

**Untersuchungen zur antimikrobiellen  
Wirksamkeit Gentamicin-beschichteter  
Implantate zur Reduktion  
Implantat-assoziiierter Infektionen in der  
Orthopädie und Unfallchirurgie**

Eine experimentelle Untersuchung am Kaninchenmodell

**Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie  
Labor für Experimentelle Unfallchirurgie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Jana Österling**

**Gießen 2010**

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

**Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Reinhard Schnettler**

**Gutachter: PD Dr. Dr. V. Alt**

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

**Tag der Disputation: 09.07.2010**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>EINLEITUNG</i></b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Demographische Entwicklung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Arthrose</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Gelenkendoprothetik</b> .....	<b>3</b>
1.3.1	Verankerungstechniken in der Endoprothetik .....	3
1.3.1.1	Zementierte Technik.....	4
1.3.1.2	Zementfreie Technik.....	4
1.3.2	Protheseninfektionen .....	7
1.3.2.1	Erregerspektrum .....	8
1.3.2.2	Pathogenese von Protheseninfektionen .....	9
1.3.3	Prophylaxe von Protheseninfektionen .....	11
1.3.3.1	Allgemeine Prinzipien .....	11
1.3.3.2	Perioperative Antibiotikaphylaxe.....	12
1.3.3.2.1	Systemische Antibiotikaphylaxe .....	13
1.3.3.2.2	Lokale Antibiotikaphylaxe durch antibiotikabeladenen PMMA-Knochenzement .....	14
1.3.3.3	Infektaten und -prophylaxe durch Beschichtung in der zementfreien Endoprothetik .....	17
1.3.3.3.1	Revisionsraten in der zementfreien vs. zementierter Endoprothetik.....	17
1.3.3.3.2	Antimikrobielle Beschichtungen für zementfreie Endoprothesen .....	19
1.3.3.3.3	Spezielle Aspekte von Beschichtungen für zementfreie Endoprothesen .....	22
<b>1.4</b>	<b>Problemstellung</b> .....	<b>23</b>
<b>2</b>	<b><i>MATERIAL UND METHODEN</i></b> .....	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Implantate und Beschichtungstechnologien</b> .....	<b>24</b>
2.1.1	Kirschner-Drähte .....	24
2.1.2	Hydroxylapatit(HA)-Beschichtung .....	24
2.1.3	RGD-Beschichtung .....	25
2.1.4	Gentamicin-Beschichtung .....	25
2.1.5	Getestete Implantatbeschichtungen .....	27
<b>2.2</b>	<b>Tierversuche</b> .....	<b>28</b>
2.2.1	Studiendesign .....	28
2.2.1.1	Ethikkommissionsvotum .....	28
2.2.1.2	Randomisierung der Tiere .....	28
2.2.1.3	Pilotstudie .....	29
2.2.1.4	Hauptstudie.....	29
2.2.2	Bakterien .....	30
2.2.3	Versuchstiere .....	32
2.2.4	Narkose .....	32
2.2.5	Operationstechnik mit Inokulation der Bakterien.....	33
2.2.6	Postoperative Röntgenkontrolle .....	33
2.2.7	Postoperative Beobachtung .....	35
2.2.8	Euthanasie der Tiere.....	36
2.2.9	Auswertung der Versuche .....	36
2.2.9.1	Röntgenologische Auswertung .....	36
2.2.9.2	Entnahme der Tibiae und klinische Auswertung .....	37
2.2.9.3	Mikrobiologische Untersuchungen.....	38
2.2.9.3.1	Agarplatten-Test .....	39
2.2.9.3.2	Latexagglutinationstest .....	40
2.2.9.3.3	API® Staph (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Frankreich) .....	42
2.2.9.3.4	16S rDNA-Sequenzierung .....	43
2.2.9.3.5	femB- und coa-Gen-Nachweis mittels PCR.....	46
2.2.9.3.6	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) .....	46
2.2.9.4	Histologische Auswertung.....	49
2.2.9.4.1	Trenn-Dünnschliff-Technik .....	49

