechenden Tests senken. Ungenügende Probengewinnung (zu wenige Proben oder Abstriche statt Gewebeproben) führen zu negativen oder unbrauchbaren Ergebnissen. Seltener pathogene Erreger, wie *Mycoplasma* spp., Zellwand-defekte L-Formen, *Campylobacter* spp., *Mycobacterium tuberculosis* und atypische Mykobakterien, aber auch weitverbreitete Keime, die in geringer Zahl oder in nicht-kultivierbarem Zustand vorkommen, können bei Einsatz von Standard-Techniken nicht isoliert werden.

2.5 Klinische Symptomatik

Infektionen von Gelenkimplantaten sind fast immer mit Schmerzen verbunden, die zunächst gering, später in der Regel stark werden. „Infektionsschmerz“ unterscheidet sich von anderen Schmerzen, hat aber keine pathognomonische Charakteristik. Er tritt im allgemeinen auf, sobald die Infektion floride ist.

Die Schmerzen sind einerseits auf die Entzündung zurückzuführen, werden andererseits aber auch durch die Lockerung der Prothese verursacht. Charakteristisch für den Lockerungsschmerz ist, daß er initial stärker ist und mit zunehmendem Gebrauch des Gelenks nachläßt. Verschlimmert sich die Lockerung, wird die Benutzung des Gelenks oder Beins dauernd schmerzhaft, gefolgt von Nachtschmerz und Krämpfen.

Frühinfekte sind generell durch Fieber und Entzündung im Bereich der Operationsnarbe gekennzeichnet. Es kann zum Austritt von Eiter und zur Nahtinsuffizienz kommen mit Hautnekrosen, wenn höher virulente Erreger beteiligt sind. Selten kommt es zur Sepsis, die eher ein Zeichen des hämatogen entstandenen Spätinfekts ist. Wenn eine Infektion mit niedriger virulenten Keimen vorliegt, kann die Symptomatik weniger auffällig sein: man findet z.B. eine kontinuierliche Sekretion aus der Wunde bei sonst gutem Allgemeinzustand. In einem solchen Fall führt eine inadäquate Therapie zur Fistelbildung, die man öfter bei verzögerten oder Spätinfektionen sieht. Es ist nicht ungewöhnlich, daß Patienten über rezidivierende Wundinfektionen berichten, die immer nur mit kurzzeitigen Gaben oraler Antibiotika behandelt wurden, weil die zugrundeliegende tiefe Infektion übersehen wurde. Wird der Patient schließlich dem Spezialisten vorgestellt, hat sich das Implantat häufig schon

gelockert. Ein Teil verzögerter oder Spätinfektionen zeigt sich nur mit rascher Implantatlockerung ohne Zeichen lokaler oder systemischer Entzündung, obwohl die Patienten Schmerzen haben.

2.6 Diagnose

Die Diagnose einer Infektion erfordert klinischen Verdacht und zielgerichtete Untersuchungen. Wenn Wunden eitern, Hautentzündungen sich ausdehnen, ein Erythem andauert oder die Sekretion, auch von nur seröser Flüssigkeit, weiter bestehen bleibt, gilt das Implantat als infiziert bis zum Beweis des Gegenteils. Außer bei überzeugenden alternativen Erklärungen für die Symptomatik sollte jedes Implantat, das sich früh verschlechtert oder anhaltend schmerzhaft ist, als infiziert betrachtet werden. Von zentraler Bedeutung bei der Diagnosefindung ist die gründliche Untersuchung des Patienten, die vor einer antimikrobiellen Therapie durchgeführt werden sollte und den Allgemeinzustand des Patienten und die Weichteilverhältnisse berücksichtigt.

2.6.1 Frühinfektionen

Frühinfektionen gehen in der Regel mit Fieber, erhöhter Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), erhöhtem C-reaktivem Protein (CRP) und Leukozytose einher. Die Ausnahme bilden Frühinfektionen durch niedrig-virulente Keime oder mittels großzügiger Drainage entlastete Wunden, bei denen Fieber oft fehlt. Durch Blutkulturen kann eine Bakteriämie nachgewiesen werden. Bei der Sonographie der Implantate findet man Flüssigkeitsansammlungen oder Hämatome, die zu mikroskopischen und kulturellen Untersuchungen punktiert werden sollten. Bei Fieber unklarer Genese sollte eine Punktion des Gelenkraumes oder der Frakturregion erwogen werden. Röntgennativaufnahmen sind bei Frühinfektionen von geringem Nutzen, dienen aber zum Vergleich für nachfolgende Veränderungen (Verlaufskontrolle).

Mehrere, aus der Tiefe entnommene Gewebeprobe müssen für bakterielle Kulturen und histologische Untersuchungen entnommen werden; Tupferabstriche sind weniger geeignet, da die luftgefüllten Zwischenräume der Watte obligate Anaerobier töten; oberflächlich entnommenes Material, z.B. aus Fisteln, ist ebenfalls ungeeignet. Die Interpretation einer positiven Kultur aufgrund einer einzigen Keimart (auch aus der Tiefe) ist schwierig, wenn man einen Hautkeim angezchtet hat, der aus einer Verunreinigung stammen, aber auch der ätiologische Erreger sein kann. Noch schwieriger ist die Interpretation bei Isolaten von *Staphylococcus aureus* oder einem aeroben Gram-negativen Keim, weil sich die Hautflora im Krankenhaus und nach chirurgischen Eingriffen verändert haben kann. Findet man dagegen

den gleichen Keim in verschiedenen Proben, die auf unterschiedlichen Wegen gewonnen wurden, ist dies ein Befund mit hoher Aussagekraft.

2.6.2 Spätinfektionen

Allgemeinsymptome treten nur bei Patienten mit Bakteriämie und Abszessen auf. Leukozytenzahl, BSG und CRP können im Normbereich liegen. Röntgenativaufnahmen zeigen in der Regel eine Lockerung. Zusätzliche Zeichen, wie periostale Reaktionen und endostale Erosionen (bei intramedullären Implantaten), können auftreten.

Der klinische Befund ist bei der Interpretation der röntgenologischen Veränderungen auf Nativaufnahmen hilfreich, da die Infektionen im allgemeinen mit frühem Versagen und schneller Lockerung der Prothese verbunden sind. Bei Arthroplastiken können Arthrographien zusammen mit Punktion für Mikroskopie und Kultur wegweisend für die Beurteilung der Lockerung sein. Auf diese Weise kann auch eine Lockerung erfaßt werden, die auf Röntgenativaufnahmen nicht sichtbar ist. Falls der Schmerz durch Instillation von Lokalanästhetika sofort gelindert wird, muß die Prothese als wahrscheinlich gelockert beurteilt werden. Noch eingehendere bildgebende Verfahren führen nicht weiter. Mögliche Artefakte durch das Metall machen Untersuchungen mittels Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) meistens wertlos.

Molekularbiologische Verfahren unter Einsatz der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) zum Nachweis bakterieller DNA bieten den Vorzug der Schnelligkeit, sind aber nicht standardisiert und erlauben keine Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit. Sinnvoll ist die PCR bei dringendem Verdacht auf eine Infektion bei gleichzeitig negativer Kultur.

Die pathohistologische Untersuchung von Gewebeproben ist diagnostisch hilfreich. Der Nachweis neutrophiler Granulozyten ist ein Indikator für eine Infektion. Verschiedene Autoren haben unterschiedliche Grenzen für eine pathognomonische Zahl neutrophiler Granulozyten gesetzt, variierend zwischen 5 bis 1 Zelle pro Gesichtsfeld bei 800-1000facher Vergrößerung und Inspektion von mindestens 10 Feldern (BERENDT, 1999). Häufig findet man nur fokale histologische Veränderungen mit mehreren negativen Proben und anderen, die ohne Zweifel eine Infektion aufweisen. Diese Variabilität, die auch in tierexperimentellen Studien mit infizierten Gelenkprothesen bei Hunden beobachtet wurde, ist wahrscheinlich auf eine Infektion mit einer nur geringen Zahl von Bakterien in ungleichmäßiger Verteilung zurückzuführen (BERENDT, 1999). Gefrierschnitte können zur Diagnose während der

Operation beitragen, wobei wieder der Nachweis von Neutrophilen entscheidendes Kriterium ist (ATHANASOU et al., 1995; FELDMAN et al., 1997).

Findet man eine Fistel, ist die Diagnose einer Infektion klar. Fisteln können mit einer Mischflora, die sowohl aus Standortkeimen als auch aus pathogenen Erregern, einschließlich *Staphylococcus aureus*, aeroben Gram-negativen Stämmen, Enterokokken und Anaerobiern, bestehen kann, besiedelt sein. Abstriche aus Fistelgängen sind für die bakteriologische Untersuchung ungeeignet, außer ggf. mit dem Ziel der Infektionskontrolle, bei der nach Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) gefahndet wird.

Punktionen sind sinnvoll zur Gewinnung von Untersuchungsmaterial. Sensitivitäten und Spezifitäten variieren aber je nach Untersucher und sind wahrscheinlich bedingt durch unterschiedliche Punktionstechniken, Probenbehandlung und -verarbeitung sowie die Kriterien, die für die endgültige Diagnose einer Infektion verwendet werden.

Die definitive mikrobiologische Diagnostik erfordert eine Kultur aus periprothetischem Gewebe. Für eine optimale Diagnostik sollten tiefe Proben von unterschiedlichen Orten um das Implantat herum gewonnen und unverzüglich untersucht werden. Der Chirurg muß separate Instrumente verwenden, um eine Kreuz-Kontamination der Proben zu verhindern; die Weiterverarbeitung der Proben sollte unter einer Laminar-Flow-Bank erfolgen. Anreicherungsmedien sind indiziert. Die Diagnosekriterien einer Infektion, die auf der Untersuchung operativ gewonnener Proben basieren, sind nicht standardisiert. Eine prospektive Studie ergab, daß eine Infektion sicher dann diagnostiziert werden kann, wenn aus drei oder mehr Proben periprothetischen Gewebes identische Mikroorganismen angezüchtet werden. Die gleiche Studie empfiehlt 5 oder 6 Proben für ein Optimum an Sensitivität und Spezifität (ATKINS et al., 1998).

2.7 Therapie

2.7.1 Frühinfektionen

Sie sollten aus zwei Gründen als Notfälle betrachtet werden:

- die Infektion kann zu Bakteriämie und/oder zu Weichteilverlusten führen;
- Fälle von Frühinfektionen haben gute Langzeitergebnisse, wenn aggressives Débridement mit geeigneter systemischer und/oder lokaler antimikrobieller Therapie kombiniert wird, wohingegen Zuwarten nachweislich zu schlechteren Ergebnissen führt.

Folglich sollten Frühinfektionen durch sofortige Exploration/Revision, Débridement infizierten und avitalen Gewebes und Inspektion der Prothese behandelt werden. Wenn das Implantat intraoperativ fest verankert ist, wird nach Entnahme mehrerer Gewebeproben eine lokale Therapie entweder mit versenkter Antibiotika-Kette oder resorbierbarem Antibiotika-Vlies und Überlaufdrainage ohne Sog oder eine alleinige Spül-Saugdrainage während mindestens 3 bis 4 Wochen durchgeführt. Falls das Implantat gelockert ist, wird es entfernt. Nach Entnahme von Proben werden intravenöse Breitspektrum-Antibiotika mit Wirksamkeit auch gegen MRSA und Gram-negative Keime gegeben (kalkulierte Therapie). Eine Anpassung der antimikrobiellen Therapie erfolgt entsprechend dem kulturellen Ergebnis und der Empfindlichkeitstestung der Erreger (gezielte Therapie).

Die antibiotische Therapie sollte über 6 Wochen erfolgen (BERENDT, 1999). Eine ambulante Therapie erleichtert dies für alle Beteiligten (Patient/Chirurg) und ist ökonomisch sinnvoll. Es ist nicht bewiesen, ob eine darüber hinaus verlängerte Antibiotika-Gabe den Infektionsverlauf beeinflusst. Wenn man sich für die Langzeitbehandlung mit Antibiotika entscheidet, z.B. wenn die chirurgische Revision ein zu hohes Risiko birgt, benötigen die Patienten eine sorgfältige Überwachung hinsichtlich potentieller Allergien und anderer unerwünschter Nebenwirkungen. Ein ähnliches Vorgehen wird bei hämatogener Absiedlung empfohlen.

Entscheidend für ein gutes Ergebnis sind folgende Punkte:

- Durchführen eines sorgfältigen Débridements so früh wie möglich nach Beginn der Infektion;
- Infektion durch einen sensitiven Keim (schlechtere Ergebnisse werden bei *Staphylococcus aureus* und aeroben Gram-negativen Keimen gesehen);
- keine Fisteln;
- einwandfrei fixierte Prothese.

Kommt es zur Wunddehiszenz/Nahtinsuffizienz, erfordert die Rettung des Implantats die sorgfältige Wiederherstellung intakter Weichteilverhältnisse, um einer sekundären Besiedlung mit resistenten Keimen vorzubeugen. Zur Deckung großer Defekte kann plastische Chirurgie mit freien oder gestielten Lappen notwendig werden, die den Totraum, der durch das Débridement entstanden ist, verschließt und den systemisch applizierten Antibiotika ermöglicht, den Ort der Infektion zu erreichen.

Bei allen Frühinfektionen werden randomisierte Studien benötigt, um die Frage zu klären, ob die Langzeit-Antibiotika-Therapie die Ergebnisse verbessert, und wenn ja, zu welchem Preis. Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß die Identifizierung von Untergruppen, die eine sofortige

Revision benötigen, einigen Patienten eine lange und ineffektive Behandlung zur versuchten Rettung der Prothese erspart (BERENDT, 1999).

2.7.2 Spätinfektionen

2.7.2.1 Exzisionsarthroplastik

Wenn sich eine Prothese gelockert hat, wird eine Revision zwingend notwendig. Die Exzisionsarthroplastik stellt eine einfache Möglichkeit mit hoher Heilungsrate dar. Voraussetzung ist jedoch das radikale Débridement von sämtlichen Zementresten und nekrotischem Gewebe. Die Gridstone-Arthroplastik weist im Vergleich zur Prothesenimplantation eine wesentlich schlechtere Funktion mit Beinverkürzung, der Notwendigkeit des Schuhausgleichs (bis zu 6 Zentimetern) und des Führens einer Unterarmgehstütze (Fritzstock) auf. Im Bereich des Kniegelenks muß man die Exzisionsarthroplastik als Ausnahmesituation betrachten, da sie zu einem Schlottergelenk führt, das eine externe Gelenkschienung erfordert.

In bestimmten Fällen, in denen begrenzte Anforderungen an das Bein gestellt werden und schlechte Knochensubstanz eine Reimplantation oder Arthrodeese wenig erfolgversprechend erscheinen läßt, kann eine Exzisionsarthroplastik immer noch einer Oberschenkelamputation vorzuziehen sein. In der Hüfte stellt die Exzisionsarthroplastik eine Möglichkeit für die Fälle dar, in denen eine Rekonstruktion technisch nicht realisierbar ist oder ein inakzeptables Risiko für eine Re-Infektion, höhere Morbidität oder sogar Tod des Patienten birgt.

2.7.2.2 Einzeitiger Wechsel

Beim einzeitigen Verfahren folgt der Exzision die unmittelbar anschließende Reimplantation. Obwohl auch hier systemische Antibiotika gegeben werden können, verläßt man sich meist auf sorgfältiges Débridement und die Verwendung von Knochenzement, dem Antibiotika entsprechend der vorangegangenen Keimbestimmung und Empfindlichkeitstestung beigemischt werden.

Die Vorteile für Patienten mit erfolgreich durchgeführtem einzeitigem Wechsel sind erheblich (raschere Genesung aufgrund kürzerer Immobilisation), so daß diese Methode alle Bemühungen rechtfertigt, ihren Erfolg zu verbessern. Die publizierten Erfolgsraten variieren, abhängig von der Erfahrung des Chirurgen und der Vollständigkeit der Nachuntersuchungen; aber in den zuverlässigsten Untersuchungen zeigen etwa 80-85% der behandelten Implantate keine Zeichen eines Rezidivs (BUCHHOLZ et al., 1981; RAUT et al., 1995).

Ein einzeitiger Wechsel kommt für Patienten in Betracht, bei denen ein stufenweises Vorgehen zu hohe Narkoserisiken birgt und bei denen ein hochsensitiver Erreger gesichert ist. Er ist selten erfolgreich bei Infektionen mit resistenten Bakterien.

2.7.2.3 Zweizeitiger Wechsel

Beim zweizeitigen Wechsel wird eine Exzisionsarthroplastik mit einer intensiven antimikrobiellen Therapie, häufig über 6-12 Wochen, kombiniert, gefolgt von einer Reimplantation einer neuen Prothese. Antibiotika können systemisch (i.v. oder oral) oder lokal mit Antibiotika-haltigem Knochenzement verabreicht werden. Aus technischen Gründen werden Antibiotika-haltige Knochenzement-Spacer gewöhnlich im Knie verwendet, um die Beinlänge zu erhalten und eine Gewichtsbelastung zu erlauben. Sie werden seltener zur Behandlung infizierter Hüften verwendet, um die Funktion einer Gridlestone-Pseudarthrose zu verbessern, solange der Patient auf die Reimplantation wartet.

Die lokale Freisetzung von Antibiotika bietet Vorteile für Patienten und Chirurgen, da die Nebenwirkungen einer systemischen Therapie nicht berücksichtigt werden müssen. Es ist allerdings nötig, die Erreger und ihre Empfindlichkeit vor dem operativen Eingriff zu kennen, was zusätzliche diagnostische Maßnahmen erfordert.

Die Erfolgsraten des zweizeitigen Wechsels von Hüft- und Knieendoprothesen scheinen höher zu sein (90% und mehr) als beim einzeitigen Wechsel; allerdings beruhen die Daten nicht auf vergleichenden und randomisierten Studien (BERENDT, 1999).

2.7.2.4 Arthrodesse und Amputation

Die Qualität des Knochens am distalen Femur und der proximalen Tibia oder die Weichteilverhältnisse (einschließlich der Extensoren-Funktion) können den Versuch einer Reimplantation einer funktionierenden Knieendoprothese verhindern. In diesen Situationen besteht die Möglichkeit der externen Stützung, der Arthrodesse oder der Oberschenkelamputation (HANSSEN et al., 1995). Ein Teil der Fälle führt zu unbefriedigenden Ergebnissen. Dieser Anteil steigt, wenn das gewechselte Implantat sich wiederum infiziert. Deshalb sollte dieses Risiko eingehend mit dem Patienten erörtert werden, bevor mit einer Knierevision begonnen wird (HANSSEN et al., 1995).

2.7.2.5 Suppressionstherapie

Für eine kleine Gruppe von Patienten (Schwerkranke mit hohem Narkose- und Operationsrisiko, Patienten mit offenkundigen Infektionen [Fisteln/Frühinfekten], aber

schmerzfrei und mit fixierter Prothese) sind das Streben nach radikaler Heilung und die Chirurgie, die dafür erforderlich ist, nicht angebracht. Solche Fälle können für eine Langzeit-Antibiotika-Suppression geeignet sein, besonders wenn die Infektion durch Keime hervorgerufen wird, die gegenüber sicher anwendbaren und gut verträglichen Antibiotika empfindlich sind. Unter diesem Gesichtspunkt ist beachtlich, daß eine Kombination von Fluorochinolonen mit Rifampicin gute bakterizide Aktivität in Abszessen, auf intrazelluläre Erreger und in experimentellen Modellen von Biofilmen oder infizierten Biomaterialien aufweist. Es gibt ermutigende Berichte über die Anwendung dieser antimikrobiellen Kombination als unterstützende Maßnahme bei der Behandlung von Infektionen orthopädischer Implantate (DRANCOURT et al., 1993; WIDMER et al., 1992).

2.8 Präventionsmöglichkeiten

2.8.1 Allgemeine Maßnahmen

Die Prävention orthopädischer Infektionen hängt in erster Linie von guter chirurgischer Technik und Disziplin im OP-Saal ab. Das Hin- und Herlaufen des OP-Personals sollte auf ein Minimum beschränkt werden. Besondere Aufmerksamkeit sollte der Hautvorbereitung, sterilem Arbeiten und der Weichteilpräparation zukommen. Diathermie sollte zurückhaltend eingesetzt, Totraum und Weichteilschäden minimiert und die OP-Zeit möglichst kurz gehalten werden. Ultrareine Luft im OP-Saal reduziert die Infektionsrate, ebenso prophylaktische Antibiotika-Gaben.

In einigen Kliniken werden für Arthroplastiken Zelt-ähnliche Aufbauten verwendet, um das OP-Feld vom übrigen OP-Saal abzuschirmen.

2.8.2 Intravenöse Antibiotikagaben

In vielen Kliniken werden perioperativ 1-3 Gaben eines Cephalosporins der 1. oder 2. Generation verwendet; dort, wo MRSA endemisch sind, ist eine Prophylaxe mit Glykopeptiden (Vancomycin) notwendig. Bei längeren OP-Zeiten oder größerem Blutverlust werden die Dosen wiederholt gegeben, um wirksame Antibiotikaspiegel während der OP-Zeit aufrechtzuerhalten. Es gibt nur unzureichende Hinweise, daß eine dreimalige prophylaktische Antibiotika-Gabe der einmaligen überlegen ist (BERENDT, 1999).

2.8.3 Spätprophylaxe

Das Risiko einer hämatogenen Infektion der Arthroplastik muß bei allen Eingriffen beachtet werden, bei denen eine vorübergehende Bakteriämie auftreten kann, z.B. bei

Zahnbehandlung, Broncho- und Koloskopie sowie urogenitalen Operationen. Das Risiko ist unklar. Doch ist bei sorgfältiger Risiko-Nutzen-Analyse die Antibiotika-Prophylaxe nicht bei allen Patienten mit Arthroplastik erforderlich. Patienten, die eine neu implantierte Arthroplastik besitzen oder bereits eine Prothese aufgrund einer Infektion verloren haben oder bei denen eine eitrige Infektion im Körper besteht, tragen ein hohes Risiko (BERENDT, 1999; HANSEN et al., 1999). In diesen Situationen erscheint eine antibiotische Prophylaxe nach einem Schema indiziert, das dem der Prävention einer bakteriellen Endokarditis gleicht (BERENDT, 1999). Ebenso sollten zur Infektionsverhütung bereits implantierter Gelenkprothesen bakterielle Infektionen jeglicher Art frühzeitig therapiert werden (SIMON et al., 1997).

2.8.4 Antibiotika-haltige Zemente

Es ergibt sich folgerichtig, daß neben sorgfältiger Hygiene und guter chirurgischer Technik der Applikation von Antibiotika-haltigem Knochenzement in der Prophylaxe und Behandlung chirurgischer Infektionen ein hoher Stellenwert zukommt, da die systemischen Nebenwirkungen des lokalen Einsatzes von Antibiotika im Vergleich zur systemischen Gabe gering sind. Im Kapitel „Diskussion“ soll der Antibiotika-haltige Knochenzement genauer betrachtet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeine Materialien (Prüfzylinder, Grasso-Modell)

3.1.1 Prüfzylinder

3.1.1.1 Zemente

VersaBond und Palacos wurden je für sich oder mit den Antibiotika im Vakuummischsystem Optivac (100mbar, 22°C) gemischt, um Größe und Anzahl von Lufteinschlüssen in der Zementmatrix zu minimieren und die Festigkeit des Knochenzements zu erhöhen. Dieses Verfahren ist Standard der Zementiertechnik. Nach der dritten Minute wurde das Polymerisat mit Hilfe einer Zementspritzpistole mit einem kurzen Schnorchel in eine Metallform (Chrom-Vanadium-Stahl, 3 mm stark, mit zwölf, 15 mm großen Bohrungen) gefüllt, der überschüssige Zement mit der rauhen Seite einer Polyethylenfolie (Inkjet-Folie) abgedrückt und die Prüfzylinder nach vollständigem Aushärten der Form entnommen. Die gesamte Ruhezeit der Prüfkörper vor ihrer weiteren Verwendung betrug mindestens 24 Stunden bei Zimmertemperatur (22°C).

3.1.1.2 Maße und Gewichte

Ein Prüfzylinder hatte einen Durchmesser von 15 mm und eine Höhe von 3 mm. Nach der Formel zur Berechnung der Oberfläche von Zylindern ($A = 2\pi r^2 + 2\pi rh$) betrug die Oberfläche $A = 494,80 \text{ mm}^2$. Nach der Formel zur Berechnung des Volumens von Zylindern ($V=2\pi r^2h$) betrug das Volumen $V=530,14 \text{ mm}^3$.

Mit Hilfe einer Waage (Waage AE 240, Fa. Mettler Toledo) wurde das Gewicht der Prüfzylinder bestimmt. Es betrug bei

VersaBond 0,70g,

VersaBond AB 0,69g,

VersaBond mit 2g Gentamicin 0,69g,

VersaBond mit 1g Clindamycin 0,71g,

VersaBond mit 2g Clindamycin 0,71g,

Palacos R 0,71g,

Refobacin Palacos R 0,73g.

3.1.1.3 Antibiotika

Gentamicin als Gentamicinsulfat, Charge: 95051, Exp.: 7/99, Aktivität: 625µg/mg (Fa. Fuzhou Antibiotics, Fuzhou, China).

Clindamycin als Clindamycin HCl, Charge S510062, Exp.: 10/98, Aktivität: 83,5% (Fa. Pharma Resources, Ahrensburg).

Die dem Polymerpulver zugesetzten Antibiotikummengen beziehen sich auf den aktiven Anteil.

3.1.1.4 Antibiotikumdosis im Knochenzement

jeweils zudosiert zu einer Pulverpackung von 42,3g:

VersaBond AB (1g Gentamicin), entspricht 1,6g Gentamicinsulfat/43,9g Polymer

VersaBond mit 2g Gentamicin, entspricht 3,2g Gentamicinsulfat/45,5g Polymer

VersaBond mit 1g Clindamycin, entspricht 1,2g Clindamycin HCl/43,5g Polymer

VersaBond mit 2g Clindamycin, entspricht 2,4g Clindamycin HCl/44,7g Polymer

Refobacin Palacos R (0,5g Gentamicin) Ch.: 8759

3.1.2 Grasso-Modell

Die kontinuierliche Elution erfolgte in einem modifizierten Modell nach Grasso et al. (1978). Dieses Modell (Abb. 2) simuliert Verhältnisse im Menschen, wo Gewebsflüssigkeit kontinuierlich Antibiotika aus dem Zement eluiert und lymphogen und hämatogen abtransportiert. Die lokale Antibiotikakonzentration nimmt ab.

3.1.2.1 Material

IPC 16 Mehrkanal Peristaltikpumpe (Fa. ISMATEC)

Pumpschläuche (Silikon) mit 2 Stoppfern für Zu- und Abfluß

Zufluß: Innendurchmesser 0,64mm (ISMATEC Bestellnummer SC0092)

Abfluß: Innendurchmesser 1,02mm (ISMATEC Bestellnummer SC0095)

Schlauch (Masterflex 96400-13) mit Schlauchverbinder aus Polypropylen

Wasserbad BA 9 (IKA), gefüllt mit entionisiertem H₂O

Einhängethermostat EH 3 basic (IKA)

Magnetrührer IKAMAG EOA 9 mit Netz- und Steuergerät ES 5

Lab ISO Flaschen, 100ml, 2 seitliche schräge Verschraubungen zum Klemmen von Glaskapillaren (SCHOTT)

Star-Head, Magnetrührer (Katalog-Nummer 6600-0010, NALGE)

Glaskapillaren (Einmal-Mikropipetten mit Ringmarke, 100µl, Fa. BRAND)

3.1.2.2 Versuchsanordnung

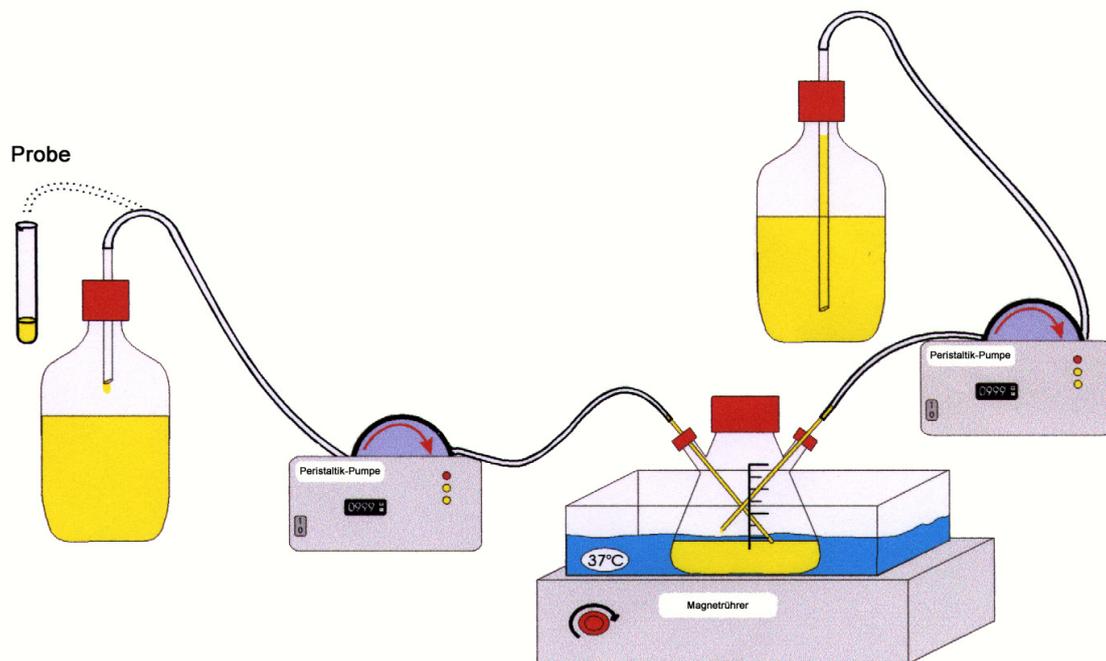


Abbildung 2. Modell zur kontinuierlichen Elution, modifiziert nach GRASSO et al. (1978)

3.1.2.3 Allgemeine Einstellungen

Die Flüssigkeitsmenge im Inkubationsgefäß betrug konstant 20 ml. Zu- und abführende Kapillaren wurden so justiert, daß das Volumen im Kolben konstant blieb. Die Peristaltikpumpe lief mit einer Leistung von 9%. Die Förderrate von Zu- und Ablauf betrug 10 ml pro Stunde. Bei dieser Einstellung resultierte eine Halbwertszeit von etwa einer Stunde. Die Inkubationsgefäße standen in einem auf 37°C erwärmten Wasserbad auf markierten Stellflächen des Magnetrührers.

3.2 Freisetzungskinetiken

3.2.1 Bestimmung der Freisetzungskinetik mittels kontinuierlicher Elution

3.2.1.1 Versuchsaufbau

Als Elutionsmedium diente Ringerlösung. Für die Elutionsversuche wurden 6 Inkubationsgefäße parallel mit einem Prüfzylinder eines Zementes, 20 ml steriler Ringerlösung und einem Magnetrührer beschickt.

3.2.1.2 Probenentnahme

Die Sammlung der Proben in verschließbaren Gefäßen aus dem ablaufenden Schlauch eines jeden Kolbens erfolgte während 10 Minuten zu folgenden Zeiten:

0.25-0.35h, 0.55-1.05h, 1.55-2.05h, 2.55-3.05h,
3.55h-4.05h, 5.55-6.05h, 7.55-8.05h, 9.55-10.05h,
24h.

Die innerhalb von 10 Minuten gesammelte Probenmenge ergab etwa 1,6 ml. Die Aufbewahrung der Proben bis zur mikrobiologischen Analyse erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

3.2.2 Bestimmung der Freisetzungskinetik mittels statischer Elution

3.2.2.1 Material

hohe Reagenzgläser (SCHOTT) mit Alukappe, steril

Ringerlösung, steril

lange Pinzette, steril

3.2.2.2 Methode

Die sterilen Reagenzgläser enthielten jeweils 2 ml Ringerlösung; damit waren die Prüfzylinder ausreichend mit Lösung bedeckt. Alukappen und Reagenzglasöffnungen wurden kurz zur Sterilitätserhaltung bei jedem Öffnen abgeflämmt.

Zur Elution wurden 3 Reagenzgläser mit je einem Prüfzylinder im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Der Wechsel des Elutionsmediums fand zu folgenden Zeiten (analog zur kontinuierlichen Elution) statt:

0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 10h, 24h.

Die Clindamycin-haltigen Knochenzemente wurden über 72h eluiert (zusätzliche Wechsel des Mediums nach 48h und 72h).

Nach Entnahme aus dem Reagenzglas mit einer langen Pinzette wurde der Prüfzylinder in ein neues Reagenzglas mit 2ml Ringerlösung überführt. Die Aufbewahrung des Eluats in einem verschließbaren Probenröhrchen bis zur mikrobiologischen Analyse erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung mittels Bioassay

Zur Bestimmung der Antibiotika-Konzentrationen in den entnommenen Proben der kontinuierlichen und statischen Elution diente ein Agardiffusionstest.

3.2.3.1 Agardiffusionstest

Beim Standardverfahren des Agardiffusionstests diffundiert das in ausgestanzte Löcher gefüllte Antibiotikum in den umgebenden Agar. Die Diffusionsstrecke weist ein Konzentrationsgefälle auf. Dadurch wird ein Grenzwert überschritten, bis zu dem das Wachstum der Keime gehemmt wird. Es entsteht ein Hemmhof. Der Hemmhofdurchmesser korreliert mit der Konzentration, der Sensibilität des Testkeims und der Diffusionsgeschwindigkeit des Antibiotikums (große Moleküle diffundieren langsamer, daher in der Regel auch kleinere Hemmhöfe).

In der vorliegenden Arbeit diente ein Bildanalysengerät zur Messung der Hemmhofdurchmesser. Um eine Eichkurve zu erstellen, wurden die Durchmesser der Hemmhöfe bei bekannter Antibiotika-Konzentration im halblogarithmischen Raster ($\emptyset \log_{10}$) gegen die Konzentrationen aufgetragen, die Regressionsgerade berechnet und unbekannte Konzentrationen der Elutionslösungen an der Regressionsgeraden abgelesen. Jede Probe, jede Standardverdünnung und jeder Referenzwert wurden in ausgestanzte Löcher auf zwei Agarplatten jeweils dreifach gefüllt (doppelte Dreifachbestimmung).

3.2.3.2 Material

Antibiotika-Agar Nr. 5 (MERCK)

Metallrahmen mit Glasplatten und Deckel, 23,5 x 23,5 cm, 2 Platten, unsteril, für Testplatten

Korkbohrer, 8 mm (vor Gebrauch abflämmen), mit Lochschablone

automatisches Pipettiergerät Microlab 1000⁺ (HAMILTON)

Brutschrank (Mettler)

Ablesegerät BIOEYE (ISRA, Darmstadt)

Rechner, PC, IBM kompatibel

Drucker

Meßtisch (Hahn + Kolb)

Autoklav Varioklav 500 (H + P Labortechnik AG)

Desinfektor Spülmaschine (Miele)

Glaspipetten

Pipetten (Eppendorf)

3.2.3.3 Plattenherstellung

Der auf pH 8,0 eingestellte, in Glasflaschen autoklavierte Agar wurde bei 100°C im Wasserbad verflüssigt und wieder auf 60°C abgekühlt. Die Ränder der Metallrahmen wurden mit jeweils 10ml unbeimpftem Agar ausgegossen.

Als Testkeim für die Konzentrationsbestimmung der Gentamicin-haltigen Proben diente der Sporenbildner *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Nach Zugabe von 150µl einer Suspension von *Bacillus subtilis* betrug die Konzentration der Bakterien ca. 10^6 KBE/ml Gießagar.

Als Testkeim für die Konzentrationsbestimmung der Clindamycin-haltigen Proben fand *Sarcina lutea* (ATCC 9341) Verwendung. Nach Zugabe von 15ml einer 18h-Kultur (durchgewachsen, trüb) von *Sarcina lutea* betrug die Konzentration der Bakterien ca. 10^6 KBE/ml Gießagar.

Das Ausgießen der auf einem waagrecht ausgerichteten Meßtisch liegenden Platten erfolgte mit jeweils 100 ml flüssigen Gießagars. Nach dem Erstarren des Agars wurden mit Hilfe einer Schablone 36 Löcher mit einem Korkbohrer ausgestanzt und die Agarzylinder mit einer kleinen Lanzette ausgehoben.

3.2.3.4 Beschicken der Platten

Zur Herstellung der Standardverdünnungsreihen und des Referenzwertes wurde eine Lösung des jeweiligen Antibiotikums (Konzentration 100µg/ml) angesetzt und dann mit Hilfe eines Pipettiergerätes verdünnt.

Die Konzentrationen der Standardverdünnung für die Gentamicin-Bestimmung betragen 5µg/ml, 2,5µg/ml, 1,25µg/ml, 0,625µg/ml, 0,3125µg/ml (Verdünnungsfaktor 2), die Konzentration des Referenzwertes 1,25µg/ml.

Die Konzentrationen der Standardverdünnung für die Clindamycin-Bestimmung betragen 4µg/ml, 2,5µg/ml, 1,56µg/ml, 0,98µg/ml, 0,61µg/ml (Verdünnungsfaktor 1,6), die Konzentration des Referenzwertes 1,56µg/ml.

Für die Konzentrationsbestimmungen der Proben wurden die Konzentrationsbereiche in einem Vortest ermittelt, um sicherzustellen, daß alle zu testenden Proben im linearen Bereich der Standardkurve lagen oder durch entsprechende Verdünnungen in Ringerlösung in diesen Konzentrationsbereich gebracht werden konnten.

Nach einem randomisierten Schema wurden jeweils 2 Platten parallel beschickt und jede Probe, jede Standardkonzentration und jeder Referenzwert auf jede Platte dreimal aufgetropft.

Bei Bestimmung des bakterizid wirkenden Gentamicins war eine Vordiffusion nicht nötig. Im Gegensatz dazu mußten die Platten bei den Clindamycin-Bestimmungen zur Vordiffusion während zwei Stunden im Kühlschrank gelagert werden, um die Diffusion des bakteriostatisch wirkenden Clindamycins zu ermöglichen, bevor die Bakterien replizieren. Die Inkubation der Platten erfolgte anschließend bei 37°C im Brutschrank während 18 Stunden.

Mit Hilfe des Bildanalysengerätes BIOEYE ISRA und der zugehörigen Software konnten die Platten ausgewertet und die Hemmhofdurchmesser vollautomatisch gemessen werden. Anschließend gab der Computer die jeweils errechnete Konzentration mit Standardabweichung und die dazugehörigen 6 Einzelwerte auf einem Meßprotokoll aus (*Beispiel siehe Anhang*). Außerdem konnte die Standardkurve mit den Einzelwerten ausgedruckt und bewertet werden (*Beispiel siehe Anhang*). Die Analyse der Ergebnisse, die Ausgabe des Mittelwertes (mean) und der Standardabweichung (sd) erfolgten mit dem Programm Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., Northampton).

3.3 Diffusionsversuche

Ziel dieses Versuchsansatzes war ein Vergleich dreier Zemente hinsichtlich der Antibiotikafreisetzung auf beimpften Agarplatten. Die sich bildenden Hemmhöfe sollten ausgemessen werden.

3.3.1 Material

Prüfzylinder mit o.g. Maßen aus

VersaBond AB (Smith & Nephew)

Refobacin Palacos R (Merck)

Palacos R mit Gentamicin (Schering)

Mueller-Hinton-Agar (spezieller Agar zur Sensibilitäts- bzw. Resistenzbestimmung) in Petrischalen

3.3.2 Keime

Testkeime waren je 3 *Staphylococcus aureus*- und *Staphylococcus epidermidis*-Stämme. Die *Staphylococcus aureus*-Stämme 1 und 2 waren aus Material chirurgischer Infektionen am Universitätsklinikum Gießen isoliert worden, während *Staphylococcus aureus*-Stamm 3 und die *Staphylococcus epidermidis*-Stämme 1, 2 und 3 aus Material chirurgischer Infektionen aus der Orthopädischen Universitätsklinik Frankfurt stammten (Dr. Schäfer, Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Frankfurt).

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit der Keime gegenüber Gentamicin und Clindamycin (minimale Hemmkonzentration, MHK) diente der E-Test (AB BIODISK)[siehe Tab. 2].

	MHK für Gentamicin	MHK für Clindamycin
<i>S. aureus</i> Stamm 1	0,094-0,125	0,064-0,094
<i>S. aureus</i> Stamm 2	0,094-0,125	0,064-0,094
<i>S. aureus</i> Stamm 3	0,125-0,19	0,064-0,094
<i>S. epidermidis</i> Stamm 1	0,016	0,032-0,047
<i>S. epidermidis</i> Stamm 2	<0,016	0,023-0,032
<i>S. epidermidis</i> Stamm 3	0,023	0,023-0,032

Tabelle 2. Minimale Hemmkonzentration der untersuchten Staphylokokken-Stämme (Angabe in µg/ml)

3.3.3 Methode

Von Bakterienkulturen oben genannter Stämme wurden nach 24stündiger Inkubation bei 37°C aliquote Teile in sterile TSB in Reagenzgläsern überimpft, so daß ein McFarland Standard von etwa 0,5 resultierte. Das Aufbringen eines Tropfens dieser Suspension auf Mueller-Hinton-Agar mit anschließendem gleichmäßigem Ausstreichen mit einem Glasstab ergab einen Bakterienrasen mit einzelstehenden Kolonien.

Jeweils in die Mitte einer Agarplatte wurde ein Prüfzylinder aufgelegt, die Platte für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend der Prüfzylinder auf eine frisch beimpfte Agarplatte transferiert (Tag 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20).

Die Hemmhofdurchmesser, die sich nach Diffusion und Bebrütung gebildet hatten, wurden mit einem Lineal ausgemessen und im Programm Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., Northampton) ausgewertet und graphisch dargestellt.

3.4 Wachstumskinetik im Grasso-Modell

Mit diesem Versuch sollte die Wachstumskinetik von Bakterien im Grasso-Modell ohne Zemente untersucht werden.

3.4.1 Versuchsansatz

Nährmedium war Tryptic-Soya-Broth (TSB, Merck). Zwei Inkubationsgefäße wurden im Grasso-Modell plaziert. Die Geräteeinstellung war analog den Einstellungen im Versuchsteil „Kontinuierliche Elution“.

3.4.2 Keim

Um die Wachstumskinetik des *Staphylococcus epidermidis*-Stamms 3 zu bestimmen, wurde ein 100ml-Kolben steriler TSB mit 5 Einzelkolonien beimpft und bei 37°C über 24h inkubiert. Danach wies die Kultur eine Keimzahl von ca. 10^7 - 10^8 Keimen/ml auf.

3.4.3 Probenentnahme

Nach Entnahme mit einer Mikroliterpipette von je 1 ml aus den Inkubationsgefäßen zu den Zeiten 0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 10h und 24h wurde die Bakteriensuspension in ein steriles Reagenzglas (Reagenzglas Nr. 0) überführt (Konzentration 1: $10^0 = 1:1$) und fortlaufend verdünnt (Reihenverdünnung).

3.4.4 Reihenverdünnung und Ausplattierung

10 kleine Reagenzgläser mit Korkstopfen wurden mit je 1,8ml steriler TSB beschickt, anschließend mittels einer Mikroliterpipette 200µl aus Reagenzglas Nr. 0 (vorher kurz aufgeschüttelt) in Reagenzglas Nr. 1 überführt (→ Konzentration 1: $10^1 = 1: 10$), Reagenzglas Nr. 1 wiederum kurz aufgeschüttelt, 200µl entnommen, in Reagenzglas Nr. 2 überführt (Konzentration 1: $10^2 = 1: 100$) und die Verdünnung bis 1: 10^{10} (= 1: 10 Milliarden) fortgeführt.

Nach kurzem Aufschütteln des Reagenzröhrchens wurden jeweils 100µl der verdünnten Bakteriensuspensionen mittels Mikroliterpipette aufgenommen, auf CLED-Agar getropft und

mittels Glasstab auf der gesamten Platte homogen verteilt. Die Inkubation der Agar-Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank über 24-48h.

3.4.5 Auszählung

Nach der Bebrütung stellten sich die Staphylokokken als gelbe Kolonien dar. Die Ermittlung der Keimzahl erfolgte durch Auszählen und Berechnung des Mittelwertes pro ml TSB, die Auswertung der Ergebnisse und die graphische Darstellung von Mittelwert (mean) und Standardabweichung (sd) im Programm Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., Northampton)

3.5 Infektionsversuche (Teil 1)

Ziel dieses Versuchsansatzes war die Simulation einer Kontamination zum Zeitpunkt der Operation ($t=0h$). Dabei sollte untersucht werden, ob nach einmaliger Inokulation ein Wachstum von Bakterien nach 24h (48h) im Inkubationsgefäß und auf der Plättchenoberfläche als Biofilm nachgewiesen werden konnte.

3.5.1 Material

Tryptic-Soya-Broth (TSB), steril (MERCK)

Ringerlösung

Reagenzgläser (DURAN, Schott, Außendurchmesser 20mm, Länge 150mm)

Schüttelgerät Vibro-Fix VF 2 (IKA)

Ultraschallbad Sonomatic 300 PC (BRANSONIC 12)

CLED-Agar (Bromthymolblau-Cystin-Lactose-Electrolyte Deficient-Agar) in Petrischalen nach Sandys (MERCK)

Glasstäbe, steril

E-Test (AB BIODISK)

3.5.2 Zemente

VersaBond (kein Antibiotikum)

VersaBond AB (Gentamicin)

VersaBond mit 1g Clindamycin

Palacos R (kein Antibiotikum)

Refobacin Palacos R (Gentamicin)

3.5.3 Keim

Die Untersuchungen wurden mit 3 *Staphylococcus epidermidis*-Stämmen durchgeführt (siehe Diffusionsversuche). Die Stammhaltung erfolgte auf Blutagar. Für die simulierte Infektion im Grasso-Modell wurde ein 100ml-Kolben steriler TSB mit 5 Einzelkolonien beimpft und bei 37°C über 24h inkubiert. Danach wies die Kultur eine Keimzahl von ca. 10^7 - 10^8 Keimen/ml auf.

3.5.4 Versuchsansatz

Im Grasso-Modell wurden 8 Gefäße plaziert und jedes Gefäß mit je 2 Testzylindern eines Zementes beschickt. Die Einstellungen im Grasso-Modell waren analog den Einstellungen in den Elutionsversuchen. Als Elutionsmedium diente TSB.

Nach dem Versuchsaufbau erfolgte mittels der Peristaltikpumpe ein Vorlauf von TSB. Nach der Initialfüllung mit 20ml wurden die Inkubationsgefäße mit den Testzylindern beschickt:

Gefäß 1: 2 Plättchen Refobacin Palacos R

Gefäß 2: 2 Plättchen VersaBond AB

Gefäß 3: 2 Plättchen VersaBond mit 1g Clindamycin

Gefäß 4: 2 Plättchen Palacos R und 2 Plättchen VersaBond

3.5.5 Infektionsdosis

Die Gefäße wurden mit je 100µl der frisch angezüchteten 18-24h-Kultur des Testkeimes beimpft. Dies ergab eine Konzentration von 10^4 bis 10^5 Keimen/ml.

3.5.6 Probenentnahme

Für die Probenentnahme wurden zu den oben angeführten Zeitpunkten die Gefäße aus dem Versuch entfernt.

3.5.6.1 Testzylinder

Je ein Testzylinder wurde mit einer sterilen Pinzette dem Inkubationsgefäß entnommen, in ein Reagenzglas mit 5ml steriler Ringerlösung überführt, Alukappe und Reagenzglasöffnung abgeflämmt und das Reagenzglas kurz während 3 Sekunden mit dem Schüttelgerät aufgeschüttelt, um locker anhaftende Bakterien von der Testzylinderoberfläche zu entfernen. Nach einmaliger Wiederholung dieses Vorgangs wurde der Testzylinder in ein Reagenzglas mit 1ml Ringerlösung überführt und während 1 Minute im Ultraschallbad bei maximaler

Schallintensität beschallt, um die Keime von der Oberfläche der Testzylinder abzuschütteln. Nach Aufnahme und Überführen der Suspension der abgeschallten Bakterien in ein kleines Reagenzglas mit Korkstopfen (Reagenzglas Nr. 0) folgte eine Reihenverdünnung.

3.5.6.2 Eluat

Das Inkubationsgefäß, in dem sich jetzt nur noch das Magnetfischchen befand, wurde auf einen separaten Magnetrührer gestellt, um den Bakterien-Bodensatz zu resuspendieren. Nach Aufnahme und Überführen von 1ml des aufgerührten Eluats in ein kleines Reagenzglas mit Korkstopfen (Reagenzglas Nr. 0) folgte eine Reihenverdünnung.

3.5.7 Reihenverdünnungstest und Ausplattierung

10 kleine Reagenzgläser mit Korkstopfen wurden mit jeweils 1,8ml steriler TSB beschickt, anschließend mittels einer Mikroliterpipette 200µl aus Reagenzglas Nr. 0 (vorher kurz aufgeschüttelt) in Reagenzglas Nr. 1 überführt (→ Konzentration 1: 10¹ = 1: 10), Reagenzglas Nr. 1 wiederum kurz aufgeschüttelt, daraus 200µl entnommen, in Reagenzglas Nr. 2 überführt (Konzentration 1: 10² = 1: 100) und die Verdünnung bis 1: 10¹⁰ (= 1: 10 Milliarden) fortgeführt.

Nach kurzem Aufschütteln des Reagenzröhrchens wurden jeweils 100µl der verdünnten Bakteriensuspensionen mittels Mikroliterpipette aufgenommen, auf CLED-Agar getropft und mittels Glasstab auf der gesamten Platte homogen verteilt. Die Inkubation der Agar-Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank über 24-48h.

Die Spülflüssigkeiten wurden ohne Reihenverdünnung ausplattiert. Hier sollte bakterielles Wachstum lediglich qualitativ nachgewiesen werden.

3.5.8 Auszählung

Nach der Bebrütung stellten sich die Staphylokokken als gelbe Kolonien dar. Die Ermittlung der Keimzahl erfolgte durch Auszählen und Berechnung des Mittelwertes pro 100µl Eluat / beschallte Ringerlösung, die Auswertung der Ergebnisse und die graphische Darstellung von Mittelwert (mean) und Standardabweichung (sd) im Programm Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., Northampton).

3.6 Infektionsversuche (Teil 2)

3.6.1 Material

Tryptic-Soya-Broth (TSB), steril (MERCK)

Ringerlösung

Reagenzgläser (DURAN, Schott, Außendurchmesser 20mm, Länge 150mm)

Schüttelgerät Vibro-Fix VF 2 (IKA)

Ultraschallbad Sonomatic 300 PC (BRANSONIC 12)

CLED-Agar (Bromthymolblau-Cystin-Lactose-Electrolyte Deficient-Agar) in Petrischalen nach Sandys (MERCK)

Glasstäbe, steril

3.6.2 Zemente

VersaBond (kein Antibiotikum)

VersaBond AB (Gentamicin)

VersaBond mit 2g Gentamicin

VersaBond mit 1g Clindamycin

Palacos R (kein Antibiotikum)

Refobacin Palacos R (Gentamicin)

3.6.3 Keim

Die Untersuchungen wurden mit dem *Staphylococcus epidermidis*-Stamm 3 durchgeführt (siehe Diffusionsversuche). Die Stammhaltung erfolgte auf Blutagar. Für die simulierte Infektion im Grasso-Modell wurde ein 100ml-Kolben steriler TSB mit 5 Einzelkolonien beimpft und bei 37°C über 24h inkubiert. Danach wies die Kultur eine Keimzahl von ca. 10^7 - 10^8 Keimen/ml auf.

3.6.4 Versuchsansatz

Elutionsmedium war sterile TSB. Nach Einstellung der Kapillaren (siehe Grasso-Modell) wurden die Inkubationsgefäße mit einem Magnetfischchen beschickt und zusammen mit den Pumpschläuchen autoklaviert.

Nach dem Versuchsaufbau erfolgte mittels der Peristaltikpumpe ein Vorlauf von TSB. Nachdem die Inkubationsgefäße mit der Initialfüllung von 20ml versehen waren, wurden sie mit den Testzylindern beschickt.

Für die Infektionsversuche mit den Zementen VersaBond, VersaBond AB, VersaBond mit 2g Gentamicin, Palacos R und Refobacin Palacos R wurden die 5 Inkubationsgefäße mit je 2 Testzylindern des jeweiligen Zements beschickt.

Für den Infektionsversuch mit VersaBond mit 1g Clindamycin wurden 6 Inkubationsgefäße mit je einem Testzylinder beschickt.

3.6.5 Infektionsdosis und -zeitschema

Die Gefäße wurden mit je 100µl der frisch angezüchteten 18-24h-Kultur des Testkeimes beimpft. Dies ergab eine Konzentration von 10^4 bis 10^5 Keimen/ml. Die Intervalle für die Zugabe von Bakterien betragen 12h (0h, 12h, 24h, 36h, ...).

In Vorversuchen für die einzelnen Zemente unter identischen Bedingungen wurde das Zeitintervall ermittelt, in dem das Wachstum der Bakterien makroskopisch erkennbar, also keine Hemmwirkung des Antibiotikums mehr vorhanden war (Tab. 3). Dieser Zeitpunkt wurde X genannt und die Zeitpunkte der Probenentnahme wie folgt festgesetzt:

X + 6h, + 12h, + 24h, + 48h, + 72h.

VersaBond	nach einmaligem Beimpfen
VersaBond AB	nach zweimaligem Beimpfen (0h, 12h)
VersaBond mit 2g Gentamicin	nach dreimaligem Beimpfen (0h, 12h, 24h)
VersaBond mit 1g Clindamycin	Nach Beimpfen in 12stündigem Abstand konnte nach 14 Tagen kein Wachstum von <i>Staphylococcus epidermidis</i> beobachtet werden. Allerdings war nach dieser Zeit aufgrund des offenen Systems die zuführende Bouillon verunreinigt mit Kokken und Gram-negativen Stäbchen.
VersaBond mit 2g Clindamycin	Auf diesen Versuch wurde aufgrund des langwierigen Versuchs mit VersaBond mit 1g Clindamycin verzichtet.
Palacos R	nach einmaligem Beimpfen (0h)
Refobacin Palacos R	nach 24h war ein Bodensatz vorhanden, aber noch keine Trübung. Aus diesem Grund erfolgte eine nochmalige Beimpfung. Hiernach zeigte sich makroskopisch sichtbares Wachstum.

Tabelle 3. Beginn des makroskopisch erkennbaren Wachstums in den Inkubationsgefäßen

3.6.6 Probenentnahme

Für die Probenentnahme wurde zu den oben angeführten Zeitpunkten jeweils ein Gefäß aus dem Versuch entfernt.