2.2.9.4.2 Färbung der Dünnschliffe .....	51
2.2.9.4.3 Histologische Kriterien zur Infektionbeurteilung .....	53
2.2.9.5 Statistik .....	53
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1 Pilotstudie .....</b>	<b>54</b>
3.1.1 Klinische Ergebnisse der Pilotstudie .....	54
3.1.2 Mikrobiologische Ergebnisse der Pilotstudie .....	58
3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Pilotstudie .....	60
<b>3.2 Hauptstudie .....</b>	<b>61</b>
3.2.1 Klinische Ergebnisse der Hauptstudie .....	61
3.2.2 Röntgenologische Ergebnisse der Hauptstudie .....	62
3.2.3 Mikrobiologische Ergebnisse der Hauptstudie .....	66
3.2.4 Histologische Befunde .....	69
3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Hauptstudie .....	72
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
<b>4.1 Der Nutzen lokaler Antibiotika in der Endoprothetik .....</b>	<b>73</b>
<b>4.2 Antimikrobielle Beschichtungen für zementfreie Endoprothesen .....</b>	<b>77</b>
<b>4.3 Verwendetes Tiermodell .....</b>	<b>79</b>
<b>4.4 Ergebnisse der antimikrobiellen Beschichtung der vorgestellten Arbeit .....</b>	<b>82</b>
<b>4.5 Nachteile von Antibiotikabeschichtungen .....</b>	<b>85</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>6 SUMMARY .....</b>	<b>90</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>8 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>105</b>
<b>8.1 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>8.2 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>9 PUBLIKATION .....</b>	<b>108</b>
<b>10 ERKLÄRUNG .....</b>	<b>109</b>
<b>11 DANKSAGUNG .....</b>	<b>110</b>