3.6.6.1 Testzylinder

Je ein Testzylinder wurde mit einer sterilen Pinzette dem Inkubationsgefäß entnommen, in ein Reagenzglas mit 5ml steriler Ringerlösung überführt, Alukappe und Reagenzglasöffnung abgeflämmt und das Reagenzglas während 3 Sekunden mit dem Schüttelgerät aufgeschüttelt, um locker anhaftende Bakterien von der Testzylinderoberfläche zu entfernen. Nach einmaliger Wiederholung dieses Vorgangs wurde der Testzylinder in ein Reagenzglas mit 1ml Ringerlösung überführt und während 1 Minute im Ultraschallbad bei maximaler Schallintensität beschallt, um die Keime von der Oberfläche der Testzylinder abzuschütteln. Nach Aufnahme und Überführen der Suspension der abgeschallten Bakterien in ein kleines Reagenzglas mit Korkstopfen (Reagenzglas Nr. 0) folgte eine Reihenverdünnung.

3.6.6.2 Eluat

Das Inkubationsgefäß, in dem sich jetzt nur noch das Magnetfischchen befand, wurde auf einen separaten Magnetrührer gestellt, um den Bakterien-Bodensatz zu resuspendieren. Nach Aufnahme und Überführen von 1ml des aufgerührten Eluats in ein kleines Reagenzglas mit Korkstopfen (Reagenzglas Nr. 0) wurde eine Reihenverdünnung durchgeführt.

3.6.7 Reihenverdünnungstest und Ausplattierung

10 kleine Reagenzgläser mit Korkstopfen wurden mit jeweils 1,8ml steriler TSB beschickt, anschließend mittels einer Mikroliterpipette 200µl aus Reagenzglas Nr. 0 (vorher kurz aufgeschüttelt) in Reagenzglas Nr. 1 überführt (→ Konzentration 1: 10¹ = 1: 10), Reagenzglas Nr. 1 wiederum kurz aufgeschüttelt, daraus 200µl entnommen, in Reagenzglas Nr. 2 überführt (Konzentration 1: 10² = 1: 100) und die Verdünnung bis 1: 10¹⁰ (= 1: 10 Milliarden) fortgeführt.

Für die Ausplattierung wurde das jeweilige Reagenzglas kurz aufgeschüttelt, daraus 100µl mittels Mikroliterpipette aufgenommen, auf CLED-Agar getropft und mittels Glasstab auf der gesamten Platte gleichmäßig verteilt. Die Inkubation der Agar-Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank während 24-48h.

3.6.8 Auszählung

Nach der Bebrütung stellten sich die Staphylokokken als gelbe Kolonien dar. Die Ermittlung der Keimzahl erfolgte durch Auszählen und Berechnung des Mittelwertes pro ml Eluat / beschallte Ringerlösung, die Auswertung der Ergebnisse und die graphische Darstellung von Mittelwert (mean) und Standardabweichung (sd) im Programm Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., Northampton).

3.7 Fluoreszenz-Mikroskopie (live/dead-Farbstoff)

Ziel des Versuchs war die qualitative Darstellung lebender und toter Bakterien auf den Testzylindern. Der verwendete Farbstoff (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits, Firma Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) besteht aus einer Mischung zweier Fluoreszenzfarbstoffe: SYTO 9 (grün) und Propidium Iodide (rot). Beide Farbstoffe unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, in intakte Zellen einzudringen. Während SYTO 9 lebende und tote Bakterien anfärbt, gelangt Propidium Iodide nur in Bakterien mit geschädigter Membran. Lebende Bakterien erscheinen in der Fluoreszenzmikroskopie grün, tote Bakterien rot.

3.7.1 Zemente

VersaBond (kein Antibiotikum)

VersaBond AB (Gentamicin)

VersaBond mit 1g Clindamycin

3.7.2 Keim

Die Untersuchungen erfolgten mit *Staphylococcus epidermidis*-Stamm 3. Ein 100ml-Kolben steriler TSB wurde mit 5 Einzelkolonien beimpft und bei 37°C über 24h inkubiert. Danach wies die Kultur eine Keimzahl von ca. 10^7 - 10^8 Keimen/ml auf.

3.7.3 Versuchsansatz

Sechs Gefäße wurden im Grasso-Modell plaziert. Die Einstellungen im Grasso-Modell entsprachen den Einstellungen in den Elutionsversuchen. Nach dem Versuchsaufbau erfolgte mittels der Peristaltikpumpe ein Vorlauf von TSB. Nach der Initialfüllung von 20ml wurden die Inkubationsgefäße mit den Testzylindern beschickt.

Gefäß 1+4: je 2 Plättchen VersaBond, Gefäß 2+5: je 2 Plättchen VersaBond AB, Gefäß 3+6: je 2 Plättchen VersaBond mit 1g Clindamycin

3.7.4 Infektionsdosis

Die Gefäße wurden mit jeweils 100µl der frisch angezüchteten 18-24h-Kultur des Testkeimes beimpft. Dies ergab eine Konzentration von 10^4 bis 10^5 Keimen/ml.

3.7.5 Ansatz des Farbstoffs

In einem Eppendorf-Röhrchen wurden zu 1ml Aqua ad injectabile 3µl der Komponente A und 3µl der Komponente B gegeben und mittels Schüttelgerät vermischt.

3.7.6 Methode

Nach 24 Stunden wurden die Gefäße 1 bis 3, nach 72h die Gefäße 4-6 aus der Versuchsanordnung genommen und je ein Testzylinder mit einer sterilen Pinzette dem Inkubationsgefäß entnommen, in ein Reagenzglas mit 5ml steriler Ringerlösung überführt, Alukappe und Reagenzglasöffnung abgeflammt und das Reagenzglas während 3 Sekunden mit dem Schüttelgerät aufgeschüttelt, um locker anhaftende Bakterien von der Testzylinderoberfläche zu entfernen. Nach einmaliger Wiederholung dieses Vorgangs wurde der Testzylinder mit 50µl Farbstoff überschichtet, während 10 Minuten im Dunkeln inkubiert, anschließend erneut in 5ml Ringerlösung gespült, mit der Unterseite auf einem Objektträger mittels Uhu fixiert und mit 15µl Mounting-Oil überschichtet.

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mittels Zeiss Axiophon mit einem FITC-Rhodamin-Doppelfilter.

3.8 Rasterelektronenmikroskopie des Biofilms auf den Testzylindern

Ziel dieser qualitativ orientierenden Untersuchung war die Darstellung des durch *Staphylococcus epidermidis* gebildeten Bakterienrasens und Biofilms auf Prüfzylindern aus PMMA analog der Arbeit von DRAENERT et al. (1983). Hierzu wurden Prüfzylinder im Grasso-Modell in zwölfstündigen Intervallen mit *Staphylococcus epidermidis* (Stamm 3) beimpft und über insgesamt 72 Stunden inkubiert.

3.8.1 Zemente

VersaBond (kein Antibiotikum)

VersaBond AB (Gentamicin)

VersaBond mit 1g Clindamycin

3.8.2 Material

hohe Reagenzgläser (DURAN, Schott, Außendurchmesser 20mm, Länge 150mm)

Ringerlösung, steril

lange Pinzette, steril (in Ethanol getaucht und abgeflammt)

Bunsenbrenner

Schüttelgerät Vibro-Fix VF 2 (IKA)

Schnappdeckelgläschen (20ml)

Ausgangslösungen:

- a) 70% Glutaraldehyd in dest. Wasser (grade I, Fa. Sigma, G-7776)
- b) 4% Osmiumtetroxid (OsO_4) in dest. Wasser (99,9% rein, Fa. Roth, Karlsruhe)
- c) Cacodylsäure-Na-Salz als Trockensubstanz (98% rein, 3 Mol H_2O /Mol, Fa. Sigma, C-4945)
- d) Ethanol (absolut, >99,8%)

10ml-Glaspipetten mit Pipettierhilfe

3.8.3 Herstellung der Ausgangslösungen

0,2 M Cacodylat-Puffer:

4,28g Cacodylsäure-Na-Salz in ca. 60ml H_2O dest. unter Rühren lösen, 0,2 M HCl zugeben, auf pH 7,2 einstellen, dann auf 100ml auffüllen.

10% Glutaraldehyd-Lösung:

70% Glutaraldehyd durch Zugabe des sechsfachen Volumens an H_2O dest. auf 10% verdünnen.

1% Glutaraldehyd-Lösung:

1% Glutaraldehyd durch Verdünnen der 10% Glutaraldehyd-Lösung mit dem neunfachen Volumen an H_2O dest. herstellen.

3.8.4 Herstellung der Fixierlösungen

Vorfixierlösung: 0,5% Glutaraldehyd-Lösung in 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7,2, durch Mischen gleicher Volumina von 0,2 M Cacodylat-Puffer und 1% Glutaraldehyd-Lösung.

Hauptfixierlösung: 5% Glutaraldehyd-Lösung in 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7,2, durch Mischen gleicher Volumina von 0,2 M Cacodylat-Puffer und 10% Glutaraldehyd-Lösung.

Waschlösung: 0,1 M Cacodylat-Puffer, durch Mischen gleicher Volumina von 0,2 M Cacodylat-Puffer und H₂O dest.

Nachfixierlösung: 2% Osmiumtetroxid-Lösung in 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7,2, durch Mischen gleicher Volumina von 4% wässriger Osmiumtetroxid-Lösung und 0,2 M Cacodylat-Puffer.

3.8.5 Methode

Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurden Prüfzylinder aus VersaBond, VersaBond AB und VersaBond mit 1g Clindamycin untersucht, durch Abdrehen an der Drehmaschine auf einen Durchmesser von 12mm gebracht, im Grasso-Modell während 72 Stunden inkubiert und die Inkubationsgefäße in zwölfstündigen Intervallen mit Bakterien beimpft. Als Leerprobe diente ein Prüfzylinder VersaBond.

Das weitere Vorgehen war wie folgt:

1. Entnahme der Zementplättchen aus dem Inkubationsgefäß. Markierung der Probenunterseite mit einem Diamantkratzer.
2. Zweimaliges Waschen durch kurzes Aufschütteln in jeweils 5ml Ringerlösung und Transfer in ein dicht schließendes Schnappdeckelgläschen.
3. Vorfixierung durch Immersion in 0,5% Glutaraldehyd-Lösung in 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7,2, für 30 Minuten bei Raumtemperatur (Verhältnis Probenvolumen zu Vorfixierlösung 1:10).
4. Fixierung durch Immersion in 5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7,2, für zwei Stunden bei Raumtemperatur (Verhältnis Probenvolumen zu Fixierlösung 1:10).
5. Fünfmaliges Waschen der Probe in 0,1 M Cacodylat-Puffer: jeweils 30 Minuten Inkubation in gerührter Cacodylat-Puffer-Lösung bei Raumtemperatur, Absaugen der Lösung und Ersatz durch neue Lösung (Verhältnis Probenvolumen zu Waschlösung 1:5), Probe dabei nie trocken werden lassen.
6. Nachfixierung durch Immersion in 2% Osmiumtetroxid-Lösung in 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7,2, für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln.
7. Auswaschen des Osmiumtetroxids analog zu Punkt 5.
8. Entwässerung mittels Ethanol bei Raumtemperatur (Verhältnis Probenvolumen zu Ethanol-Lösung 1:10):
 - a) 30% Ethanol für 10 Minuten
 - b) 50% Ethanol für 10 Minuten

- c) 70% Ethanol für 10 Minuten
- d) 90% Ethanol für 10 Minuten
- e) 95% Ethanol für 2 x 10 Minuten (Ethanol-Lösung einmal wechseln)
- f) 100% Ethanol für 3 x 10 Minuten (Ethanol-Lösung zweimal wechseln).

9. Trocknung der Probe mittels Kritischer-Punkt-Trocknung, Fixierung auf einem Probenteller und Bespatterung mit Gold-Palladium.

Die Leerprobe wurde ohne die oben angeführte Präparation auf einem Probenteller fixiert und mit Gold-Palladium bespattert.

Die Proben wurden im Rasterelektronenmikroskop LEO 1530 untersucht, die Bilder zur Dokumentation auf Disketten gespeichert.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Antibiotika-haltige Knochenzemente (Tab. 4) hinsichtlich der Freisetzung des Antibiotikums und der antimikrobiellen Wirkung untersucht.

Zement	Antibiotikum
Refobacin Palacos R	Gentamicin
VersaBond AB	Gentamicin
VersaBond mit 2g Gentamicin	Gentamicin
VersaBond mit 1g Clindamycin	Clindamycin
VersaBond mit 2g Clindamycin	Clindamycin

Tabelle 4. Untersuchte Knochenzemente

4.1 Kontinuierliche Elution

Die Freisetzung der Antibiotika wurde in einem kontinuierlichen System in einem nach GRASSO et al. (1978) modifizierten Modell untersucht, das Verhältnisse wie im menschlichen Körper simuliert: Elution des Antibiotikums aus dem Zement durch Gewebsflüssigkeit, Minderung der lokalen Antibiotikakonzentration durch Abtransport via Lymphe und Blut.

Die Untersuchungen erfolgten über 24 Stunden und zeigten eine exponentielle Freisetzung. Nach 24 Stunden waren immer noch Konzentrationen deutlich über der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) der untersuchten Keime nachweisbar.

4.1.1 Refobacin Palacos R

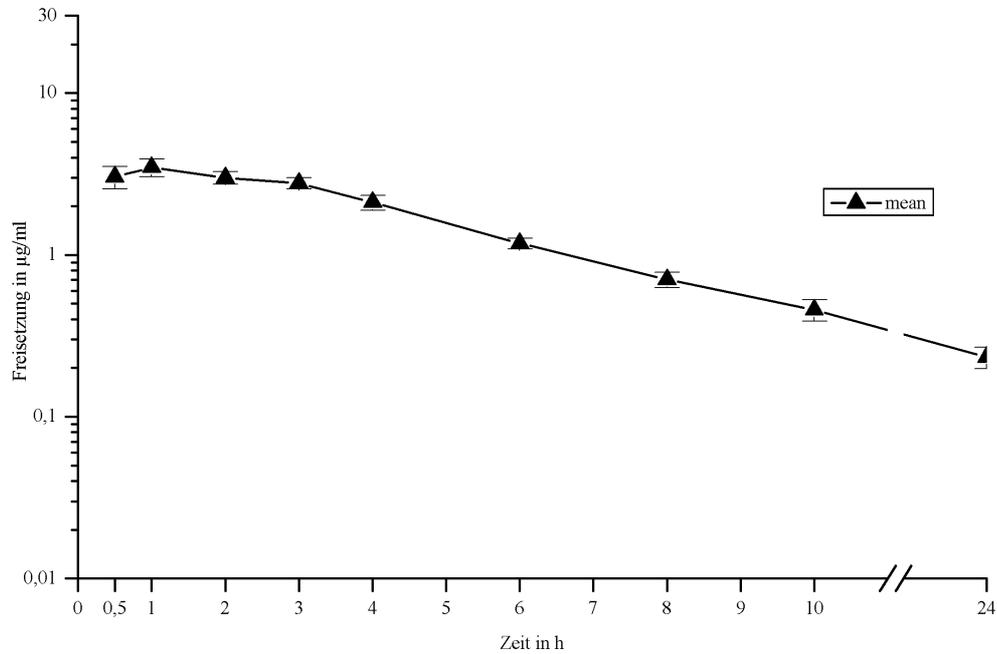


Abbildung 3. Freisetzung von Gentamicin aus Refobacin Palacos R in kontinuierlicher Elution

Zeit in h	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	mean	sd (yEr±)	se (yEr±)
0,5	3,93	3,16	2,81	2,84	2,61	2,87	3,03667	0,47183	0,19263
1	3,97	3,85	3,64	2,99	3,49	2,91	3,475	0,4399	0,17959
2	3,44	2,93	2,79	2,99	3,16	2,68	2,99833	0,27228	0,11116
3	3,11	2,87	2,87	2,64	2,62	2,53	2,77333	0,21565	0,08804
4	2,46	1,9	2,2	2,05	2,19	1,85	2,10833	0,22463	0,0917
5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
6	1,31	1,04	1,12	1,19	1,22	1,19	1,17833	0,09152	0,03736
7	--	--	--	--	--	--	--	--	--
8	0,84	0,64	0,69	0,65	0,75	0,66	0,705	0,07714	0,03149
9	--	--	--	--	--	--	--	--	--
10	0,59	0,43	0,44	0,4	0,47	0,42	0,45833	0,06853	0,02798
24	0,29	0,19	0,22	0,22	0,26	0,22	0,23333	0,03559	0,01453

Tabelle 5. Freisetzung von Gentamicin aus Refobacin Palacos R in kontinuierlicher Elution

Die Freisetzung von Gentamicin aus den Testzylindern (Abb. 3, Tab. 5) betrug initial 3,03µg/ml. Sie nahm kontinuierlich über 24 Stunden ab und lag dann bei 0,23µg/ml.

4.1.2 VersaBond AB

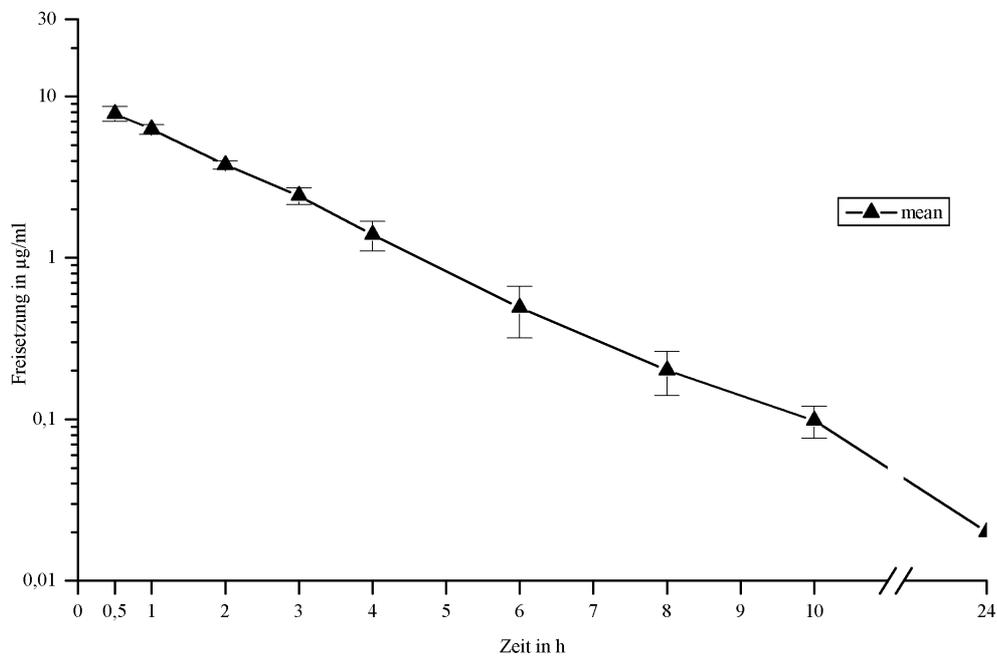


Abbildung 4. Freisetzung von Gentamicin aus VersaBond AB in kontinuierlicher Elution

Zeit in h	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	mean	sd (yEr±)	se (yEr±)
0,5	7,5	7,7	9,43	7,88	6,93	7,52	7,82667	0,84786	0,34614
1	6,52	6,49	6,86	6,04	5,67	5,96	6,25667	0,43976	0,17953
2	3,87	4,13	3,59	3,49	3,81	3,73	3,77	0,22521	0,09194
3	2,47	2,93	2,05	2,41	2,43	2,27	2,42667	0,29049	0,11859
4	1,47	1,84	0,99	1,43	1,47	1,16	1,39333	0,29317	0,11968
5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
6	0,52	0,73	0,27	0,55	0,57	0,31	0,49167	0,17279	0,07054
7	--	--	--	--	--	--	--	--	--
8	0,18	0,28	0,12	0,24	0,24	0,15	0,20167	0,06145	0,02509
9	--	--	--	--	--	--	--	--	--
10	0,08	0,13	0,09	0,11	0,11	0,07	0,09833	0,02229	0,0091
24	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0	0

Tabelle 6. Freisetzung von Gentamicin aus VersaBond AB in kontinuierlicher Elution

Die Freisetzung von Gentamicin aus den Testzylindern (Abb. 4, Tab. 6) betrug initial 7,83µg/ml. Sie nahm kontinuierlich über 24 Stunden ab und lag dann bei 0,02µg/ml. Diese Konzentration konnte nur noch als Spur angegeben werden, da sie der unteren Nachweisgrenze des Bioassays entsprach.

4.1.3 VersaBond mit 2g Gentamicin

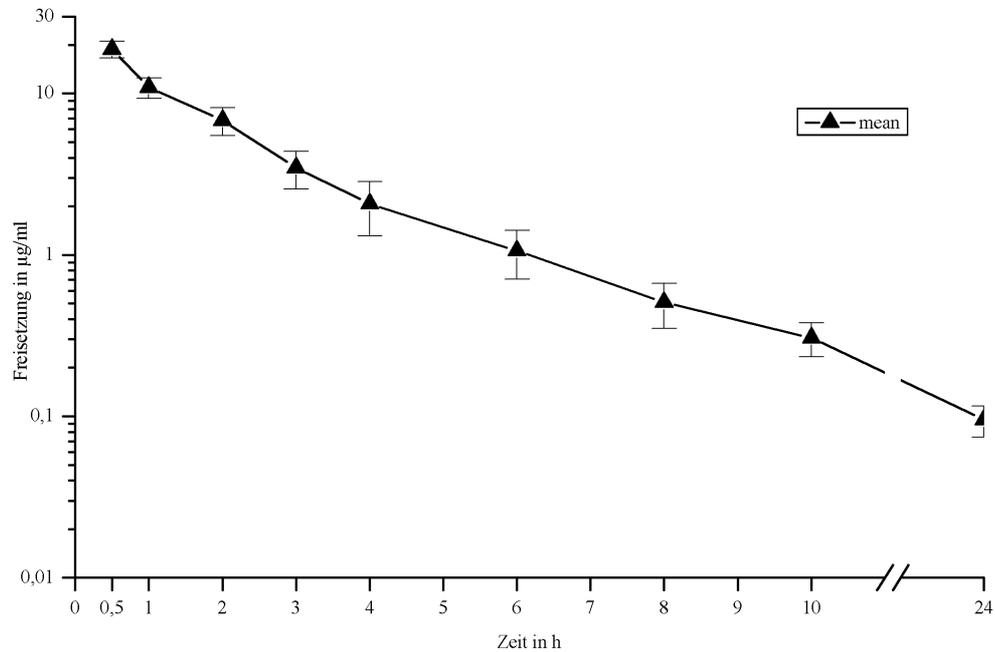


Abbildung 5. Freisetzung von Gentamicin aus VersaBond mit 2g Gentamicin in kontinuierlicher Elution

Zeit in h	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	mean	sd (yEr±)	se (yEr±)
0,5	19,19	20,56	19,5	15,78	16,4	21,41	18,80667	2,2553	0,92072
1	11,37	9,02	12,59	8,88	11,47	12,14	10,91167	1,58452	0,64688
2	8,65	5,43	7,48	5,94	7,86	5,59	6,825	1,34799	0,55031
3	3,78	3,47	3,09	4,17	4,39	1,89	3,465	0,90257	0,36847
4	2,14	2,32	1,77	2,55	2,94	0,73	2,075	0,76683	0,31306
5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
6	1,12	1,38	0,81	1,31	1,28	0,47	1,06167	0,35426	0,14462
7	--	--	--	--	--	--	--	--	--
8	0,46	0,66	0,43	0,63	0,62	0,25	0,50833	0,15842	0,06467
9	--	--	--	--	--	--	--	--	--
10	0,33	0,34	0,26	0,36	0,37	0,18	0,30667	0,07312	0,02985
24	0,08	0,1	0,13	0,1	0,07	0,09	0,095	0,02074	0,00847

Tabelle 7. Freisetzung von Gentamicin aus VersaBond mit 2g Gentamicin in kontinuierlicher Elution

Die Freisetzung von Gentamicin aus den Testzylindern (Abb. 5, Tab. 7) betrug initial 18,81 µg/ml. Sie nahm kontinuierlich über 24 Stunden ab und lag dann bei 0,09 µg/ml.

4.1.4 VersaBond mit 1g Clindamycin

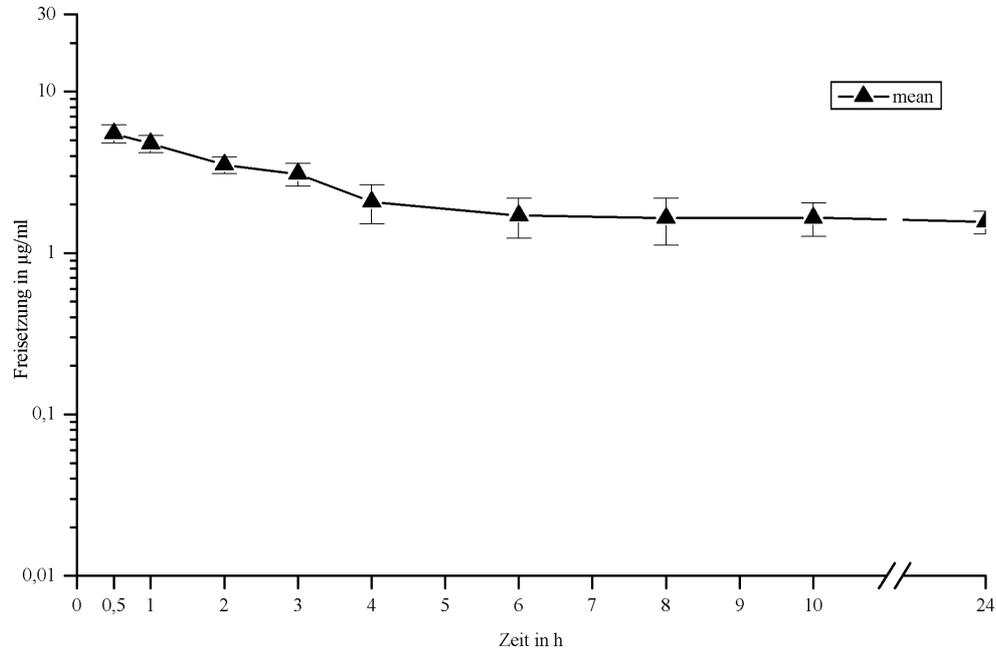


Abbildung 6. Freisetzung von Clindamycin aus VersaBond mit 1g Clindamycin in kontinuierlicher Elution

Zeit in h	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	mean	sd (yEr±)	se (yEr±)
0,5	5,09	5,49	6,34	5,26	4,53	6,27	5,49667	0,70216	0,28666
1	4,07	5,2	4,88	4,54	4,27	5,58	4,75667	0,57357	0,23416
2	2,9	3,59	3,71	3,17	3,7	4,03	3,51667	0,40996	0,16737
3	2,34	3,53	3,47	2,6	3,2	3,41	3,09167	0,50102	0,20454
4	1,47	2,93	2,23	1,55	1,82	2,45	2,075	0,5661	0,23111
5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
6	1,1	2,26	1,99	1,14	1,83	1,92	1,70667	0,47672	0,19462
7	--	--	--	--	--	--	--	--	--
8	1,07	2,41	2,11	1,15	1,47	1,67	1,64667	0,53072	0,21667
9	--	--	--	--	--	--	--	--	--
10	1,2	2,09	2,07	1,28	1,54	1,73	1,65167	0,38155	0,15577
24	1,49	1,96	1,7	1,29	1,6	1,32	1,56	0,25163	0,10273

Tabelle 8. Freisetzung von Clindamycin aus VersaBond mit 1g Clindamycin in kontinuierlicher Elution

Die Freisetzung von Clindamycin aus den Testzylindern (Abb. 6, Tab. 8) betrug initial 5,5µg/ml. Der Graph zeigte eine prolongierte Freisetzung von Clindamycin aus den Testzylindern. Nach 24 Stunden betrug die Freisetzung 1,56µg/ml.

4.1.5 VersaBond mit 2g Clindamycin

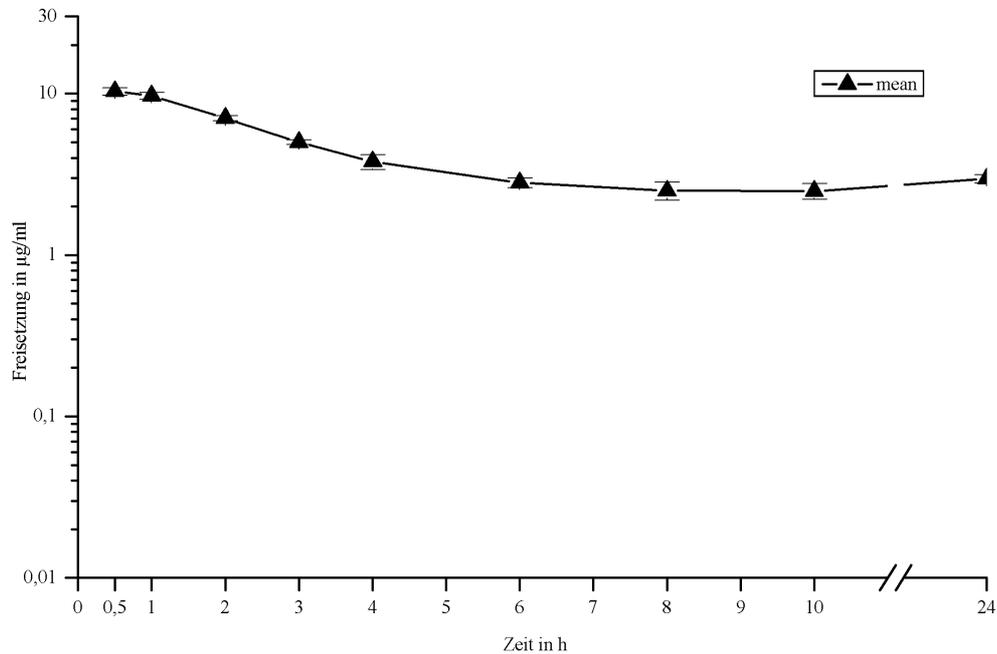


Abbildung 7. Freisetzung von Clindamycin aus VersaBond mit 2g Clindamycin in kontinuierlicher Elution

Zeit in h	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	mean	sd (vEr±)	se (vEr±)
0,5	10,54	10,92	9,72	10,15	10,78	9,68	10,29833	0,53211	0,21723
1	9,99	10,42	9,39	9,24	9,73	9,31	9,68	0,46061	0,18804
2	7,05	7,24	6,8	6,73	7,38	6,98	7,03	0,24996	0,10205
3	5,05	5,26	4,84	4,79	5,08	4,96	4,99667	0,17189	0,07017
4	3,79	4,19	3,93	3,77	3,97	3,04	3,78167	0,39357	0,16067
5	--	--	--	--	--	--	--	--	--
6	2,84	3,12	2,78	2,7	2,84	2,54	2,80333	0,19159	0,07822
7	--	--	--	--	--	--	--	--	--
8	2,6	3,09	2,31	2,21	2,34	2,46	2,50167	0,31796	0,12981
9	--	--	--	--	--	--	--	--	--
10	2,7	2,83	2,64	2,09	2,41	2,26	2,48833	0,28337	0,11568
24	2,9	3,18	2,96	2,68	3,14	2,95	2,96833	0,18027	0,07359

Tabelle 9. Freisetzung von Clindamycin aus VersaBond mit 2g Clindamycin in kontinuierlicher Elution

Die Freisetzung von Clindamycin aus den Testzylindern (Abb. 7, Tab. 9) betrug initial 10,30µg/ml. Der Graph zeigte, wie schon der Graph der kontinuierlichen Freisetzung von Clindamycin aus VersaBond mit 1g Clindamycin, eine prolongierte Freisetzung. Nach 24 Stunden wurden noch 2,97µg/ml freigesetzt.

4.2 Statische Elution

Eine weitere Untersuchung erfolgte in einem statischen System, um die absolute Menge des freigesetzten Antibiotikums zu ermitteln.

Die beiden Gentamicin-haltigen Knochenzemente wiesen eine initial hohe Freisetzung auf, die im Verlauf abnahm. Dagegen zeigte der Clindamycin-haltige Knochenzement eine kontinuierlich höhere Freisetzung über eine längere Zeit. Bei allen Knochenzementen fiel auf, daß nach 24 Stunden erst ein geringer Teil des im Prüfzylinder inkorporierten Antibiotikums freigesetzt worden war.

4.2.1 Refobacin Palacos R

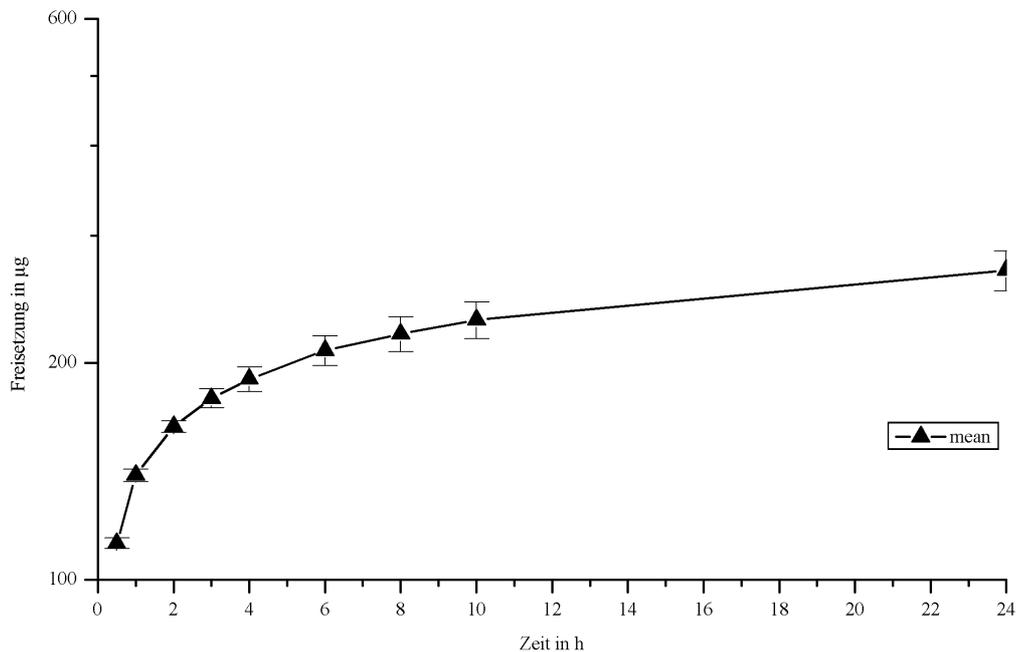


Abbildung 8. Freisetzung von Gentamicin aus Refobacin Palacos R in statischer Elution (kumulative Darstellung)

Zeit in h	Probe 1	Probe 2	Probe 3	mean	sd (yEr±)	se (yEr±)
0,5	114,34	110,5	111,9	112,24667	1,94333	1,12198
1	27,64	29,6	24,66	27,3	2,48749	1,43615
2	22,7	24,68	22,86	23,41333	1,09988	0,63502
3	16,38	17,14	12,68	15,4	2,38604	1,37758
4	12,58	12,56	9,02	11,38667	2,04962	1,18335
5	--	--	--	--	--	--
6	19,96	19,32	15,5	18,26	2,41156	1,39231
7	--	--	--	--	--	--
8	9,58	14,98	8,9	11,15333	3,33139	1,92338
9	--	--	--	--	--	--
10	11,14	10,86	8,58	10,19333	1,40418	0,81071
24	40,4	42,48	35	39,29333	3,86085	2,22906

Tabelle 10. Freisetzung von Gentamicin aus Refobacin Palacos R in statischer Elution

Die Freisetzung war initial hoch (Abb.8, Tab. 10). Gegen Ende des untersuchten Zeitraums zeigten die Kurven ein asymptotisches Verhalten (Wert gegen etwa 300µg). Nach 24 Stunden waren etwa 268µg Gentamicin aus dem Testzylinder eluiert. Unter Berücksichtigung des Gewichts des Testzylinders und der Antibiotikumkonzentration im Zement waren dies 3,3% des inkorporierten Gentamicins (8,18 mg).

4.2.2 VersaBond AB

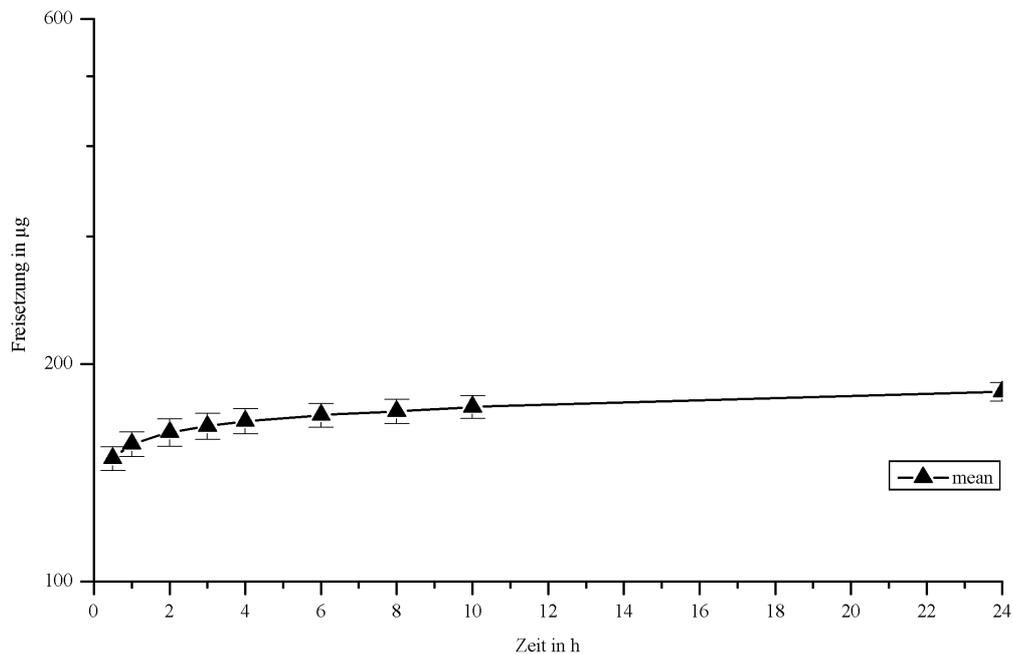


Abbildung 9. Freisetzung von Gentamicin aus VersaBond AB in statischer Elution (kumulative Darstellung)

Zeit in h	Probe 1	Probe 2	Probe 3	mean	sd (yEr±)	se (yEr±)
0,5	153,72	147,52	142,42	147,88667	5,65892	3,26718
1	7,44	7,16	6,5	7,03333	0,48263	0,27865
2	6,64	5,82	4,84	5,76667	0,90118	0,5203
3	2,56	4,02	3,14	3,24	0,73512	0,42442
4	2,4	2,94	2,62	2,65333	0,27154	0,15677
5	--	--	--	--	--	--
6	2,64	3,9	3,16	3,23333	0,63319	0,36557
7	--	--	--	--	--	--
8	1,7	2,58	1,8	2,02667	0,4818	0,27817
9	--	--	--	--	--	--
10	2	2,98	2,56	2,51333	0,49166	0,28386
24	5,7	10,32	9,76	8,59333	2,5213	1,45567

Tabelle 11. Freisetzung von Gentamicin aus VersaBond AB in statischer Elution

Nach initial hoher Freisetzung verlief die Kurve asymptotisch und näherte sich einem Wert von etwa 200µg an. Nach 24 Stunden waren etwa 183µg Gentamicin aus dem Testzylinder eluiert, entsprechend etwa 1,2% des inkorporierten Gentamicins (15,47 mg) [Abb. 9, Tab.11].

4.2.3 VersaBond mit 2g Gentamicin

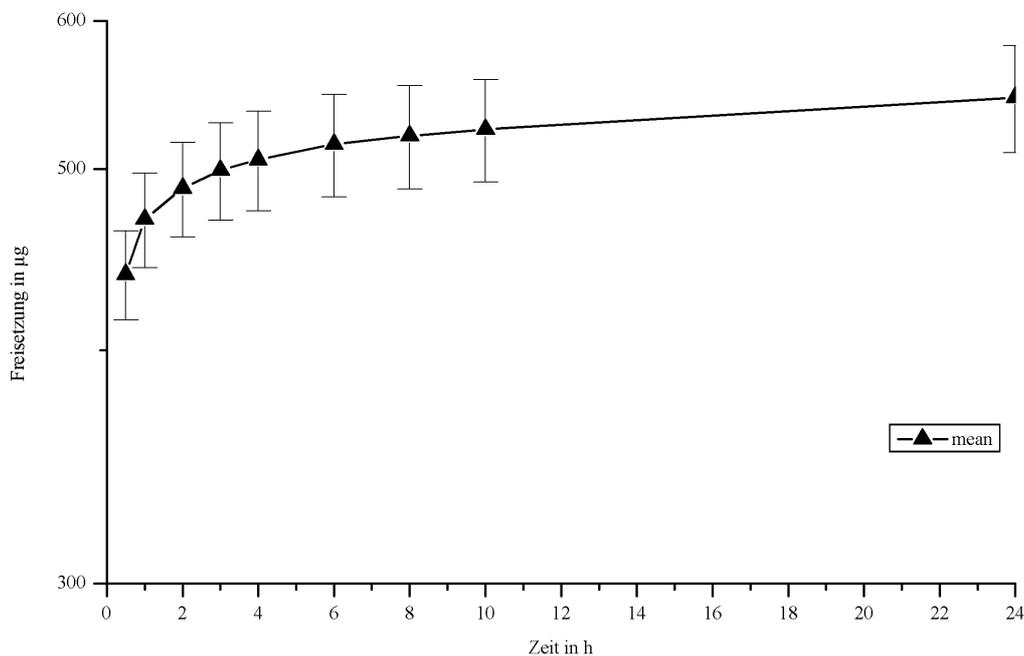


Abbildung 10. Freisetzung von Gentamicin aus VersaBond mit 2g Gentamicin in statischer Elution (kumulative Darstellung)

Zeit in h	Probe 1	Probe 2	Probe 3	mean	sd (yEr±)	se (yEr±)
0,5	436,92	416,12	464,14	439,06	24,08142	13,90341
1	29,66	28,36	34,78	30,93333	3,39413	1,9596
2	18,24	17,12	19,1	18,15333	0,99284	0,57322
3	10,88	9,48	12,56	10,97333	1,54212	0,89034
4	6,68	5,38	7,78	6,61333	1,20139	0,69362
5	--	--	--	--	--	--
6	10,02	8,16	11,06	9,74667	1,46919	0,84824
7	--	--	--	--	--	--
8	5,64	4,48	5,78	5,3	0,71358	0,41199
9	--	--	--	--	--	--
10	3,7	4,7	4,52	4,30667	0,53304	0,30775
24	20,66	18,34	23,94	20,98	2,81368	1,62448

Tabelle 12. Freisetzung von Gentamicin aus VersaBond mit 2g Gentamicin in statischer Elution

Nach initial hoher Freisetzung verliefen die Graphen asymptotisch und näherten sich einem Wert von etwa 560µg an. Nach 24 Stunden waren etwa 546µg aus dem Testzylinder eluiert, entsprechend etwa 1,8% des inkorporierten Gentamicins (30,94mg) [Abb. 10, Tab. 12].

4.2.4 VersaBond mit 1g Clindamycin

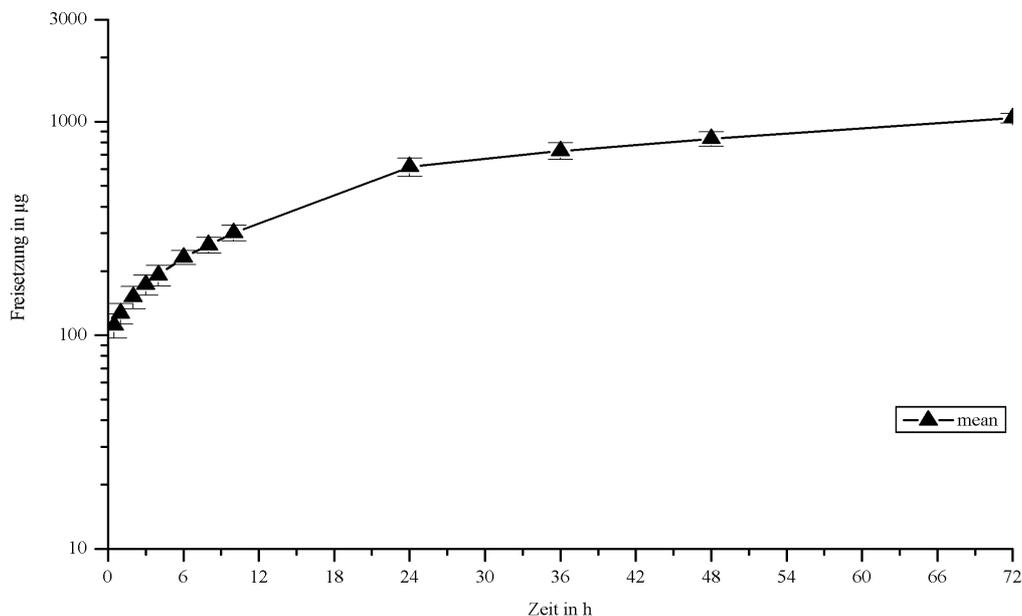


Abbildung 11. Freisetzung von Clindamycin aus VersaBond mit 1g Clindamycin in statischer Elution (kumulative Darstellung)

Zeit in h	Probe 1	Probe 2	Probe 3	mean	sd (yEr±)	se (yEr±)
0,5	112,28	96,52	124,94	111,24667	14,23815	8,2204
1	15,96	15,18	14,78	15,30667	0,60011	0,34647
2	31,54	18,68	23,68	24,63333	6,48279	3,74284
3	26,94	20,78	16,86	21,52667	5,08131	2,9337
4	21,6	16,24	17	18,28	2,90021	1,67444
5	--	--	--	--	--	--
6	41,8	48,9	30,4	40,36667	9,33292	5,38836
7	--	--	--	--	--	--
8	39,6	31,42	28,24	33,08667	5,86052	3,38357
9	--	--	--	--	--	--
10	41,4	39,18	30,36	36,98	5,83955	3,37147
24	352,38	308,78	278,14	313,1	37,30806	21,53982
36	119,6	110,55	113,8	114,65	4,58448	2,64685
48	102,37	94,8	111,13	102,76667	8,17222	4,71824
72	195,56	209,21	212,07	205,61333	8,8231	5,09402

Tabelle 13. Freisetzung von Clindamycin aus VersaBond mit 1g Clindamycin in statischer Elution

Der Graph zeigte eine prolongierte Freisetzung von Clindamycin aus den Testzylindern. Gegen Ende des Untersuchungszeitraumes verlief der Graph asymptotisch gegen einen Wert von etwa 1100µg. Nach 72 Stunden waren etwa 1037µg Clindamycin aus dem Testzylinder eluiert, entsprechend etwa 6,5% des inkorporierten Clindamycins (15,91mg) [Abb. 11, Tab. 13].

4.2.5 VersaBond mit 2g Clindamycin

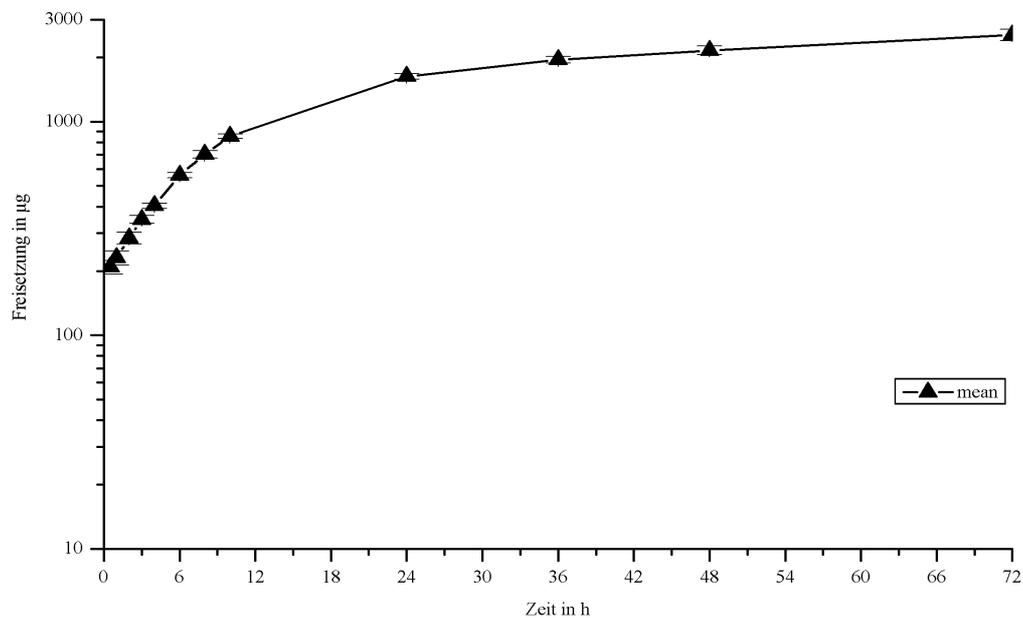


Abbildung 12. Freisetzung von Clindamycin aus VersaBond mit 2g Clindamycin in statischer Elution (kumulative Darstellung)

Zeit in h	Probe 1	Probe 2	Probe 3	mean	sd (yEr±)	se (yEr±)
0,5	211,46	221,24	191,48	208,06	15,16853	8,75756
1	22,24	24,8	20,06	22,36667	2,37254	1,36979
2	57,92	52,62	53,92	54,82	2,76225	1,59478
3	66,66	56,58	65,04	62,76	5,41298	3,12519
4	52,64	55,86	59,9	56,13333	3,63771	2,10023
5	--	--	--	--	--	--
6	164,2	153,38	153,52	157,03333	6,20691	3,58356
7	--	--	--	--	--	--
8	143,4	153,8	126,42	141,20667	13,82115	7,97964
9	--	--	--	--	--	--
10	155,16	136,52	161,96	151,21333	13,1712	7,6044
24	711,24	832,64	786	776,62667	61,24038	35,35715
36	--	338,8	300,08	319,44	27,37917	19,36
48	175,24	246,2	199,29	206,91	36,08848	20,8357
72	325,9	442,72	408,58	392,4	60,06723	34,67983

Tabelle 14. Freisetzung von Clindamycin aus VersaBond mit 2g Clindamycin in statischer Elution

Die Freisetzung von Clindamycin aus den Testzylindern war verlängert. Nach 72 Stunden waren etwa 2550µg aus dem Testzylinder eluiert, entsprechend etwa 8% des inkorporierten Clindamycins (31,83mg) [Abb. 12, Tab. 14].

4.3 Diffusionsversuche

Prüfzylinder wurden auf Agarplatten gelegt, die zuvor mit einer definierten Konzentration von Bakterien (3 Stämme *Staphylococcus aureus* und 3 Stämme *Staphylococcus epidermidis*) beimpft worden waren. Die nach Bebrütung gebildeten Hemmhöfe demonstrierten die antibiotische Wirkung in der unmittelbaren Umgebung des Prüfzylinders. Wenn die Prüfzylinder im täglichen Wechsel auf neue Agarplatten gelegt wurden, nahm der Hemmhofdurchmesser allmählich ab. Ein antimikrobieller Effekt zeigte sich noch nach 20 Tagen (Abb. 13-16, Tab. 15-17).