## 1 EINLEITUNG

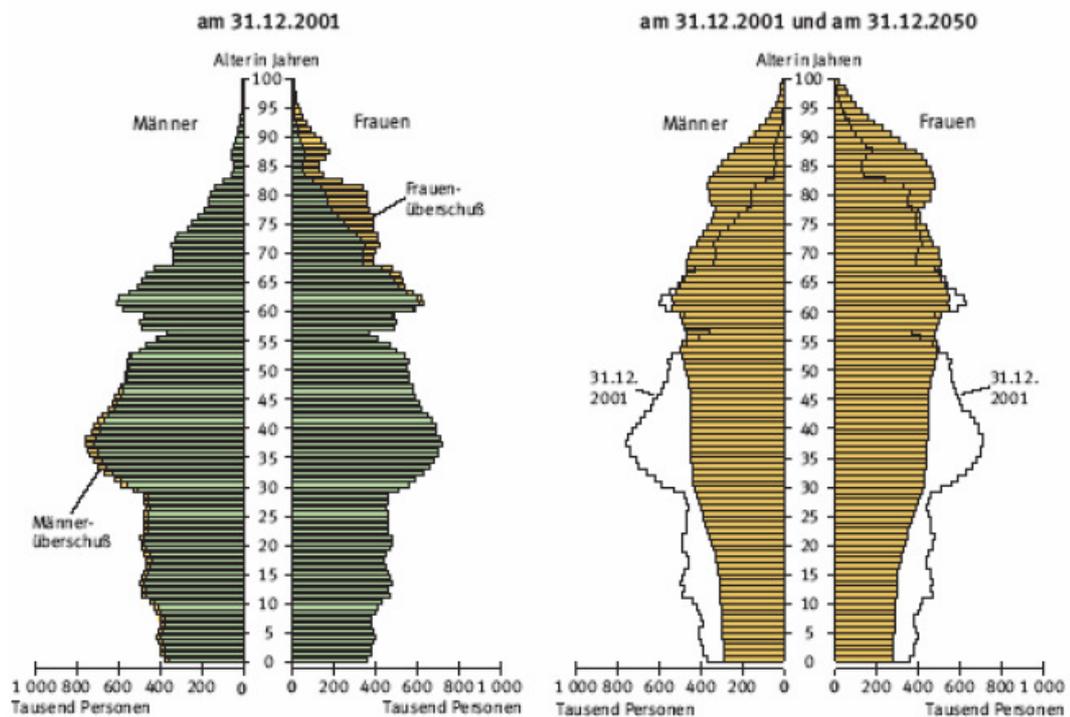
### 1.1 Demographische Entwicklung

In den letzten Jahrzehnten kam es kontinuierlich zu einem deutlichen Anstieg der Weltbevölkerungszahlen, welches zu einem großen Teil dem immensen medizinischen Fortschritt und der damit verbundenen steigenden Lebenserwartung zuzuschreiben ist.

Während um 1900 knapp 2 Milliarden Menschen die Erde bevölkerten, waren es im Jahr 2000 bereits 6 Milliarden (Lutz und Qiang, 2002, Gelbard et al., 1999). Schätzungen gehen von einem weiteren Anstieg der Weltbevölkerung innerhalb der nächsten 200 Jahre aus, hauptsächlich aufgrund des Bevölkerungswachstums in den Entwicklungsländern durch hohe Geburtenraten (Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung, 2007).

Während in den Entwicklungsländern der Hauptanteil der Bevölkerung ein Durchschnittsalter unter 30 Jahren aufweist, kommt es in den Industrieländern zu einem zunehmenden Alterungsprozess. Eingeleitet wurde dieser durch ein massives Absinken der Geburtenzahlen bei steigender Lebenserwartung in den höheren Altersgruppen. Somit kehrt sich die Altersstruktur in den Industrienationen erstmalig um. Auch in den kommenden Jahren ist mit einem Weiterbestehen dieses Trends und somit mit einer weiteren Zunahme des Altenquotienten zu rechnen (Abb. 1) (Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung, 2007).

Diese Entwicklung bringt eine Zunahme von altersassoziierten Erkrankungen wie Herz-/Kreislaufkrankungen, Diabetes mellitus und Erkrankungen des Gewebe- und Stützapparates, insbesondere Cox- und Gonarthrose mit sich. Da die Inzidenz und Prävalenz dieser Erkrankungen ansteigt, kommt es unter anderem zu einer stetig wachsenden Zahl von behandlungsbedürftigen Arthrosen. Daher wurde 2000 die Dekade 2000-2010 zur „Bone and Joint Decade“ erklärt (Puhl und Niethard, 1999).



**Abbildung 1:** Demographische Entwicklung Deutschlands 2001 und 2050, aufgeteilt in Männer und Frauen, deutlich zu sehen ist eine Abnahme der Personen im erwerbsfähigen Alter, sowie eine Zunahme der Personen über 70 Jahre von 2001-2050 (Statistisches Bundesamt, 2003).

## 1.2 Arthrose

Die Arthrose gehört zu den weltweit häufigsten Gelenkerkrankungen in den modernen Industrieländern. Allein in Deutschland leiden etwa 5 Millionen Menschen an arthrotischen Gelenkbeschwerden (Statistisches Bundesamt, 1998). Unter Coxarthrose versteht man im Allgemeinen den Verschleiß des Gelenkes, bei dem die knorpeltragende Schicht zunehmend dünner wird, bis in einem fortgeschrittenen Stadium ein unmittelbarer Knochenkontakt zwischen Hüftkopf und Pfanne besteht. Durch die Zerstörung des Gelenkknorpels kommt es zunächst zu einer Gelenkspaltverschmälerung mit subchondraler Sklerosierung und zur Bildung von Geröllzysten sowie osteophytären Randanbauten, die als deutliche radiologische Zeichen der Arthrose gelten (Niethard und Pfeil, 2003) (Abb. 2).

Der Gelenkknorpel besitzt eine begrenzte Reparatursfähigkeit, die als Tribut an seinen hohen Spezialisierungsgrad angesehen wird (Ewing, 1990).