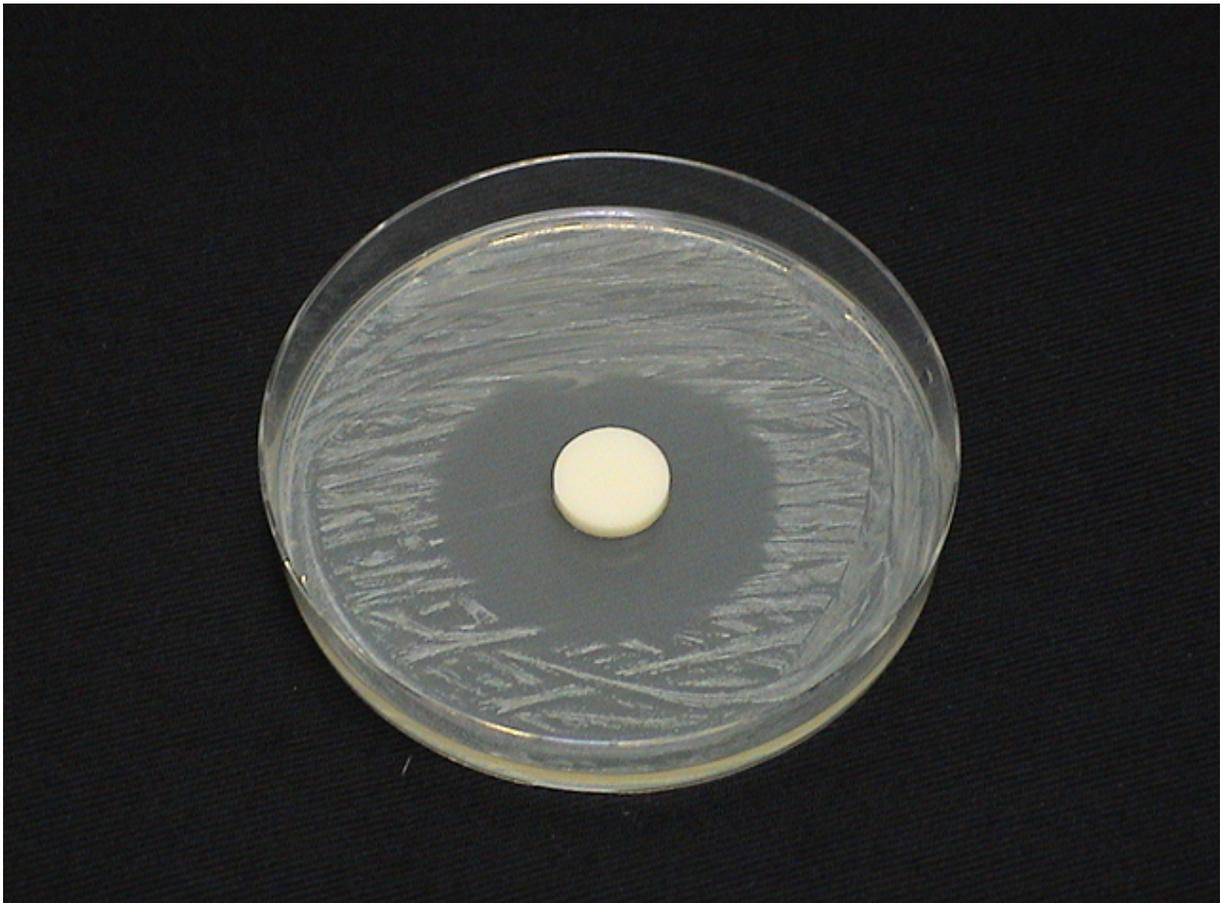


Abbildung 13. Beispiel einer Hemmhofbildung durch VersaBond AB-Testzylinder auf *S. epidermidis*-beimpfter Mueller-Hinton-Agar-Platte nach 24h Diffusion/Inkubation

4.3.1 Refobacin Palacos R (Biomet Merck)

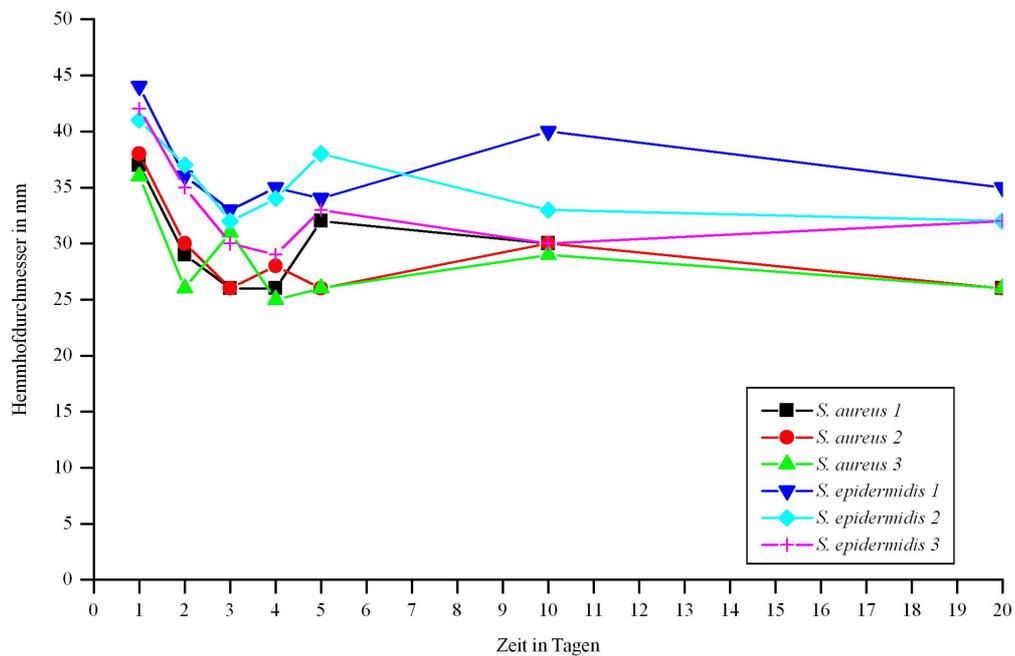


Abbildung 14. Hemmhofdurchmesser, gebildet durch Testzylinder aus Refobacin Palacos R

Zeit in Tagen	<i>S. aureus 1</i>	<i>S. aureus 2</i>	<i>S. aureus 3</i>	<i>S. epidermidis 1</i>	<i>S. epidermidis 2</i>	<i>S. epidermidis 3</i>
1	37	38	36	44	41	42
2	29	30	26	36	37	35
3	26	26	31	33	32	30
4	26	28	25	35	34	29
5	32	26	26	34	38*	33
10	30	30	29	40	33	30
20	26	26	26	35	32	32

Tabelle 15. Hemmhofdurchmesser in mm, gebildet durch Testzylinder aus Refobacin Palacos R. *Aussaat zu dünn

4.3.2 VersaBond AB (Smith & Nephew)

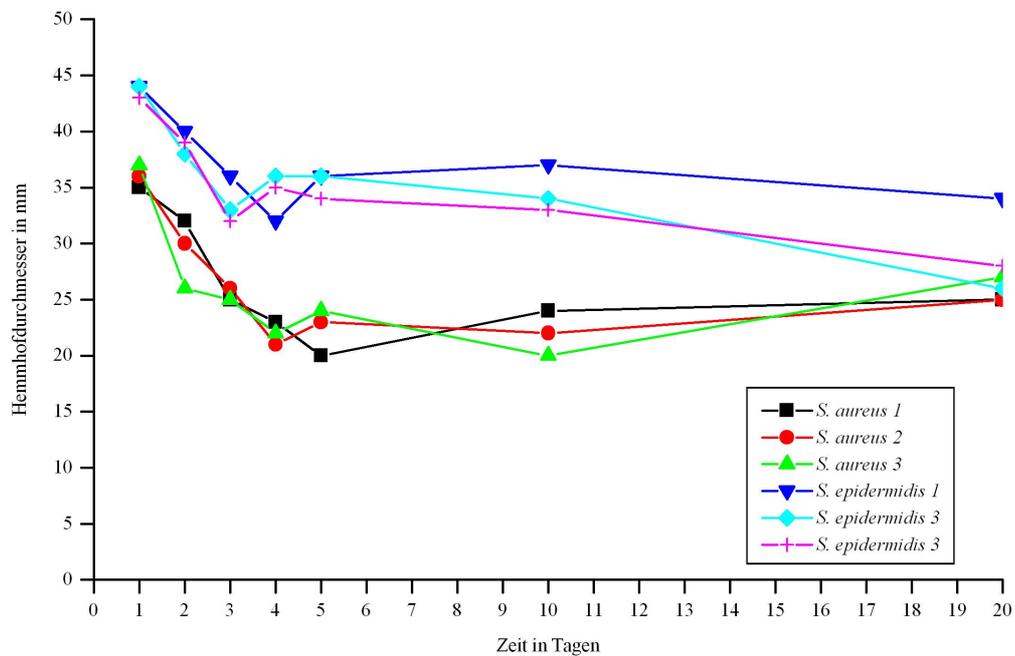


Abbildung 15. Hemmhofdurchmesser, gebildet durch Testzylinder aus VersaBond AB

Zeit in Tagen	<i>S. aureus 1</i>	<i>S. aureus 2</i>	<i>S. aureus 3</i>	<i>S. epidermidis 1</i>	<i>S. epidermidis 2</i>	<i>S. epidermidis 3</i>
1	35	36	37	44	44	43
2	32	30	26	40	38	39
3	25	26	25	36	33	32
4	23	21	22	32	36	35
5	20	23	24	36	36*	34
10	24	22	20	37	34	33
20	25	25	27	34	26	28

Tabelle 16. Hemmhofdurchmesser in mm, gebildet durch Testzylinder aus VersaBond AB. *Aussaat zu dünn

4.3.3 Palacos mit Gentamicin (Schering)

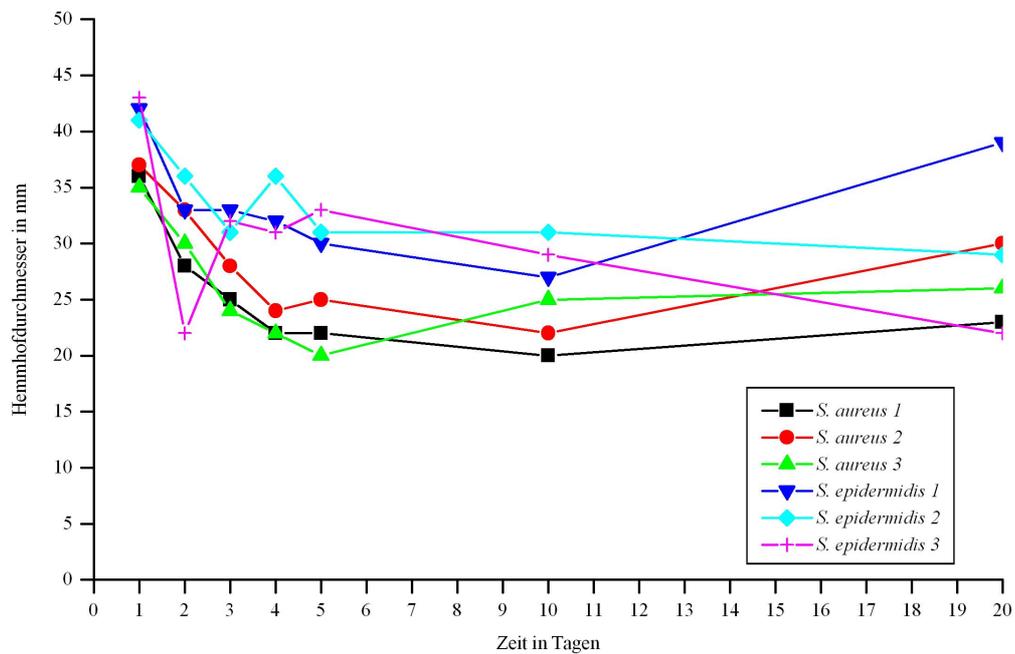


Abbildung 16. Hemmhofdurchmesser, gebildet durch Testzylinder aus Palacos mit Gentamicin

Zeit in Tagen	<i>S. aureus 1</i>	<i>S. aureus 2</i>	<i>S. aureus 3</i>	<i>S. epidermidis 1</i>	<i>S. epidermidis 2</i>	<i>S. epidermidis 3</i>
1	36	37	35	42	41	43
2	28	33	30	33	36	22
3	25	28	24	33	31	32
4	22	24	22	32	36	31
5	22	25	20	30	31	33
10	20	22	25	27	31	29
20	23	30	26	39*	29	22

Tabelle 17. Hemmhofdurchmesser in mm, gebildet durch Testzylinder aus Palacos mit Gentamicin.

*Aussaat zu dünn

4.4 Bakteriell Wachstum im Grasso-Modell

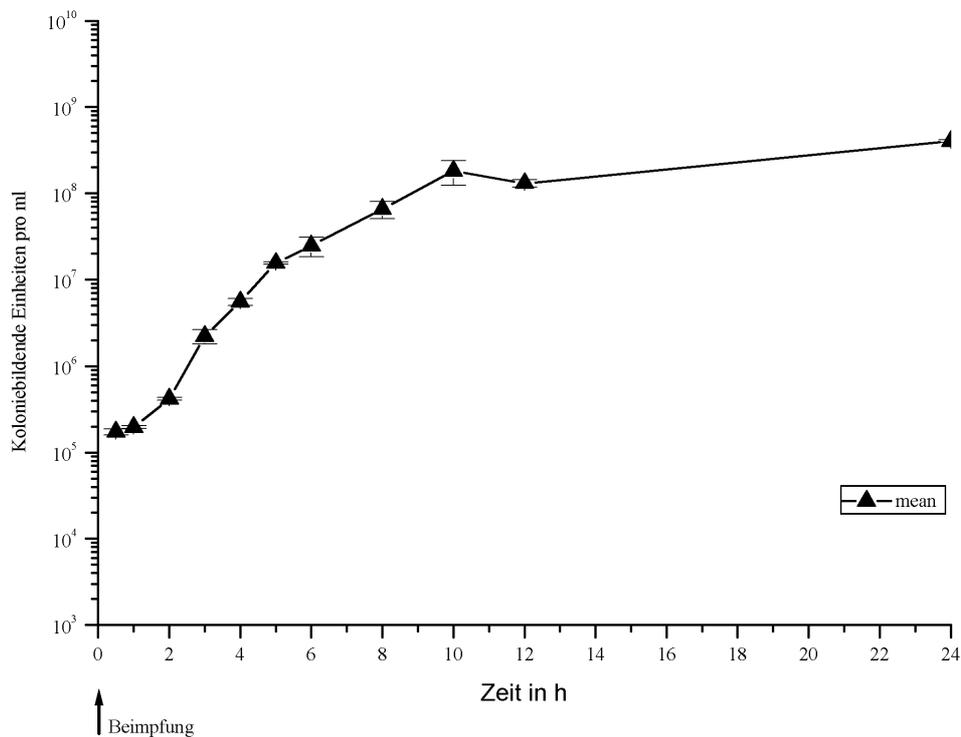


Abbildung 17. Bakteriell Wachstum im Grasso-Modell nach einmaliger Zugabe von Bakterien zum Zeitpunkt $t=0$.

Zeit in h	Gefäß 1 (KBE)	Gefäß 2 (KBE)	mean	sd (yEr±)	se (yEr±)
0,5	1,83E+05	1,63E+05	1,73E+05	1,46E+04	1,03E+04
1	1,92E+05	2,01E+05	1,96E+05	6,72E+03	4,75E+03
2	4,27E+05	4,06E+05	4,17E+05	1,51E+04	1,07E+04
3	1,92E+06	2,51E+06	2,22E+06	4,17E+05	2,95E+05
4	5,91E+06	5,19E+06	5,55E+06	5,09E+05	3,60E+05
5	1,52E+07	1,60E+07	1,56E+07	5,66E+05	4,00E+05
6	2,04E+07	2,92E+07	2,48E+07	6,21E+06	4,39E+06
8	5,55E+07	7,65E+07	6,60E+07	1,48E+07	1,05E+07
10	1,41E+08	2,23E+08	1,82E+08	5,80E+07	4,10E+07
12	1,40E+08	1,22E+08	1,31E+08	1,26E+07	8,92E+06
24	4,14E+08	3,92E+08	4,03E+08	1,53E+07	1,09E+07

Tabelle 18. Bakteriell Wachstum im Grasso-Modell nach einmaliger Zugabe von Bakterien zum Zeitpunkt $t=0$.

Das bakterielle Wachstum im Grasso-Modell ohne Einfluß eines Fremdkörpers wurde gemessen (Abb. 17, Tab. 18). Der Graph demonstrierte eine normale bakterielle Wachstumskurve mit Verzögerungs(lag)-, exponentieller und stationärer Phase. Eine Absterbephase war in dem untersuchten Zeitraum nicht zu erkennen, da durch permanente Zufuhr frischer Nährlösung keine Erschöpfung der Nährstoffe auftrat.

4.5 Infektionsversuche (Teil 1)

			<i>S. epidermidis</i> Stamm 1		<i>S. epidermidis</i> Stamm 2		<i>S. epidermidis</i> Stamm 3	
			24h	48h	24h	48h	24h	48h
Refobacin Palacos R	Eluat		-	96	-	731	-	5
	Plättchen 1	1. Spülen	-	58	-	4	-	-
		2. Spülen	-	-	-	-	-	-
		Ultraschall	-	-	-	-	-	-
	Plättchen 2	1. Spülen	-	1	-	11	-	-
		2. Spülen	-	-	-	1	-	2
Ultraschall		-	-	-	-	-	-	
VersaBond AB	Eluat		-	4,6·10 ⁶	-	4,8·10 ⁶	-	11
	Plättchen 1	1. Spülen	-		-		-	7
		2. Spülen	-		-		-	-
		Ultraschall	-	26·10 ³	-	66·10 ³	-	-
	Plättchen 2	1. Spülen	-		-		-	8
		2. Spülen	-		-		-	-
Ultraschall		-	10·10 ³	-	242·10 ³	-	-	
VersaBond mit 1g Clindamycin	Eluat		1	-	-	1	1	-
	Plättchen 1	1. Spülen	-	-	-	-	-	-
		2. Spülen	-	-	-	-	-	-
		Ultraschall	-	-	-	-	-	-
	Plättchen 2	1. Spülen	-	-	-	-	-	-
		2. Spülen	-	-	-	-	-	-
Ultraschall		-	-	-	-	-	-	
Palacos R	Eluat		9,4·10 ⁶	21,8·10 ⁶	16·10 ⁶	29,6·10 ⁶	14,1·10 ⁶	42,5·10 ⁶
	Plättchen 1	Ultraschall	47·10 ³	6,1·10 ⁶	111·10 ³	203·10 ³	123·10 ³	496·10 ³
	Plättchen 2	Ultraschall	128·10 ³	7,1·10 ⁶	4,3·10 ³	105·10 ³	20·10 ³	1,4·10 ⁶
VersaBond	Eluat							
	Plättchen 1	Ultraschall	30·10 ³	2,3·10 ⁶	50·10 ³	96·10 ³	76·10 ³	257·10 ³
	Plättchen 2	Ultraschall	128·10 ³	1,2·10 ⁶	95·10 ³	60·10 ³	4,0·10 ³	30·10 ⁶

Tabelle 19. Bakteriellies Wachstum im Grasso-Modell (im Eluat und auf den Testzylindern) nach simulierter Infektion/Kontamination zum Zeitpunkt t=0. Angaben bei Eluat beziehen sich auf 100µl. Angaben bei Ultraschall sind absolute Zahlen.

In den Infektionsversuchen wurde eine Infektion/Kontamination zum Zeitpunkt 0 (in vivo: Zeitpunkt der Operation) gesetzt, um zu untersuchen, ob ein bakterielles Wachstum nach 24 und mehr Stunden im Inkubationsgefäß und in Form eines Biofilms auf den Prüfzylindern nachzuweisen war (Tab. 19).

Palacos R und VersaBond ohne Antibiotika zeigten keine antimikrobielle Wirkung. Prüfzylinder und Eluat waren nach 24 und 48 Stunden dicht bewachsen.

Bei den Antibiotika-haltigen Knochenzementen war nach 24 Stunden weder im Eluat noch auf den Prüfzylindern bakterielles Wachstum nachweisbar. Nach 48 Stunden waren je nach Bakterienstamm und Knochenzement unterschiedlich Bakterien im Eluat und teilweise auch auf den Prüfzylindern gewachsen.

Der Clindamycin-haltige Knochenzement verhinderte bakterielles Wachstum über deutlich längere Zeit als Gentamicin-haltiger Knochenzement.

4.6 Infektionsversuche (Teil 2)

4.6.1 Palacos R

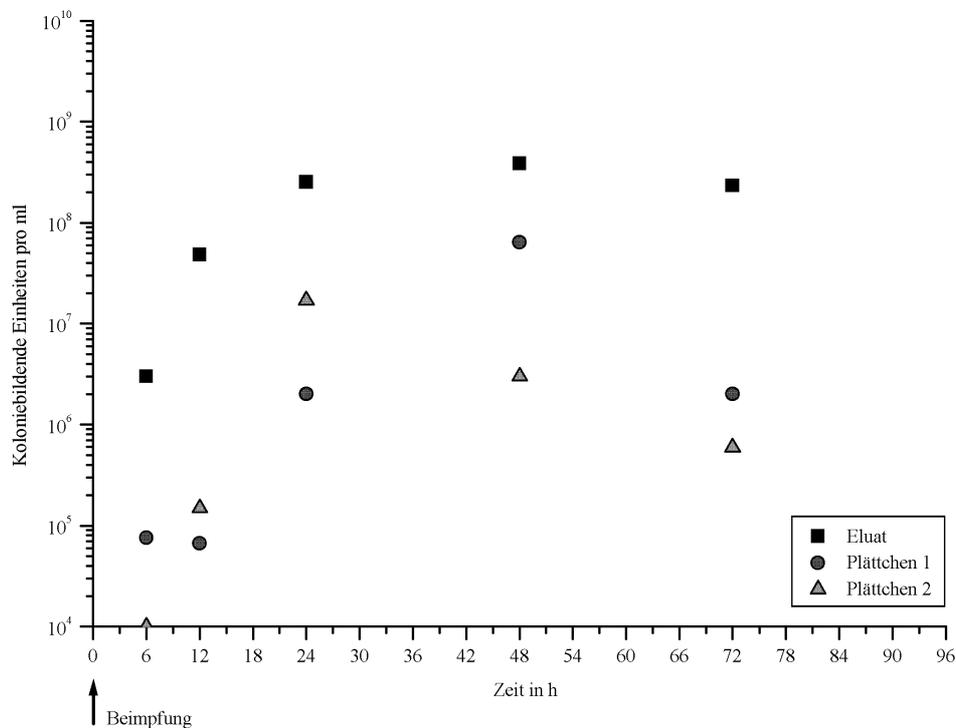


Abbildung 18. Bakteriellcs Wachstum im Eluat und auf Testzylindern aus Palacos R nach einmaliger Zugabe von *S. epidermidis*

Zeit in h	Eluat	Plättchen 1	Plättchen 2
6	3,00E+06	7,60E+04	1,00E+04
12	4,80E+07	6,70E+04	1,49E+05
24	2,51E+08	2,00E+06	1,70E+07
48	3,84E+08	6,40E+07	3,00E+06
72	2,32E+08	2,00E+06	5,95E+05

Tabelle 20. Bakteriellcs Wachstum im Eluat und auf Testzylindern aus Palacos R nach einmaliger Zugabe von *S. epidermidis*

Dieser Antibiotika-freie Knochenzement hatte keine antimikrobielle Wirkung. Nach einmaligem Beimpfen begann das bakterielle Wachstum im Eluat und als Biofilm auf den Testzylindern. Das Wachstum im Eluat war exponentiell (Abb. 18, Tab. 20).

4.6.2 Refobacin Palacos R

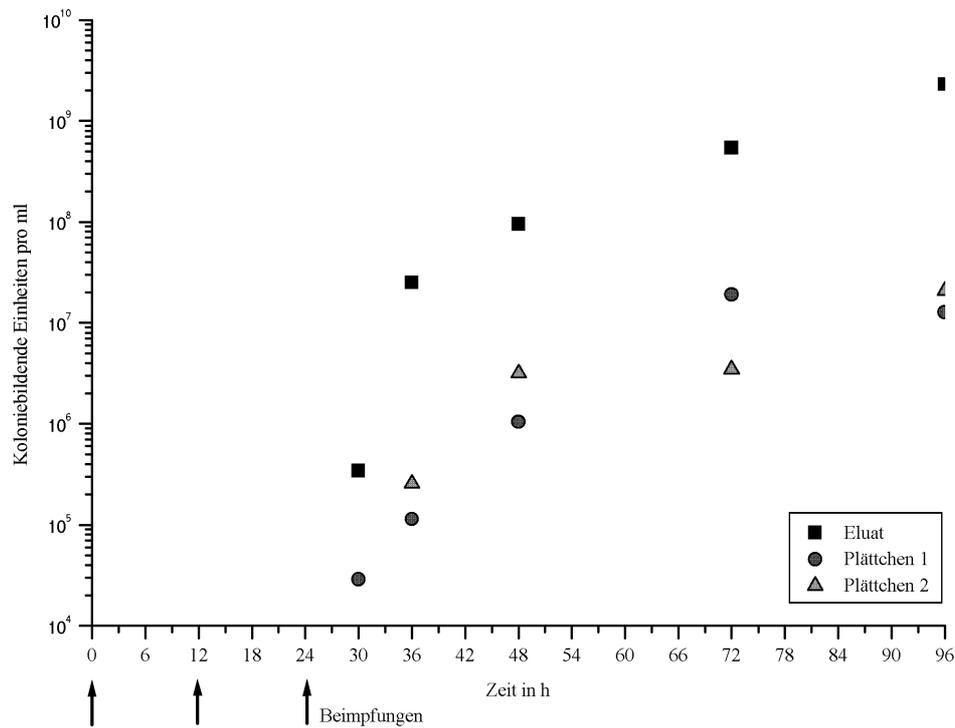


Abbildung 19. Bakterielleres Wachstum im Eluat und auf Testzylindern aus Refobacin Palacos R nach dreimaliger Zugabe von *S. epidermidis*

Zeit in h	Eluat	Plättchen 1	Plättchen 2
30	3,43E+05	2,87E+04	--
36	2,50E+07	1,14E+05	2,57E+05
48	9,50E+07	1,05E+06	3,17E+06
72	5,39E+08	1,91E+07	3,47E+06
96	2,30E+09	1,28E+07	2,09E+07

Tabelle 21. Bakterielleres Wachstum im Eluat und auf Testzylindern aus Refobacin Palacos R nach dreimaliger Zugabe von *S. epidermidis*

Nach dreimaligem Beimpfen zeigte sich bakterielleres Wachstum im Eluat und als Biofilm auf den Testzylindern. Das Wachstum im Eluat war exponentiell (Abb. 19, Tab. 21).

4.6.3 VersaBond

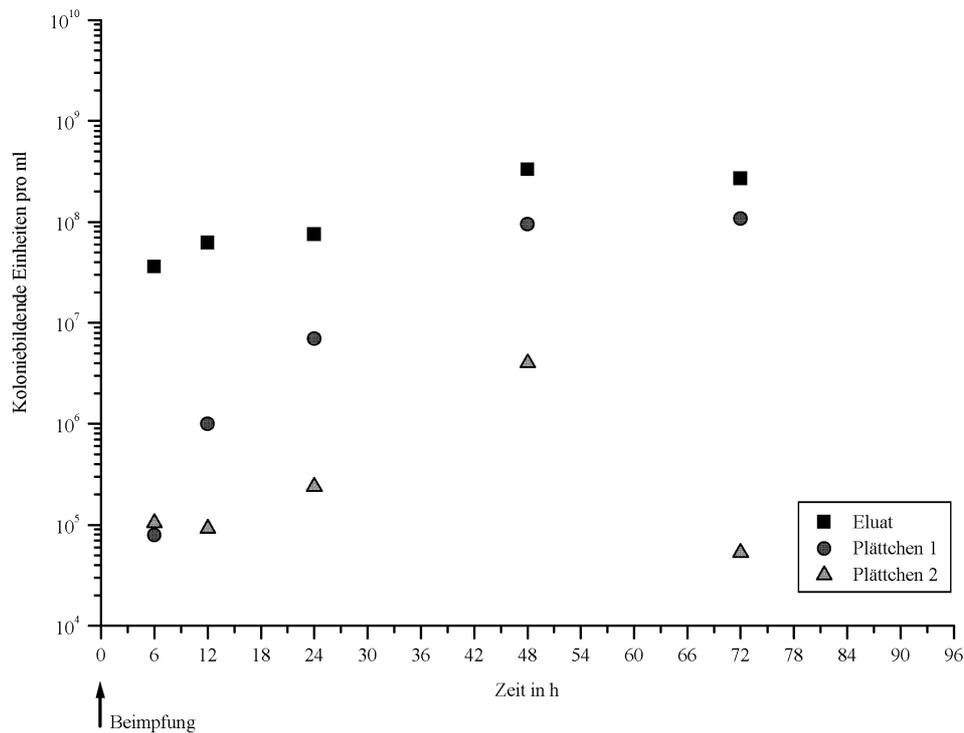


Abbildung 20. Bakteriell Wachstum im Eluat und auf Testzylindern aus VersaBond nach einmaliger Zugabe von *S. epidermidis*

Zeit in h	Eluat	Plättchen 1	Plättchen 2
6	3,60E+07	7,90E+04	1,04E+05
12	6,20E+07	1,00E+06	9,20E+04
24	7,50E+07	7,00E+06	2,39E+05
48	3,30E+08	9,50E+07	4,00E+06
72	2,68E+08	1,08E+08	5,30E+04

Tabelle 22. Bakteriell Wachstum im Eluat und auf Testzylindern aus VersaBond nach einmaliger Zugabe von *S. epidermidis*

Der Antibiotika-freie Knochenzement hatte keine antimikrobielle Wirkung. Bereits nach einmaligem Beimpfen begann sowohl im Eluat als auch auf den Testzylindern bakterielles Wachstum. Das Wachstum im Eluat erfolgte exponentiell (Abb. 20, Tab. 22).

4.6.4 VersaBond AB

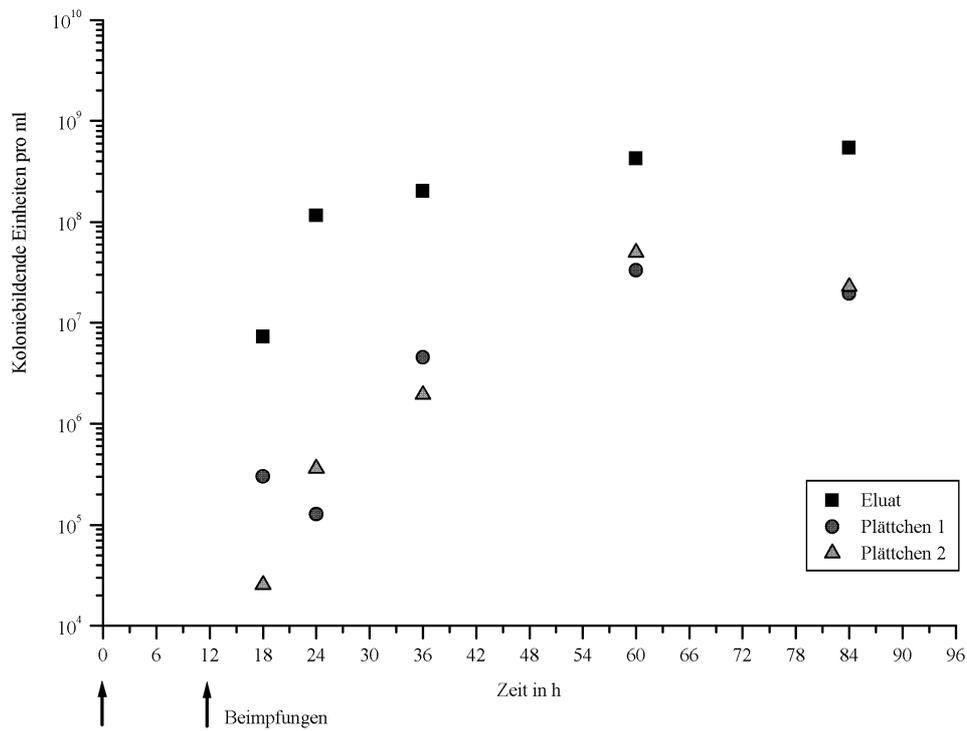


Abbildung 21. Bakteriellles Wachstum im Eluat und auf Testzylindern aus VersaBond AB nach zweimaliger Zugabe von *S. epidermidis*

Zeit in h	Eluat	Plättchen 1	Plättchen 2
18	7,29E+06	3,00E+05	2,55E+04
24	1,16E+08	1,27E+05	3,61E+05
36	2,01E+08	4,54E+06	1,94E+06
60	4,23E+08	3,31E+07	4,98E+07
84	5,41E+08	1,94E+07	2,27E+07

Tabelle 23. Bakteriellles Wachstum im Eluat und auf Testzylindern aus VersaBond AB nach zweimaliger Zugabe von *S. epidermidis*

Nach zweimaligem Beimpfen begann das bakterielle Wachstum sowohl im Eluat als auch auf den Testzylindern. Das Wachstum im Eluat verlief exponentiell (Abb. 21, Tab. 23).

4.6.5 VersaBond mit 2g Gentamicin

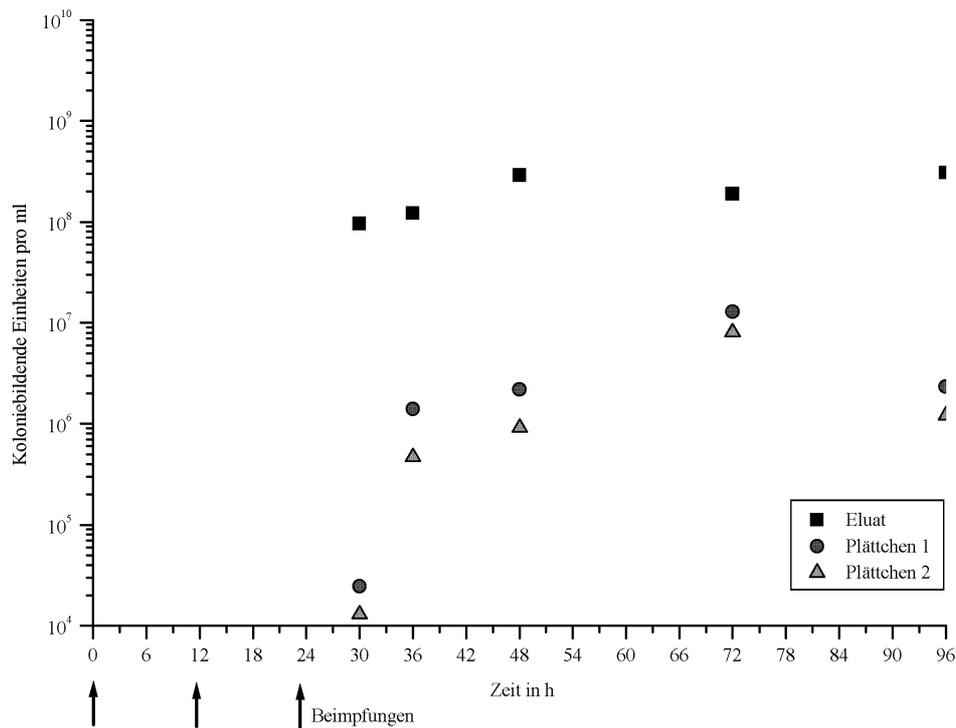


Abbildung 22. Bakteriellcs Wachstum im Eluat und auf Testzylindern aus VersaBond mit 2g Gentamicin nach dreimaliger Zugabe von *S. epidermidis*

Zeit in h	Eluat	Plättchen 1	Plättchen 2
30	9,57E+07	2,45E+04	1,30E+04
36	1,22E+08	1,40E+06	4,68E+05
48	2,88E+08	2,20E+06	9,13E+05
72	1,89E+08	1,29E+07	8,07E+06
96	3,07E+08	2,33E+06	1,21E+06

Tabelle 24. Bakteriellcs Wachstum im Eluat und auf Testzylindern aus VersaBond mit 2g Gentamicin nach dreimaliger Zugabe von *S. epidermidis*

Nach dreimaligem Beimpfen begann bakteriellcs Wachstum, das sich exponentiell verhielt. Der Verlauf des Graphen ließ vermuten, daß bereits vor der dritten Beimpfung bakteriellcs Wachstum erfolgte (Abb. 22, Tab. 24).

4.7 Fluoreszenzmikroskopie

Der Biofilm wurde qualitativ mit einem live/dead-Farbstoff mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Auf den unbeladenen Testzylindern zeigten sich zahlreiche grün gefärbte (lebende) Bakterien (Abb. 23).

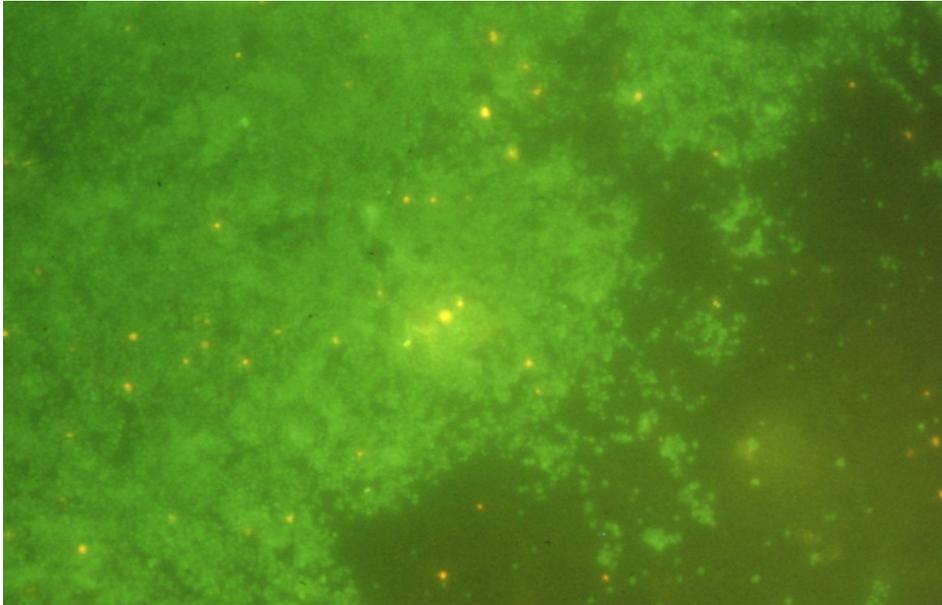


Abbildung 23. *S. epidermidis* auf VersaBond, 24h nach Infektion

Dagegen fanden sich auf den Gentamicin-haltigen Testzylindern 24h nach Infektion kaum grün (lebende), aber vermehrt rot gefärbte (tote) Bakterien (Abb. 24).

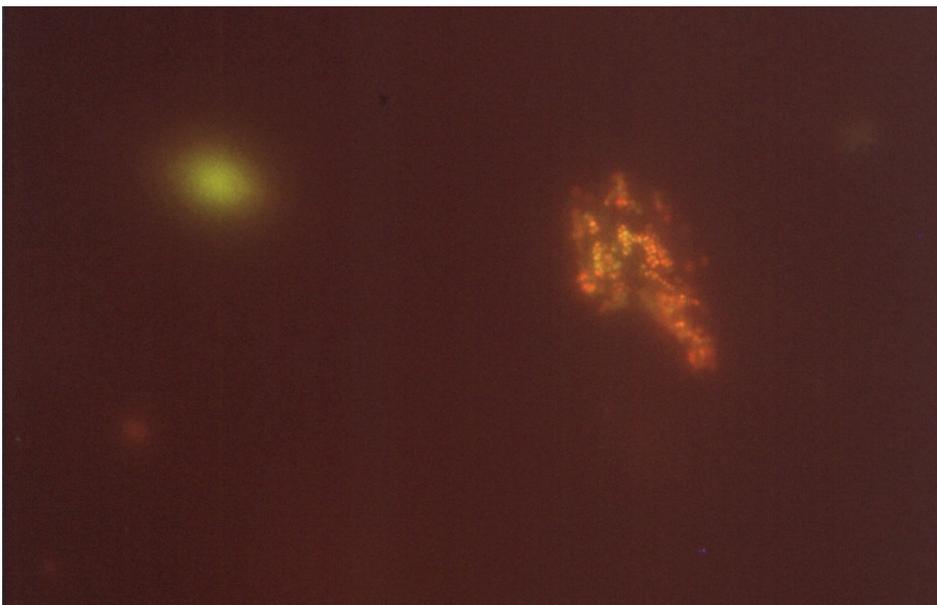


Abbildung 24. *S. epidermidis* auf VersaBond AB, 24h nach Infektion

72 Stunden nach Infektion fanden sich auf den Gentamicin-haltigen Testzylindern jedoch vermehrt grün gefärbte (lebende) Bakterien (Abb. 25).

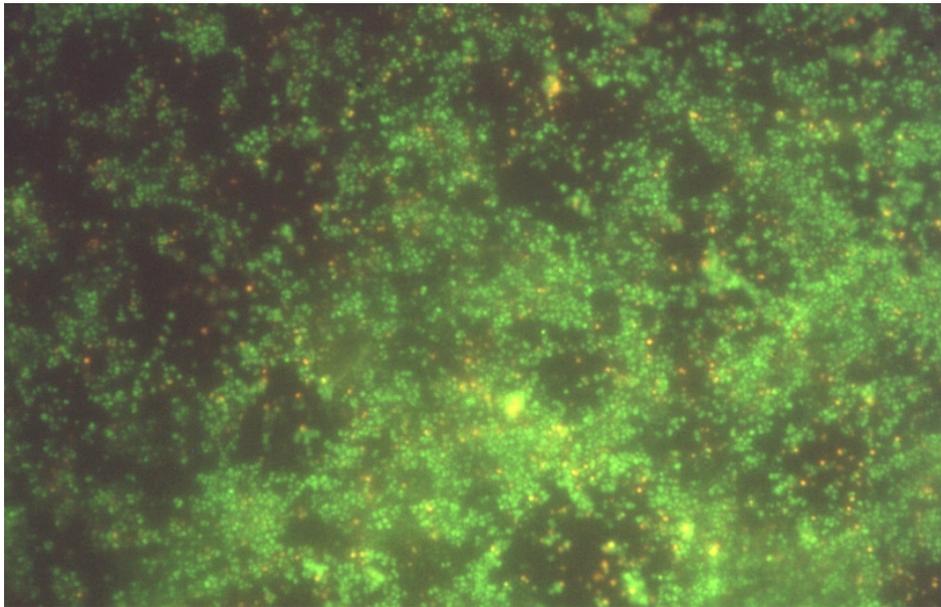


Abbildung 25. *S. epidermidis* auf VersaBond AB, 72h nach Infektion

Auf dem Clindamycin-haltigen Testzylinder konnten nur wenige rot gefärbte (tote), jedoch keine grün gefärbten (vitalen) Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 26).

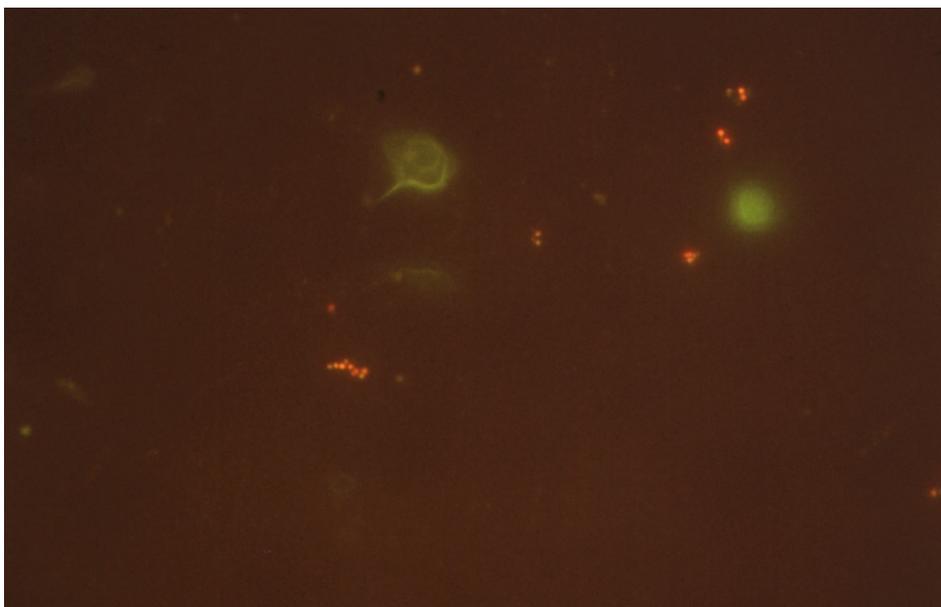


Abbildung 26. *S. epidermidis* auf VersaBond mit Clindamycin, 72h nach Infektion

4.8 Rasterelektronenmikroskopie

VersaBond ohne simulierte Infektion: Das Bild zeigt die Oberfläche eines Testzylinders. Die sphärischen Körper auf der Oberfläche sind Polymerkugeln verschiedener Größen (Abb. 27).

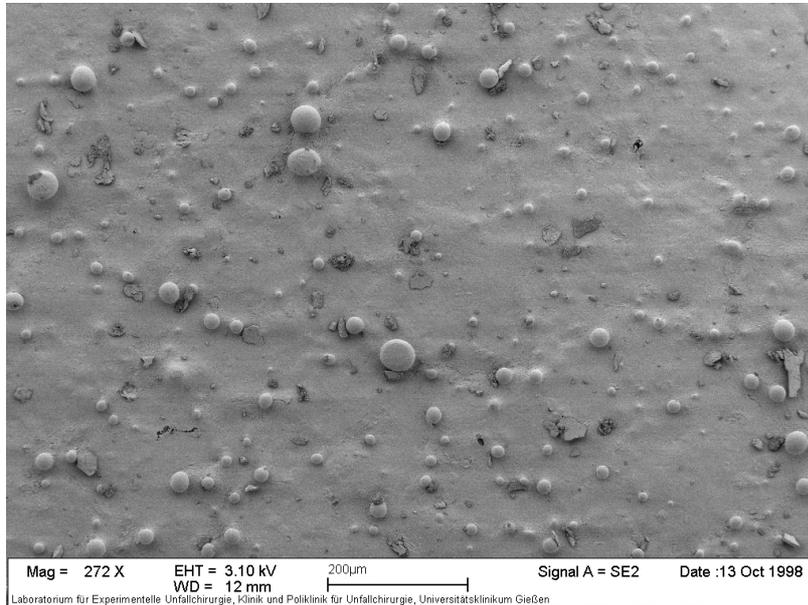


Abbildung 27. VersaBond, keine simulierte Infektion

VersaBond (Antibiotikum-frei), 72h nach in 12stündigen Intervallen wiederholter Infektion: Die Bilder zeigen eine dichte bakterielle Besiedelung der Testzylinderoberfläche. Man erkennt Teilungsfiguren. Ein Biofilm hat sich gebildet (Abb. 28-30).

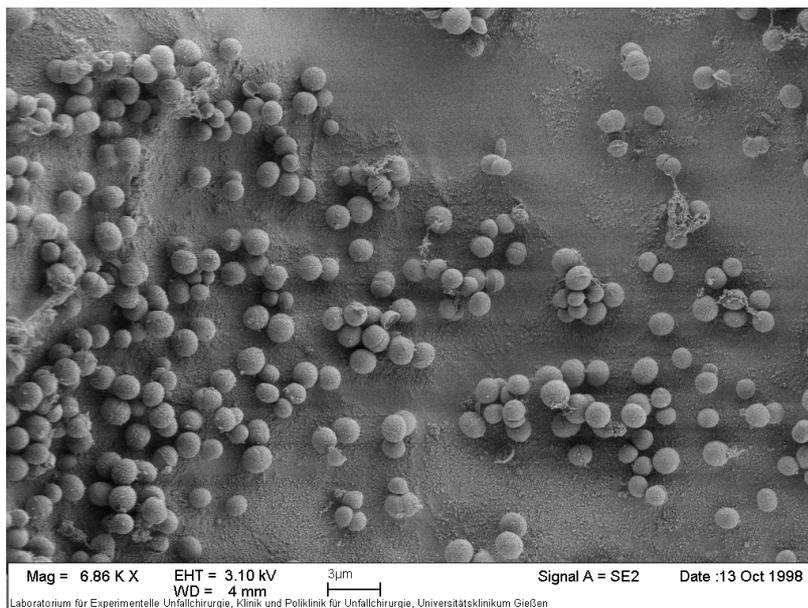


Abbildung 28. VersaBond (unbeladen), 72h nach in 12stündigen Intervallen wiederholter Infektion

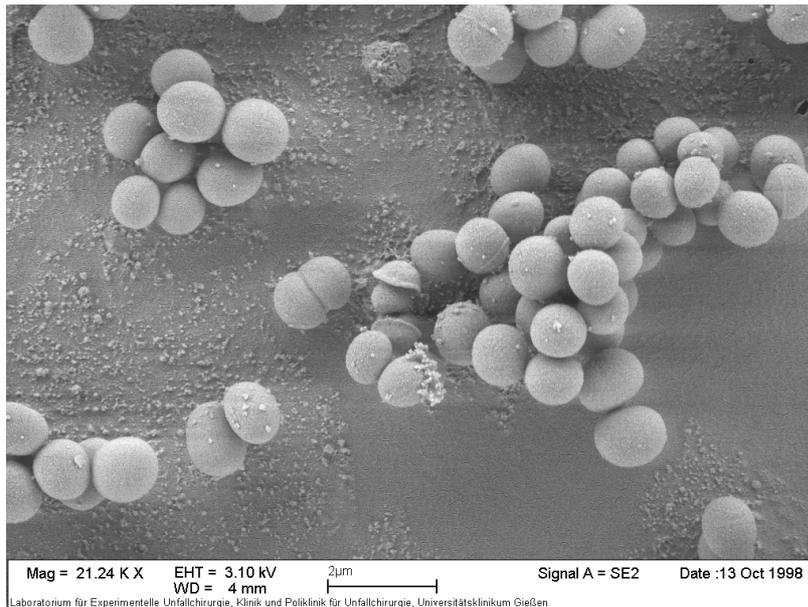


Abbildung 29. VersaBond (unbeladen), 72h nach in 12stündigen Intervallen wiederholter Infektion

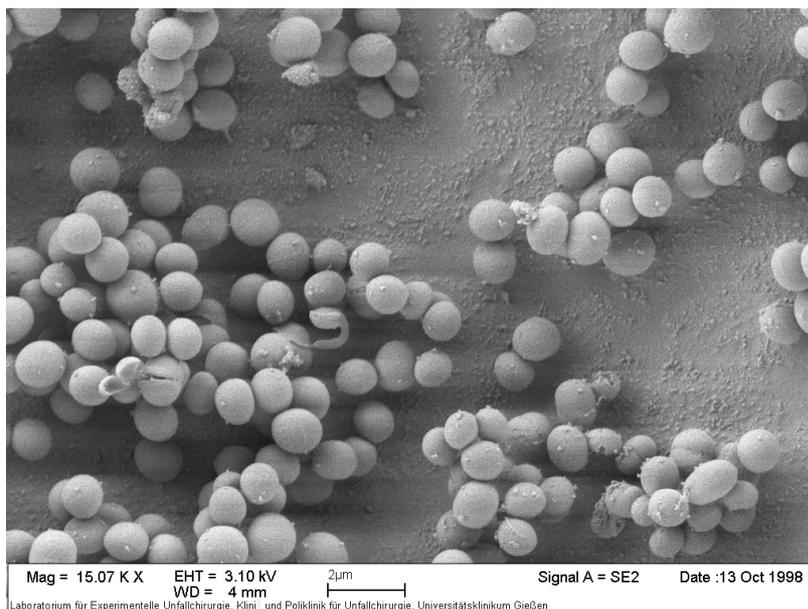


Abbildung 30. VersaBond (unbeladen), 72h nach in 12stündigen Intervallen wiederholter Infektion

VersaBond AB, 72h nach in 12stündigen Intervallen wiederholter Infektion: Die Bilder zeigen eine dünne bakterielle Besiedelung der Testzylinderoberfläche mit bakteriellen Teilungsfiguren und Bildung eines Biofilms (Abb. 31-34).

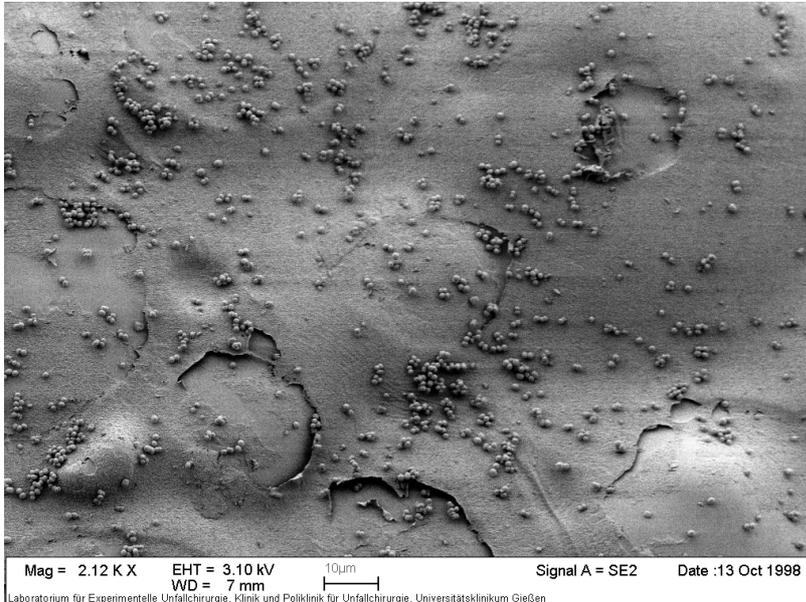


Abbildung 31. VersaBond AB, 72h nach in 12stündigen Intervallen wiederholter Infektion

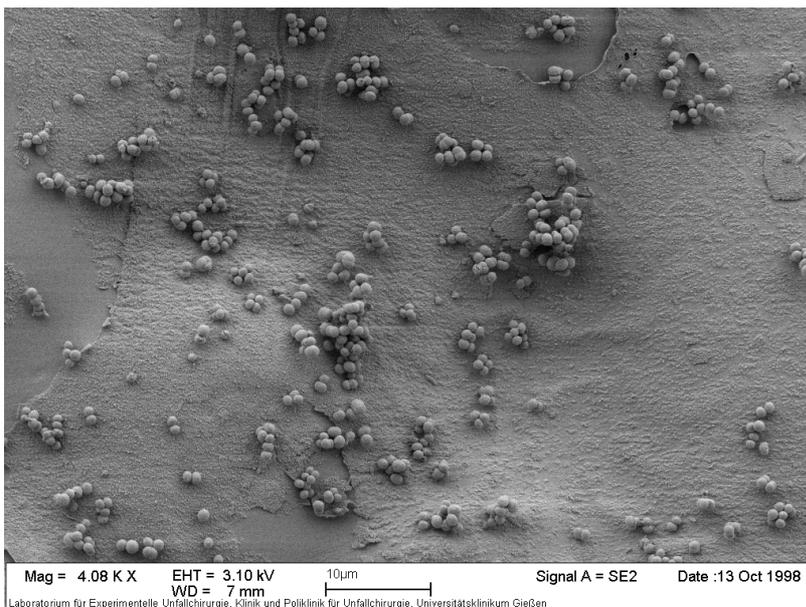


Abbildung 32. VersaBond AB, 72h nach in 12stündigen Intervallen wiederholter Infektion

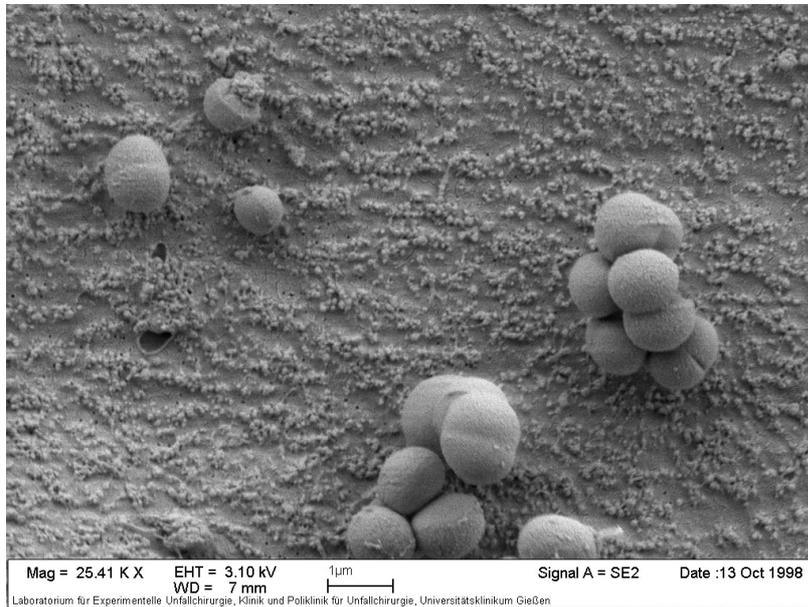


Abbildung 33. VersaBond AB, 72h nach in 12stündigen Intervallen wiederholter Infektion

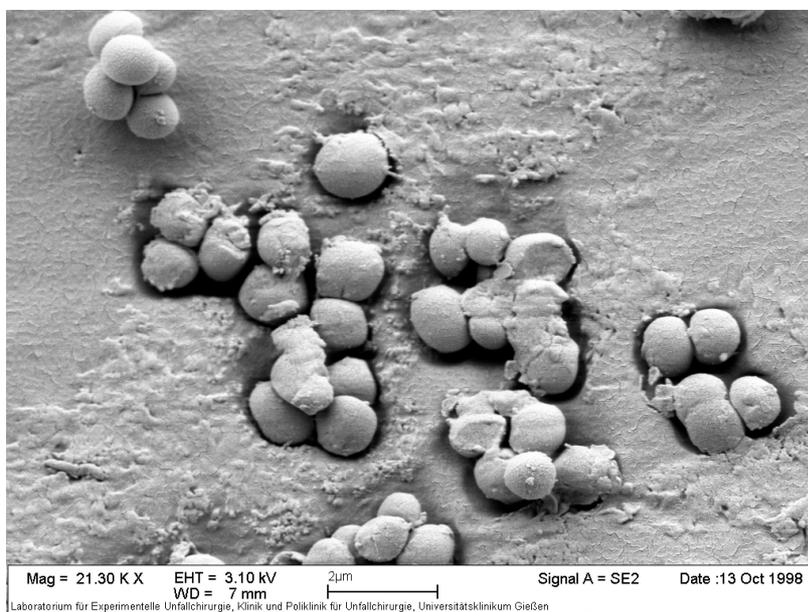


Abbildung 34. VersaBond AB, 72h nach in 12stündigen Intervallen wiederholter Infektion

VersaBond mit 1g Clindamycin, 72h nach in 12stündigen Intervallen wiederholter Infektion: Auf dem Testzylinder sind vereinzelt Staphylokokken zu finden, um die sich ein Biofilm gebildet hat (Abb. 35-36).

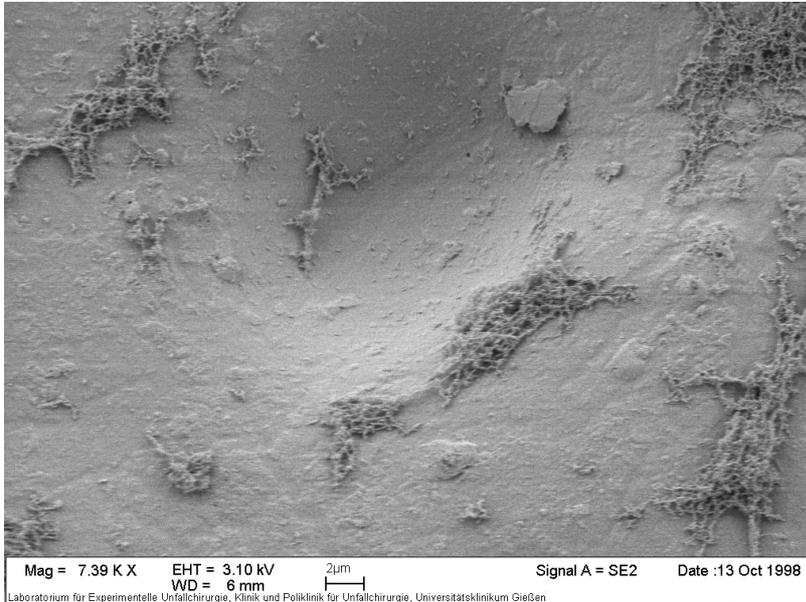


Abbildung 35. VersaBond mit 1g Clindamycin, 72h nach in 12stündigen Intervallen wd. Infektion

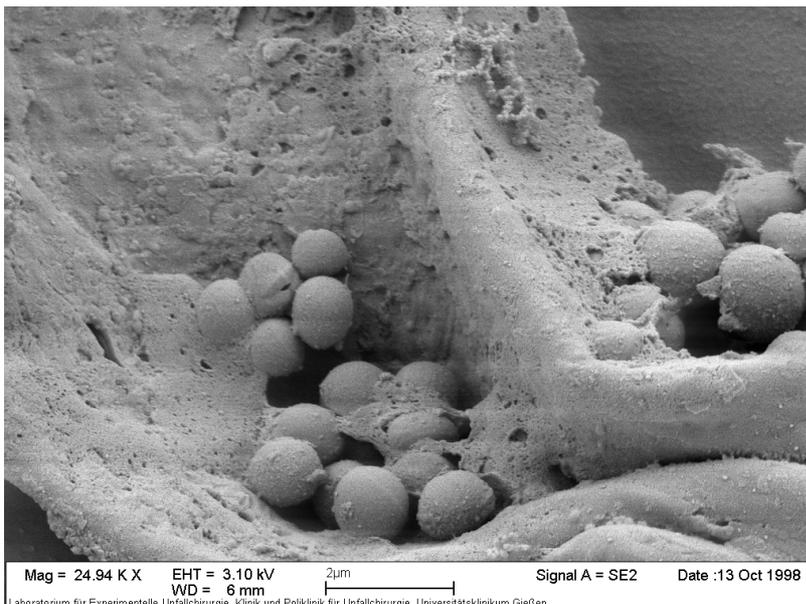


Abbildung 36. VersaBond mit 1g Clindamycin, 72h nach in 12stündigen Intervallen wd. Infektion

5 Diskussion

5.1 Antibiotika-haltige Knochenzemente

5.1.1 Geschichtlicher Überblick

Zur Behandlung und Prophylaxe chirurgischer Infektionen werden lokale Antiinfektiva seit langem verwendet. Alexander Fleming setzte bereits während des Ersten Weltkriegs lokale Antiseptika (Seife, Ether, Flavin [Farbstoff], BIPP [Jodoform, Wismuth, Paraffin]) bei chronisch infizierten Wunden ein, erzielte damit zwar keine Keimfreiheit, erreichte aber eine Reduktion der Keimlast (FLEMING, 1919-1920).

1935 kamen die Sulfonamide als erste Chemotherapeutika zur klinischen Anwendung. Ihre Instillation nach sorgfältigem Débridement, nach Blutstillung und primärem Wundverschluß reduzierte die Infektionsrate bei offenen Frakturen (JENSEN et al., 1939). Mit der Einführung der systemischen Antibiotikatherapie sank das Interesse an der lokalen Wundbehandlung. Trotzdem blieb die Behandlung der Osteomyelitis problematisch. 1962 wurde die Saug-Spül-Drainage eingeführt (WILLENEGGER et al., 1962), mit deren Spülflüssigkeit Antibiotika instilliert wurden. Mit ihr konnten nach Débridement lokal hohe Spiegel an Antibiotika erreicht werden. KLEMM (1979) führte die Reduktion der Keimlast nicht auf die Antibiotikawirkung, sondern auf den Spüleffekt zurück. Nachteile dieser Behandlung sind die Wartungsintensität und die hohe Belastung für die Patienten. Eine andere Methode zur Behandlung einer Osteomyelitis der unteren Extremität war die isolierte Perfusion (Tourniquet, Perfusion über die zuführende Arterie, Abfluß über die Vene) (ORGAN, 1971).

Das Spektrum der Antibiotika, die zur lokalen Behandlung der Knocheninfektionen geeignet sind, war zu Beginn der 60er Jahre beschränkt. In erster Linie wurden Penicillin G, Chloramphenicol und Tetrazykline eingesetzt. Im Zuge der Entwicklung neuer systemischer Antibiotika (Anti-Staphylokokken- und Breitspektrum-Antibiotika, Cephalosporine, Lincosamide, Aminoglykoside, Carbapeneme, Fluorochinolone, Vancomycin) mit stärkerer Wirksamkeit gegen Staphylokokken und Gram-negative Bakterien, die Hauptverursacher von Knocheninfektionen, wurden die Methoden der Saug-Spül-Drainage und der isolierten Perfusion verlassen.

In Deutschland wurde der lokale Einsatz von Antibiotika zur Prävention und Behandlung von Knochen- und Weichteilinfektionen mit der Gelenkersatzchirurgie wiederentdeckt. Bei diesen Eingriffen sind Infektionen eine gefürchtete Komplikation.

1970 berichteten BUCHHOLZ et al. über die Depotwirkung von Antibiotika (Penicillin, Erythromycin und Gentamicin), die unter den Knochenzement, der zur Verankerung der Hüftarthroplastik diente, gemischt wurden. Durch die Diffusion in das umgebende Gewebe konnten über Monate hohe lokale Antibiotikaspiegel mit nur geringer systemischer Nebenwirkung erreicht werden. Der Erfolg war eine Reduktion der Zahl früher Protheseninfektionen. Dies führte zum Einsatz Antibiotika-haltigen Knochenzements auch bei der Behandlung der Osteomyelitis durch VOORHOEVE et al. (1973) und KLEMM (1979). Anfangs wurden die osteomyelitischen Höhlen nach Débridement mit einer Gentamicin-PMMA-Massivplombe gefüllt, später mit den heute gebräuchlichen Gentamicin-PMMA-Kugel-Ketten (Septopal-Ketten, Biomet Merck) (KLEMM, 1979).

Zur Zeit wird Antibiotika-haltiger Knochenzement hauptsächlich zur Prävention von Infektionen in der Gelenkersatzchirurgie eingesetzt, häufig in Kombination mit perioperativer systemischer Antibiotikaprophylaxe.

5.1.2 Eigenschaften

Knochenzement auf der Basis von polymerisiertem Methylmethacrylat (PMMA) ist nach wie vor das Mittel der Wahl zur Fixierung von Implantaten im Vollzementmantel. Nach Anmischen des Zweikomponentensystems, bestehend aus Pulver (Polymer) und Flüssigkeit (Methylmethacrylat), entsteht nach 5 bis 10 Minuten ein plastischer Teig, der als Verankerungsmedium in den Knochen eingebracht wird. Knochenzement auf Acryl-Basis ohne Zusatz von Antibiotika hat weder einen bakteriostatischen noch bakteriziden Effekt.

Voraussetzungen, die das im Knochenzement verwendete Antibiotikum erfüllen muß, sind pulverförmige Darreichungsform (da Lösungen sich nicht mit dem hydrophoben Monomer vermischen), Hitzestabilität (exotherme Polymerisation), chemische Stabilität, Diffusionsvermögen und Stabilität im menschlichen Körper. Die allergene Potenz sollte gering sein.

Kritisch muß die Beimischung von Antibiotika in Knochenzemente im Hinblick auf die Veränderungen der physikalischen Eigenschaften, wie Viskosität, Aushärtungszeit und mechanische Härte, betrachtet werden.

Zahlreiche Antibiotika wurden in in-vitro-Analysen auf Eigenschaften wie Stabilität im Zement und Elution aus dem Zement untersucht. Gentamicin-haltiger Knochenzement ist hinsichtlich der Untermischung und Freisetzung experimentell und klinisch besonders

intensiv untersucht und wird zur Zeit am häufigsten eingesetzt (BREUSCH et al., 2003; WAHLIG et al., 1980).

Weitere Untersuchungen zu Inkorporation und Elution existieren für Vancomycin, β -Laktam-Antibiotika (potentiell allergen) und Clindamycin. Beschränkte Aussagen liegen bisher für die Fluorochinolone vor. Erythromycin und Tetrazykline eluieren nur ungenügend aus dem Zement (WAHLIG et al., 1980; WININGER et al., 1996).

Die Elutionseigenschaften eines Antibiotikums hängen vom verwendeten Knochenzement, von der Konzentration des Antibiotikums im Zement und von der Zementoberfläche ab (BAKER et al., 1988; WININGER et al., 1996). Unklar ist der Elutionsvorgang: Früher wurde angenommen, daß das Antibiotikum durch Poren im Zement oder Diffusion durch die gesamte Matrix des PMMA freigesetzt wird („capillar action“). Neuere Arbeiten beschreiben eine Diffusion aus oberflächlichen Schichten, aber auch die Freisetzung durch kleine Tunnel und Risse im Zement („leakage“). Die PMMA-Matrix selbst ist undurchlässig (DOWNES et al., 1989; VAN DE BELT et al., 2001). BAKER et al. (1988) betrachten die Elution zunächst als ein Oberflächenphänomen mit nachfolgender Freisetzung durch Löcher, Risse und Defekte im Zement.

Die Freisetzung von Antibiotika aus Knochenzement verläuft biphasisch (WININGER et al., 1996). Während der größte Teil innerhalb der ersten Stunden bis Tage postoperativ freigesetzt wird, verläuft die restliche Freisetzung über Jahre (BREUSCH et al., 2003). Ein bedeutender Anteil verbleibt im Zement. In vitro Studien zeigten, daß nur 5-8% des im Knochenzement inkorporierten Gentamicins freigesetzt werden (VAN DE BELT et al., 2001). In einer Studie zur Gentamicin-Freisetzung aus Knochenzement bei Patienten nach totaler Hüftendoprothesen-Operation wurde nur ein geringer Teil (5-18%) des gesamten Gentamicins in Wunddrainagesekret und Urin wiedergefunden (TORHOLM et al., 1983).

5.1.3 Gewebepenetration

Zahlreiche Untersuchungen in Tiermodellen und am Menschen belegen die Diffusion von Antibiotika aus dem Knochenzement in das umgebende Gewebe (ADAMS et al., 1992; WAHLIG, 1981; WAHLIG et al., 1980). Die Konzentrationen in Hämatomen, Wundflüssigkeiten, Granulationsgewebe und im Knochen sind wochen- bis monatelang meßbar und stets höher als die Serumkonzentrationen. Abhängig von den untersuchten Antibiotika liegen die gemessenen Konzentrationen noch nach Tagen über der minimalen Hemmkonzentration.

Vorteile der lokalen Anwendung sind insbesondere auch die dabei nicht oder nur gering auftretenden systemischen Nebenwirkungen der Antibiotika. So können Oto- und Nephrotoxizität des lokal implantierten Gentamicins unberücksichtigt bleiben.

5.1.4 Klinische Anwendungen

Die Hauptindikationen für Antibiotika-haltigen Knochenzement sind Infektionsprophylaxe und Behandlung von Infektionen in der Endoprothetik, Infektionsprophylaxe bei Rekonstruktion offener Frakturen und Behandlung der chronischen Osteomyelitis.

Der heute gebräuchlichste Antibiotikum-haltige Knochenzement enthält Gentamicin. Ein neuer Zement von Biomet Merck enthält eine Kombination aus Gentamicin und Clindamycin (Copal, Fa. Biomet Merck).

Gentamicin, ein Aminoglykosid, wirkt bakterizid, vor allem über die Hemmung der ribosomalen Proteinbiosynthese. Das Wirkungsspektrum umfaßt aerobe Gram-positive und -negative Bakterien unter Einschluß Methicillin-empfindlicher Staphylokokken und entspricht dem häufig anzutreffenden Keimspektrum bei Knocheninfektionen.

5.1.5 Arthroplastik

Studien an Tier und Mensch beweisen die Wirksamkeit der Zugabe von Gentamicin zum Knochenzement zur Prävention von Frühinfekten nach Implantation von Endoprothesen (JOSEFSSON et al., 1981; MALCHAU et al., 1998). Bei vergleichenden Studien zum (alternativen, postoperativen) Einsatz systemischer Antibiotika (Penicillin G/Cephalosporine) zeigen sich keine Unterschiede in der Rate der Infektionen. Studien zum gleichzeitigen Einsatz beider Verfahren (systemisch und lokal) gibt es nicht.

Allerdings wird der prophylaktische Einsatz von Antibiotika bei fehlender Infektion wegen einer möglichen Resistenzentwicklung auch kritisch gesehen (DUNCAN et al., 1994). Protrahierte Exposition von Staphylokokkenarten gegenüber Aminoglykosiden induziert/selektiert die Bildung von Kleinzellvarianten (small cell variants, SCV) der Staphylokokken, die intrazellulär persistieren und chronische Entzündungen verursachen können (PROCTOR et al., 1998; VON EIFF et al., 1997; VON EIFF et al., 1998).

Trotz dieser Bedenken muß alles für das Gelingen und den Erfolg der Operation getan werden, um eine Revisions- bzw. eine Wechseloperation mit den damit verbundenen Risiken

für die häufig alten Patienten (Narkose, Wundinfektionen, Morbidität, Mortalität) zu vermeiden.

5.1.6 Risiken und Probleme

Die Nebenwirkungen der lokalen Applikation Antibiotika-haltigen Zements sind ohne Zweifel geringer als bei ihrer systemischen Anwendung.

Die Tatsache, daß es sich sowohl bei der Prothese als auch beim Knochenzement um Fremdkörper handelt, an die sich wiederum Bakterien leicht anhaften können, muß allerdings bedacht werden (schleichende TEP-Lockerung?).

In-vitro-Versuche (KENDALL et al., 1996) zeigten, daß Bakterien auf Antibiotika-haltigem Knochenzement überlebten. Bei sorgfältiger Untersuchung Gentamicin-haltiger PMMA-Kugeln, die zur lokalen Antibiotikatherapie bei der zweizeitigen Behandlung einer infizierten Prothese (Hüfte, Knie, Schulter) eingebracht wurden, waren Bakterien, am häufigsten *Staphylococcus epidermidis*, daneben aber auch, wenn auch seltener, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp., *Comamonas acidovorans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus sanguis* und *Peptostreptococcus magnus*, auf den Kugeloberflächen nachweisbar (NEUT et al., 2001). Diese seltener gefundenen Erreger sind primär oder sekundär unempfindlich gegenüber Aminoglykosiden.

Die Gefahr einer Resistenzentwicklung bei den Staphylokokkenarten (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*), die ätiologisch für den überwiegenden Teil der Knocheninfektionen verantwortlich sind, steigt. Methicillin-Resistenz korreliert mit Resistenz gegenüber Aminoglykosiden und anderen Antibiotika (CHAMBERS, 1997). Aus diesem Grund wäre ein breiteres Spektrum von Antibiotika zur Untermischung in Knochenzement wünschenswert, da jede prophylaktische Antibiotika-Applikation das Risiko einer Resistenzentwicklung birgt. Während durch die Verwendung Antibiotika-haltigen Knochenzements die tiefen Infektionen nach Hüftarthroplastiken effektiv verhindert werden konnten, nahmen im Gegensatz dazu die oberflächlichen Infektionen zu. Dabei muß das Auftreten resistenter Keime als potentiell Risiko angesehen werden. Aus diesem Grund lehnen DUNCAN et al. (1994) den prophylaktischen Einsatz von Antibiotika-haltigem Zement ab. Wegen der möglichen Resistenzentwicklung oder der Selektion primär unempfindlicher Erreger wird die therapeutische und prophylaktische Anwendung Antibiotika-haltiger PMMA-Kugeln auch von NEUT et al. (2001) kritisch gesehen.

HENRY et al. (1993) verneinen dagegen die Gefahr einer Resistenzentwicklung, da die Antibiotikum-Konzentrationen im Gewebe initial sehr hoch sind, so daß mögliche Infektionserreger rasch abgetötet werden.

Jede Beimischung zum Knochenzement beeinflusst die mechanische Eigenschaft, insbesondere die Stabilität, des Zements. Vertretbar ist eine Konzentration von bis zu ca. 4g Antibiotikum, z.B. Gentamicin, pro 40g Polymer (LAUTENSCHLAGER et al., 1976).

Ein Problem ist die unkontrollierte Freisetzung des Antibiotikums. Der größte Teil wird in den ersten Stunden bis Tagen freigesetzt, während eine unbekannte Menge im Knochenzement verbleibt.

Die mögliche Beeinträchtigung der körpereigenen Immunabwehr bei Verwendung bestimmter Antibiotika zur lokalen Prophylaxe ist zu beachten (LABRO, 1993).

Neben den o.g. strikten perioperativen Maßnahmen hat der Zusatz von Antibiotika zum Knochenzement das Auftreten von Infektionen in der Implantat-Chirurgie gesenkt. Buchholz konnte durch den Einsatz Antibiotika-haltigen Knochenzements in der Prophylaxe das Auftreten von Infektionen von etwa 6% (kein AB) auf 0,9 bis 2,4% (mit 0,5g Gentamicin auf 40g Polymerpulver) senken (DUNCAN et al., 1994).

Im Schwedischen Nationalen Hüftarthroplastik-Register (MALCHAU et al., 1998), das auf freiwilliger Mitarbeit aller Kliniken und Krankenhäuser Schwedens beruht, werden seit 1979 sämtliche Erst- und Revisionsoperationen erfaßt. Die Auswertung zeigte, daß die prophylaktische Gabe von Antibiotika (Isoxazolyl-Penicillin oder Cephalosporine), der Einsatz Gentamicin-haltiger Knochenzemente und andere Maßnahmen zur Verhinderung einer tiefen Infektion die Zahl der notwendigen Revisionen aufgrund septischer Komplikationen reduzieren. Die stärkste Wirkung hat dabei der Gentamicin-haltige Zement. Bedacht werden muß allerdings, daß nur etwa 7% der Revisionsoperationen an der Hüfte wegen einer septischen TEP-Lockerung nötig waren. Dagegen erfolgten 73% der Revisionsoperationen aufgrund aseptischer TEP-Lockerungen, bei denen kein Keim nachgewiesen werden konnte.

Als Ursache für eine aseptische TEP-Lockerung werden neben durch Materialversagen und -abrieb induzierten Osteolysen als eine mögliche Ursache auch subakute, klinisch blande verlaufende Infektionen mit Koagulase-negativen Staphylokokken angesehen (KÖNIG et al., 1998). Im Rahmen einer Kölner Studie (RÜTT et al., 1990) wurden bei Hüft-

Revisionsoperationen aufgrund aseptischer Lockerung Prothesen- und Gewebematerial auf Keime untersucht. Hierbei wurden häufig Koagulase-negative Staphylokokken, insbesondere *Staphylococcus epidermidis*, gefunden.

In-vitro-Versuche zur Adhäsions- und Akkumulationsfähigkeit eines Schleim-produzierenden *S. epidermidis*-Stammes auf Polymethylmethacrylat zeigten eine höhere Keimzahl als nicht Schleim-produzierende *S. epidermidis* (KÖNIG et al., 1998). Deshalb wären aus mikrobiologischer Sicht primär zementfreie Implantate bei Wechseloperationen zu wählen. Soll das Implantat zementiert werden, so ist ein Antibiotika-haltiger Knochenzement indiziert, der wirksam gegen die zuvor nachgewiesenen Keime ist. Unbeladener Knochenzement sollte im Rahmen von Revisionsoperationen heutzutage obsolet sein, da PMMA ohne bakteriostatische oder bakterizide Komponente einen idealen Adhäsionsort insbesondere für Schleim-bildende *S. epidermidis*-Stämme bietet (KÖNIG et al., 1998).

5.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse

5.2.1 Freisetzungskinetiken

Der Ermittlung der Freisetzungskinetiken von Antibiotika aus Knochenzement in vitro dienten zwei Methoden: 1. die kontinuierliche Elution und 2. die statische Elution.

5.2.1.1 Kontinuierliche Freisetzung

Für die Untersuchung der kontinuierlichen Freisetzung von Antibiotika aus PMMA-Knochenzement wurde ein nach GRASSO et al. (1978) modifiziertes Modell verwendet, das die Verhältnisse im Menschen simuliert, wo Gewebsflüssigkeit (Blut, Wundsekret) kontinuierlich das Antibiotikum aus dem Knochenzement eluiert. Die Flüssigkeit wird im Menschen über Lymphe und Blut abtransportiert. Eine Abnahme der lokalen Antibiotikumkonzentration ist unausweichlich.

Hinsichtlich möglicher Rückschlüsse auf die Verhältnisse im Menschen ist zu bedenken, daß im Modell Penetration und Anreicherung des Antibiotikums in den umliegenden Knochen außer acht gelassen werden. Weiter wurde ein Elutionsvolumen von 10 ml pro Stunde angesetzt; wie groß es im Körper tatsächlich ist, ist unbekannt.

Die Freisetzung der Antibiotika aus den untersuchten Knochenzementen war initial hoch und nahm im Untersuchungszeitraum kontinuierlich ab. Dies spricht für die Wirksamkeit Antibiotika-haltiger Zemente, da die ersten Stunden nach einer Operation entscheidend für die

Infektionsausbreitung sind („race for the surface“, GRISTINA et al., 1989; KÖNIG et al., 1998).

5.2.1.2 Statische Freisetzung

Für die Untersuchung der statischen Freisetzung von Antibiotika aus PMMA-Knochenzement wurden Testzylinder mit Ringerlösung eluiert. Die Untersuchungsmethode ist sinnvoll, um die Freisetzung von Antibiotika aus verschiedenen Knochenzementen zu vergleichen und die Gesamtfreisetzung zu ermitteln. Eine Übertragung auf die klinischen Verhältnisse ist nur eingeschränkt möglich, da im menschlichen Körper ein Abtransport des Eluats erfolgt (s.o.).

In den Versuchen konnte gezeigt werden, daß nur ein geringer Anteil des im Knochenzement inkorporierten Antibiotikums in den ersten 24 Stunden eluiert wurde. Dies steht im Einklang mit klinischen Studien, in denen ebenfalls nur ein geringer Anteil des Antibiotikums in Wunddrainagesekret und im Urin nachgewiesen werden konnte (TORHOLM et al., 1983).

5.2.2 Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung

5.2.2.1 Diffusionsversuche

Eine einfache Methode zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung Antibiotika-haltiger Knochenzemente ist ein modifizierter Agardiffusionstest. Mit Bakterien beimpfte Agarplatten wurden mit Testzylindern beschickt und inkubiert. Nach der Bebrütung zeigten sich Hemmhöfe infolge der Diffusion des Antibiotikums aus dem Testzylinder und der antimikrobiellen Wirkung. Die Abnahme des Hemmhofdurchmessers steht in Einklang mit der verminderten Freisetzung des Antibiotikums aus dem Testzylinder über den Beobachtungszeitraum.

Ein möglicher Einwand zu diesem Experiment ist, daß nur eine Seite des Prüfzylinders Kontakt zur beimpften Agaroberfläche hatte. Ob eine Freisetzung aus Teilen des Prüfzylinders, die keinen Kontakt mit der Agaroberfläche hatten, erfolgt, kann nicht gesagt werden. Eine weitere Einschränkung ist der Anpreßdruck, mit dem das Plättchen aufgelegt wurde. So könnte ein höherer Druck beim Auflegen des Plättchens zu einem größeren Hemmhof führen.

Die Diffusionsversuche können als Beispiel für die Diffusion/Penetration des Antibiotikums nach Ausbildung eines „interface“ zwischen dem eingebrachten PMMA und dem umliegenden Knochen dienen.

5.2.2.2 Infektionsversuche

Im Rahmen dieser Versuche (Teil 1) wurden Keime zu Beginn der Elution in die Elutionsgefäße gegeben, um zu untersuchen, ob die in den Testzylindern vorhandene Antibiotikummenge ausreicht, die Keime abzutöten. Zur Übertragbarkeit in die klinische Situation kann man sich vorstellen, daß es zum Zeitpunkt der Operation zu einer Kontamination mit Keimen gekommen ist.

Bis 24 Stunden nach Versuchsbeginn zeigte sich bei den untersuchten Knochenzementen kein Wachstum, während nach 48 Stunden vereinzelt Wachstum sowohl im Eluat als auch auf den Testzylindern als Biofilm nachweisbar war. Das deutet darauf hin, daß primär eine inkomplette Elimination stattfindet oder „ruhende Keime“, möglicherweise im Biofilm, induziert werden. Bei weiterem Absinken der Antibiotikumkonzentration können die Keime wieder replizieren.

Ein möglicher Einwand zu diesem Experiment ist, daß lediglich der antimikrobielle Effekt der Antibiotika untersucht werden konnte. Im Menschen ist jedoch die körpereigene humorale und zelluläre Abwehr bei der Abtötung der Bakterien essentiell beteiligt.

Ein weiterer Aspekt ist die Dicke des Zementmantels, der letztendlich die Kontakt- und Diffusionsfläche zwischen Prothese und Körper darstellt. Sie konnte in den Experimenten teilweise berücksichtigt werden. Da die Art der Freisetzung (physikalisch/chemisch) des Antibiotikums aus dem Knochenzement unklar ist, kann nicht gesagt werden, inwiefern Größe der Kontaktfläche und Dicke des Zementmantels die Freisetzung beeinflussen.

Im Rahmen der Infektionsversuche (Teil 2) wurde untersucht, nach welcher Zeit ein Wachstum von Bakterien im Eluat und auf den Testzylindern erfolgte, wenn wiederholt Bakterien zugefügt wurden. Entsprechende klinische Situationen wären z. B. postoperative Bakteriämien, ausgehend von Wund- oder Katheterinfektionen. Diese Experimente dienten zum Vergleich der Knochenzemente und zur Untersuchung des Biofilms auf PMMA.

5.2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie (live/dead-Farbstoff)

Auf Antibiotika-freien Testzylindern zeigten sich fast ausschließlich grün gefärbte, d.h. lebende, *Staphylococcus epidermidis*, während auf Gentamicin-haltigen Testzylindern wenige grün gefärbte (lebende) und vermehrt rot gefärbte (tote) Bakterien zur Darstellung kamen. Auf dem Clindamycin-haltigen Testzylinder fanden sich nur wenige rot gefärbte (tote), jedoch

keine grün gefärbten (vitalen) Bakterien, das heißt, daß nur wenige Bakterien anhafteten und diese tot waren.

Hieraus kann man schließen, daß auf der Oberfläche Antibiotika-haltiger Zemente in der Regel tote und nur vereinzelt lebensfähige Bakterien anzutreffen sind. Das zeigt unmittelbar, daß replikationsfähige Bakterien auf der Oberfläche Antibiotika-haltiger Zemente kaum überleben können.

5.2.2.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die qualitativ orientierend durchgeführten rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten auf den Oberflächen Antibiotika-freier Zemente reichlich Bakterien, zum Teil mit Teilungsfiguren, und die Ausbildung eines Biofilms. Diese Befunde entsprechen Resultaten der Untersuchungen von DRAENERT et al. (1983). Dagegen fanden sich auf den Oberflächen Antibiotika-haltiger Zemente nur vereinzelt liegende Bakterien, die aber auch einen Biofilm gebildet hatten.

6 Zusammenfassung

Biomaterialien sind in der Medizin unersetzlich. Eine gefürchtete Komplikation während und nach ihrer Implantation ist die Biomaterial-assoziierte Infektion. Musterbeispiel sind Infektionen von Arthroplastiken. Zahlreiche Studien belegen den hohen Stellenwert Antibiotika-haltiger Knochenzemente in der Prophylaxe. Erst durch den Einsatz Antibiotika-haltiger Knochenzemente konnte die Infektionsrate auf 1 bis 2% der Operationen gesenkt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Knochenzemente (VersaBond und Palacos R) mit unterschiedlichen Antibiotika (Gentamicin und Clindamycin) in unterschiedlichen Konzentrationen (VersaBond AB [1g Gentamicin], VersaBond mit 2g Gentamicin, VersaBond mit 1g Clindamycin, VersaBond mit 2g Clindamycin und Refobacin Palacos R [0,5g Gentamicin]) in vitro hinsichtlich ihrer Freisetzungskinetiken und ihrer antimikrobiellen Wirkung mit unterschiedlichen Methoden (kontinuierliche Elution, statische Elution, Diffusionsversuche, Infektionsversuche, Fluoreszenzmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie) untersucht.

Die Ergebnisse der kontinuierlichen und statischen Elutionen zeigten initial hohe Freisetzungsraten der Antibiotika. Im untersuchten Zeitraum von 24 Stunden wurde die minimale Hemmkonzentration der untersuchten Bakterien in keinem Fall unterschritten. Bei statischer Elution konnte gezeigt werden, daß in den ersten 24 Stunden nur ein Teil des in den Testzylindern inkorporierten Antibiotikums eluiert wird (etwa 3% des Gentamicins aus Refobacin Palacos R, etwa 2% des Gentamicins aus VersaBond [mit 1g bzw. 2g Gentamicin] und etwa 8% des Clindamycins aus VersaBond).

Diffusionsversuche zeigten, daß das bakterielle Wachstum noch nach 20 Tagen in unmittelbarer Umgebung der Testzylinder gehemmt wurde.

In den Infektionsversuchen mit *Staphylococcus epidermidis* konnte gezeigt werden, daß durch alle untersuchten Antibiotika-haltigen Knochenzemente bakterielles Wachstum in den ersten 24 Stunden vollständig sowohl im Eluat als auch auf den Testzylindern verhindert wurde.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Entwicklung eines Biofilms durch *Staphylococcus epidermidis* auf Antibiotika-haltigen und unbeladenen PMMA-Testzylindern untersucht. Auf unbeladenem Knochenzement bildete sich bereits nach nur einmaliger Inokulation von Bakterien ein Biofilm. Auf den Gentamicin-haltigen Knochenzementen

bildete sich erst nach mehrmaligem Beimpfen (zwei- bis dreimal im Abstand von jeweils 12 Stunden) ein Biofilm. Auf den Clindamycin-haltigen Testzylindern bildete sich trotz wiederholtem Beimpfen bis 14 Tage nach Versuchsbeginn kein Biofilm.

Der Biofilm wurde qualitativ mit einem live/dead-Farbstoff mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Auf den unbeladenen Testzylindern zeigten sich zahlreiche grün gefärbte (lebende) Bakterien, auf den Gentamicin-haltigen Testzylindern dagegen wenige grün (lebende) und vermehrt rot gefärbte (tote) Bakterien. Auf dem Clindamycin-haltigen Testzylinder fanden sich nur wenige rot gefärbte (tote), jedoch keine grün gefärbten (vitalen) Bakterien, das heißt, daß nur wenige Bakterien anhafteten und diese tot waren.

Eine qualitativ orientierende rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Testzylinder, die in 12stündigen Intervallen im Grasso-Modell wiederholt beimpft und über insgesamt 72 Stunden inkubiert worden waren, zeigte bakterielles Wachstum auf den Testzylindern aus VersaBond (unbeladen), VersaBond AB und VersaBond mit 1g Clindamycin. Auf dem Testzylinder aus VersaBond mit 1g Clindamycin waren nur wenige Bakterien zu finden. Als Zeichen für lebende Bakterien wurden Teilungsfiguren angesehen.

Entscheidend für die Manifestation einer Infektion sind die ersten Stunden nach der Operation, in denen körpereigene Zellen bei der Gewebeintegration des eingebrachten Biomaterials mit eventuell eingedrungenen Bakterien in einem „race for the surface“ konkurrieren. Es gilt, eine Besiedelung des Biomaterials mit Bakterien und eventuell nachfolgend die Bildung eines Biofilms, der eine chronische Infektion zur Folge haben kann, unbedingt zu vermeiden. Antibiotika-haltiger Knochenzement könnte während dieser kritischen Phase durch Reduktion der Keimlast die körpereigene Abwehr wesentlich unterstützen.

Eine mögliche Resistenzentwicklung und die Ausbildung von Kleinzellvarianten von Staphylokokken, die eventuell ebenfalls für chronische Infektionen verantwortlich sind, sind als Risiken zu beachten. Die Wirkung des protrahiert über Tage und Wochen aus dem Knochenzement eluierten Antibiotikums ist unklar.

Bei kritischer Würdigung früherer Studien und experimenteller Untersuchungen und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist der Einsatz etablierter und/oder neu entwickelter Antibiotika-haltiger Knochenzemente in der Gelenkersatzchirurgie sinnvoll und indiziert.

In Anbetracht der steigenden Resistenzentwicklung insbesondere der Hospitalismuskulturen auch im traumatologischen und orthopädischen Fachgebiet erscheinen darüber hinaus die Entwicklung und Untersuchung von Knochenzementen, denen neuere Antibiotika, z. B. Linezolid und Quinupristin/Dalfopristin, zugemischt werden, notwendig.

7 Summary

In many disciplines of medicine, biomaterials are indispensable. A feared complication during and after implantation is the biomaterial-associated infection. Paradigms are infections of orthopedic devices. Numerous studies prove that antibiotic-loaded bone cements occupy a particular rank in prophylaxis. By using antibiotic-loaded bone cement, the infection rates could be reduced to 1-2% of arthroplasty. Bone cements loaded with new and efficacious antimicrobial agents should be developed in order to meet the increasing rates of bacterial resistance, especially of nosocomial pathogens. In this context, the present studies have been initiated.

Test cylinders of different bone cements, i.e., VersaBond and Palacos R, containing different antibiotics, i.e., gentamicin and clindamycin, in different concentrations, i.e., VersaBond AB (1g of gentamicin), VersaBond with 2g of gentamicin, VersaBond with 1g of clindamycin, VersaBond with 2g of clindamycin, and Refobacin Palacos R (0,5g of gentamicin) have been prepared and tested. They were investigated in vitro with regard to the kinetics of antibiotic release and antimicrobial effect by applying different methods, i.e., continuous and static elution, diffusion, artificial infection, fluorescence and scanning electron microscopy. Different strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* were examined.

Both continuous and static elution experiments revealed initially high rates of antibiotic release, which, within the first 24 hours, always exceeded the minimal inhibitory concentrations of the bacteria. Experiments using static elution showed that, within the first 24 hours, only a proportion of the incorporated antibiotic, i.e., 3% of gentamicin from Refobacin Palacos R, 2% of gentamicin from VersaBond, and 8% of clindamycin from VersaBond, had been released.

Diffusion experiments showed that, even after 20 days, bacterial growth was still inhibited in the immediate vicinity of the test cylinders.

In a series of infection experiments using *Staphylococcus epidermidis*, all bone cements containing antibiotics proved to inhibit bacterial growth both in the culture medium and on the test cylinders during the first 24 hours.

In infection experiments using *Staphylococcus epidermidis*, the development of biofilms on the test cylinders was studied by applying a live/dead dye plus fluorescence microscopy, and scanning electron microscopy. On unloaded bone cements, a biofilm was detected after a

single inoculation of bacteria whereas, on gentamicin-loaded bone cements, the development of a biofilm was delayed, and, on clindamycin-loaded bone cements, a biofilm could not be detected at all even after repeated infection during 2 weeks.

The first postoperative hours are assumed to be decisive for the manifestation of a bacterial infection on implanted medical devices. The term „race for the surface“ has been coined to describe the competition between leukocytes, fibroblasts, and bacteria which will colonize the biomaterial. Antibiotic-loaded bone cement could assist by reducing the infective dose in the vicinity of the device.

Potential side-effects of antibiotic-loaded bone cement, e.g., in particular development of bacterial resistance, must be considered.

8 Literaturverzeichnis

- Adams K, L Couch, G Cierny, J Calhoun, JT Mader. 1992. In vitro and in vivo evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads. *Clin. Orthop.* 278: 244-252
- Athanasou NA, R Pandey, R de Steiger, D Crook, PM Smith. 1995. Diagnosis of infection by frozen section during revision arthroplasty. *J. Bone Joint Surg. Br.* 77: 28-33
- Atkins BL, N Athanasou, JJ Deeks, DWM Crook, H Simpson, TEA Peto, P McLardy-Smith, AR Berendt. 1998. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2932-2939
- Baker AS, LW Greenham. 1988. Release of gentamicin from acrylic bone cement. *J. Bone Joint Surg. Am.* 70: 1551-1557
- Berendt AR. 1999. Infections of prosthetic joints and related problems. In: D Armstrong, J Cohen (eds.). *Infectious Diseases*. Mosby, London, Philadelphia, St.Louis, Sydney, Tokyo
- Boelens JJ, J Dankert, JL Murk, JJ Weening, T van der Poll, KP Dingemans, L Koole, JD Laman, SAJ Zaat. 2000. Biomaterial-associated persistence of *Staphylococcus epidermidis* in pericatheter macrophages. *J. Infect. Dis.* 181: 1337-1349
- Breusch SJ, KD Kühn. 2003. Knochenzemente auf Basis von Polymethylmethacrylat. *Orthopäde* 32: 41-50
- Buchholz HW, H Engelbrecht. 1970. Über die Depotwirkung einiger Antibiotica bei Vermischung mit dem Kunstharz Palacos. *Chirurg* 41: 511-515
- Buchholz HW, RA Elson, E Engelbrecht, H Lodenkämper, J Röttger, A Siegel. 1981. Management of deep infection of total hip replacement. *J. Bone Joint Surg. Br.* 63: 342-353
- Burri C. 1979. *Posttraumatische Osteitis*. Huber Verlag, Bern Stuttgart, Wien
- Chambers HF. 1997. Methicillin-resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 781-791
- Characklis WG, KC Marshall (ed.). 1990. *Biofilms*. John Wiley & Sons, Inc New York
- Costerton JW, PS Stewart, EP Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322
- Costerton JW. 1999. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11: 217-221
- Donlan RM, JW Costerton. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193
- Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 881-890
- Downes S, PA Maughan. 1989. Mechanism of antibiotic release from polymethylmethacrylate bone cement. *Clin. Mater.* 4: 109-122

Draenert K, Y Draenert. 1983. Adherence and growth of bacteria on bone cement in vitro and in chronologically infected artificial joints. *Scan. Electron Microsc.* 1983: 255-261

Drancourt M, A Stein, JN Argenson, A Zannier, G Curvale, D Raoult. 1993. Oral rifampin plus ofloxacin for treatment of staphylococcus-infected orthopedic implants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1214-1218

Duncan CP, BA Masri. 1994. The role of antibiotic-loaded cement in the treatment of an infection after hip replacement. *J. Bone Joint Surg. Am.* 76: 1742-1751

Feldman DS, JH Lonner, P Desai, JD Zuckermann. 1997. The role of intraoperative frozen sections in revision total joint arthroplasty. *J. Bone Joint Surg. Am.* 77: 1807-1813

Fleming A. 1919-1920. The action of chemical and physiological antiseptics in a septic wound. *Br. J. Surg.* 7: 99-129

Grasso S, G Meinardi, I De Carneri, V Tamassia. 1978. New in vitro model to study the effect of antibiotic concentrations and rate of elimination on antibacterial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 570-576

Gristina AG, LX Webb, E Barth. 1989. Microbial adhesion, biomaterials and man. In: R Coombs, RH Fitzgerald Jr. *Infection in the orthopaedic patient.* Butterworths. London, Boston, Singapore, Toronto, Wellington

Gristina AG. 1987. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237: 1588-1595

Hanssen AD, RT Trousdale, DR Osmon. 1995. Patient outcome with reinfection following reimplantation for the infected total knee arthroplasty. *Clin. Orthop.* 321: 55-67

Hanssen AD, DR Osmon. 1999. The use of prophylactic antimicrobial agents during and after hip arthroplasty. *Clin. Orthop.* 369: 124-138

Henry SL, GA Hood, D Seligson. 1993. Long-term implantation of gentamicin-polymethylmethacrylate antibiotic beads. *Clin. Orthop.* 295: 47-53

Jensen NK, LW Johnsrud, MC Nelson. 1939. The local implantation of sulfanilamide in compound fractures. *Surgery* 6: 1-12

Josefsson G, L Lindberg, B Wiklander. 1981. Systemic antibiotics and gentamicin-containing bone cement in the prophylaxis of postoperative infections in total hip arthroplasty. *Clin. Orthop.* 159: 194-200

Kaplan SS, RP Heine, RL Simmons. 1999. Defensins impair phagocytic killing by neutrophils in biomaterial-related infection. *Infect. Immun.* 67: 1640-1645

Kendall RW, CP Duncan, JA Smith, JH Ngui-Yen. 1996. Persistence of bacteria on antibiotic-loaded acrylic depots. *Clin. Orthop.* 329: 273-280

- Klemm K. 1979. Gentamycin-PMMA-Kugeln in der Behandlung abszedierender Knochen- und Weichteilinfektionen. Zentralbl. Chir. 104: 934-942
- Kloos WE, TL Bannermann. 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin. Microbiol. Rev. 7: 117-140
- König DP, JM Schierholz, MH Hackenbroch. 1998. Häufung und Prophylaxe von *Staphylococcus-epidermidis*-Infektionen in der Endoprothetik. Hyg. Med. 23: 274-279
- Labro MT. 1993. Immunomodulation by antibacterial agents. Is it clinically relevant? Drugs 45: 319-328
- Lautenschlager EP, JJ Jacobs, GW Marshall, PR Meyer Jr.. 1976. Mechanical properties of bone cements containing large doses of antibiotic powders. J. Biomed. Mater. Res. 10: 929-938
- Malchau H, P Herberts. 1998. Prognosis of total hip replacement (THR). The National Hip Arthroplasty Register 1998. 65th Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, Feb. 19-23
- Neut D, H van de Belt, I Stokroos, JR van Horn, HC van der Mei, HJ Busscher. 2001. Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. J. Antimicrob. Chemother. 47: 885-891
- Norden CW. 1999. Acute and chronic osteomyelitis. In: D Armstrong, J Cohen (eds.). Infectious Diseases. Mosby, London, Philadelphia, St.Louis, Sydney, Tokyo
- O’Gara JP, H Humphreys. 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. J. Med. Microbiol. 50: 582-587
- Organ CH. 1971. The utilization of massive doses of antimicrobial agents with isolation perfusion in the treatment of chronic osteomyelitis. Clin. Orthop. 76: 185-193
- Proctor RA, B Kahl, C von Eiff, PE Vaudaux, DP Lew, G Peters. 1998. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. Clin. Infect. Dis. 27: 68-74
- Proctor RA, G Peters. 1998. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. Clin. Infect. Dis. 27: 419-423
- Raut VV, PD Siney, BM Wroblewski. 1995. One-stage revision of total hip arthroplasty for deep infection. Long-term followup. Clin. Orthop. 321: 202-207
- Rüter A, O Trentz, M Wagner. 1995. Unfallchirurgie. Urban & Schwarzenberg, München , Wien, Baltimore
- Rütt J, C Ludwig, G Peters, F Schumacher-Perdreau, G Pulverer. 1990. Wird die schleichende aseptische TEP-Lockerung durch eine Infektion mit *Staphylococcus epidermidis* verursacht? Orthopädische Praxis 9: 587-588
- Simon C, W Stille. 1997. Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis, 9. Auflage, Schattauer, Stuttgart, New York

Torholm C, L Lidgren, L Lindberg, G Kahlmeter. 1983. Total hip joint arthroplasty with gentamicin-impregnated cement. A clinical study of gentamicin excretion kinetics. Clin. Orthop. 181: 99-106

Van de Belt H, D Neut, W Schenk, JR van Horn, HC van der Mei, HJ Busscher. 2001. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. Acta Orthop. Scand. 72: 557-571

Veyries ML, F Faurisson, ML Joly-Guillou, B Rouveix. 2000. Control of staphylococcal adhesion to polymethylmethacrylate and enhancement of susceptibility to antibiotics by Poloxamer 407. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 1093-1096

Von Eiff C, D Bettin, RA Proctor, B Rolauffs, N Lindner, W Winkelmann, G Peters. 1997. Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. Clin. Infect. Dis. 25: 1250-1251

Von Eiff C, N Lindner, RA Proctor, W Winkelmann, G Peters. 1998. Auftreten von Gentamicin-resistenten Small Colony Variants von *S. aureus* nach Einsetzen von Gentamicin-Ketten bei Osteomyelitis als mögliche Ursache für Rezidive. Z. Orthop. Ihre Grenzgeb. 136: 268-271

Voorhoeve A, C Stöhr. 1973. Ergebnisse bei der Behandlung der chronisch-eitrigen Osteomyelitis mit einem Palacos-Gentamicin-Gemisch. Münch. Med. Wochenschr. 115: 924-930

Wahlig H, E Dingeldein. 1980. Antibiotics and bone cements. Acta Orthop. Scand. 51: 49-56

Wahlig H. 1981. Gentamicin-PMMA beads, a drug delivery system: basic results. Excerpta Med. 556: 9-17

Widmer AF, A Gaechter, PE Ochsner, W Zimmerli. 1992. Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations. Clin. Infect. Dis. 14: 1251-1253

Willenegger H, W Roth. 1962. Die antibakterielle Spül- und Drainage chirurgischer Infektionen. Dtsch. med. Wochenschr. 87: 207-210

Wininger DA, RJ Fass. 1996. Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2675-2679

9 Anhang

Herstellungsvorschrift für Ringerlösung pH 7,4

Bezeichnung	Formel	Einheit	für 1l	für 2l	für 5l
Natriumchlorid	NaCl	mg	8740	17480	43700
Kaliumchlorid	KCl	mg	414	828	2070
Magnesiumchlorid	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	mg	203	406	1015
Calciumchlorid 95%	CaCl ₂	mg	180,8	361	904
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	C ₄ H ₁₁ NO ₃	mg	242	484	1210
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	mg	1000	2000	5000

Tabelle 25. Bestandteile der Ringerlösung

Auffüllen mit deionisiertem H₂O. Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit 0,1M HCl. Abfüllen in verschraubbare Literflaschen (SCHOTT). Autoklavieren bei 134°C.

Meßprotokoll ISRA-BIOEYE

 MESSPROTOKOLL ISRA - BIOEYE

Versuch : clin10 Datum : 15.10.1998 Verfahren : 1002 mit Sarc. lutea

Praeparat : CoreCement mit 1,0g Clinda (Stat. Elu. 2ml)

Probenbezeichnung :

Proben 1-3: 4h

Proben 4-6: 6h

Probe	Konzentration gemessen:	Stdev +/-	Verduennung	Konzentration	Stdev +/-
1	1.0797 µg/ml	0.0489 µg/ml	10.00 : [1]	10.80 µg/ml	0.49 µg/ml
2	0.7863 µg/ml	0.0668 µg/ml	10.00 : [1]	7.86 µg/ml	0.67 µg/ml
3	0.8498 µg/ml	0.0699 µg/ml	10.00 : [1]	8.50 µg/ml	0.70 µg/ml
4	1.0449 µg/ml	0.0661 µg/ml	20.00 : [1]	20.90 µg/ml	1.32 µg/ml
5	1.2223 µg/ml	0.0321 µg/ml	20.00 : [1]	24.45 µg/ml	0.64 µg/ml
6	0.7600 µg/ml	0.0473 µg/ml	20.00 : [1]	15.20 µg/ml	0.95 µg/ml
REF	1.5860 µg/ml	0.0619 µg/ml	SOLL 1.5625 µg/ml	DIFF 1.5060 %	

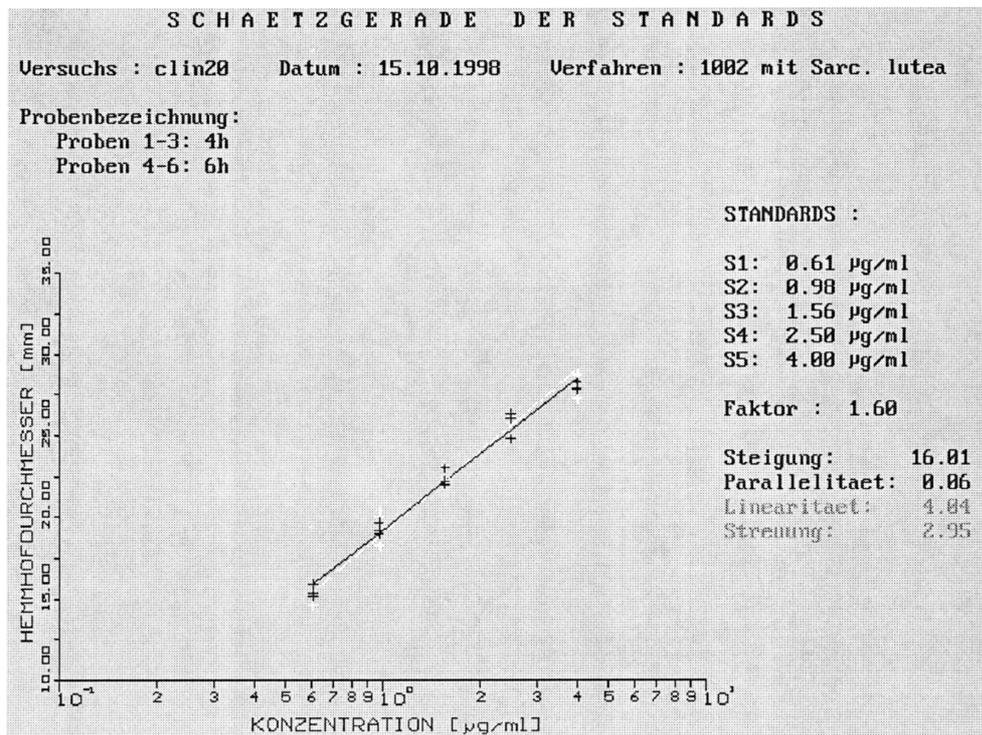
Probe 1: A1	1.17 µg/ml	Probe 2: A1	0.79 µg/ml	Probe 3: A1	0.91 µg/ml
A2	1.10 µg/ml	A2	0.85 µg/ml	A2	0.81 µg/ml
A3	1.04 µg/ml	A3	0.66 µg/ml	A2	0.75 µg/ml
B1	1.09 µg/ml	B1	0.83 µg/ml	B1	0.95 µg/ml
B2	1.05 µg/ml	B2	0.78 µg/ml	B2	0.86 µg/ml
B3	1.04 µg/ml	B3	0.81 µg/ml	B3	0.82 µg/ml
Mittelwert:	1.08 µg/ml	Mittelwert:	0.79 µg/ml	Mittelwert:	0.85 µg/ml

Probe 4: A1	1.07 µg/ml	Probe 5: A1	1.19 µg/ml	Probe 6: A1	0.76 µg/ml
A2	0.98 µg/ml	A2	1.25 µg/ml	A2	0.72 µg/ml
A3	0.98 µg/ml	A3	1.23 µg/ml	A2	0.73 µg/ml
B1	1.00 µg/ml	B1	1.20 µg/ml	B1	0.77 µg/ml
B2	1.10 µg/ml	B2	1.19 µg/ml	B2	0.85 µg/ml
B3	1.13 µg/ml	B3	1.27 µg/ml	B3	0.72 µg/ml
Mittelwert:	1.04 µg/ml	Mittelwert:	1.22 µg/ml	Mittelwert:	0.76 µg/ml

REF: A1	1.65 µg/ml
A2	1.50 µg/ml
A3	1.54 µg/ml
B1	1.56 µg/ml
B2	1.63 µg/ml
B3	1.64 µg/ml
Mittelwert:	1.59 µg/ml

KENNWERTE DER EICHGERADE :	Steigung :	15.647
	Linearitaet :	4.5651
	Parallelitaet :	0.0193
	Streuung :	1.6366

Schätzgerade des Standards (ISRA-BIOEYE)



Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Schnettler und Frau Dr. Dingeldein danke ich für die Überlassung des Themas und die stete Bereitschaft zu anregender Diskussion und Kritik.

Diese Arbeit wurde in den Laboratorien der Firma Coripharm, Dieburg, der Medizinischen Mikrobiologie und der Experimentellen Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Gießen, durchgeführt.

Ich danke Herrn Wüst und Herrn Sattig (Firma Coripharm) für die intensive Einarbeitung und Unterstützung beim ersten Versuchsteil.

Frau Pohl, Frau Bahr und Frau Gerhardt (Medizinische Mikrobiologie) danke ich für die Unterstützung bei der Herstellung der Materialien.

Herrn Dr. Herr (ehemals Laboratorium für Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Gießen) danke ich für die Hilfe bei der Rasterelektronenmikroskopie.

Meinen Eltern, Gunhild und Hans Gerd Schiefer, danke ich für die Ermöglichung des Studiums und die fortwährende Motivation und Unterstützung. Insbesondere danke ich Anja Wilrich für die liebevolle Unterstützung und ihre Rücksichtnahme während der Erstellung der Arbeit.

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

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

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“