Trotz großer medizinischer Fortschritte in der Behandlung der Arthrose ist bei generalisiertem degenerativem Gelenkverschleiß der endoprothetische Hüftgelenkersatz meist die einzig sinnvolle Therapieoption.



**Abbildung 2:** Röntgenbild des rechten Hüftgelenks in anterior-posterior Strahlengang mit Zeichen der Coxarthrose mit subchondraler Sklerosierung (weißer Pfeil), Gelenkspaltverschmälerung (schwarzer Pfeil) und osteophytären Anbauten (grauer Pfeil).

### 1.3 Gelenkendoprothetik

Weltweit werden zurzeit mehr als 1.000.000 Hüftprothesen pro Jahr implantiert; in Europa etwa 500.000 (Breusch et al., 2000), 150.000 davon alleine in Deutschland (Grundeis, 2006). Auch in den kommenden Jahren rechnet man weiterhin mit einer steigenden Tendenz der Implantationszahlen.

#### 1.3.1 Verankerungstechniken in der Endoprothetik

In der Endoprothetik ist die Verankerungstechnik der Prothese von immenser Bedeutung. Zur Stabilitätssicherung des künstlichen Gelenks nimmt die feste und sichere Verankerung (Breusch et al., 2000) und somit die Langzeitverbindung

zwischen dem adaptionsfähigen Knochen und der künstlichen Oberfläche des Implantats einen hohen Stellenwert ein.

Ein Hüftgelenkersatz kann prinzipiell zementiert oder unzementiert durchgeführt werden. Bei einer zementierten Endoprothese werden Hüftschale und -pfanne mit einem schnell härtenden Kunststoff (Knochenzement) im Becken und im Oberschenkelknochen befestigt, während bei zementfreier Implantation der Hüftschale und die -pfanne in den Knochen eingepresst bzw. eingeschraubt (gilt nur für die Hüftpfanne) werden und eine Primärstabilität der Gelenkersatzkomponenten ermöglichen.

### **1.3.1.1 Zementierte Technik**

Bei Knochenzement handelt es sich chemisch gesehen um polymeres Methyl-Metacrylat (PMMA), das beim Aushärten im Knochen eine feste Verankerung des künstlichen Gelenkes im Knochen sicherstellt.

Die dauerhaft intakte Übergangszone zwischen Knochenzement und Knochen, das so genannte Interface, und die Kraftübertragung auf den Knochen ist eine bedeutende Aufgabe des Knochenzements (Breusch et al., 2000). Ein Nachteil von Knochenzement ist die bei der Aushärtung entstehende enorme Wärmeentwicklung während der Polymerisation (Willert und Lintner, 1987), wodurch es zu Osteolysen am Knochen-Zement-Interface kommen kann (Breusch et al., 2000).

Grundsätzlich wird bei älteren Patienten vorzugsweise ein zementiertes Implantat gewählt, da diese Prothesen keine Einheilungszeit benötigen und die Patienten die betroffene Hüfte praktisch sofort wieder voll belasten können.

### **1.3.1.2 Zementfreie Technik**

Die zementfreie Verankerung von Endoprothesen wurde eingeführt, weil hohe aseptische Lockerungsraten und schlechte Ergebnisse bei jungen aktiven Patienten mit Implantation von Knochenzement auftraten und somit eine große Zahl an Revisionen von zementierten Prothesen durchgeführt werden musste (Breusch et al., 2000). Man erhoffte sich von unzementierten Implantaten mit einer dauerhaften und festen knöchernen Verankerung und somit gleichzeitiger

Verhinderung von Relativbewegungen zwischen der Prothese und dem Knochen bessere Ergebnisse (Gradinger et al., 2007, Mittelmeier, 1985, Willert und Lintner, 1987).

Im Allgemeinen wird eine nicht-zementierte Prothese mittels „press-fit“ Fixation im Knochen verklemmt, welches für mechanische Ruhe am Interface und somit für eine gute knöcherne Integration des unzementierten Implantats sorgt. Damit soll der stabile Sitz der Prothese im Knochen gewährleistet werden (Effenberger, 1996).

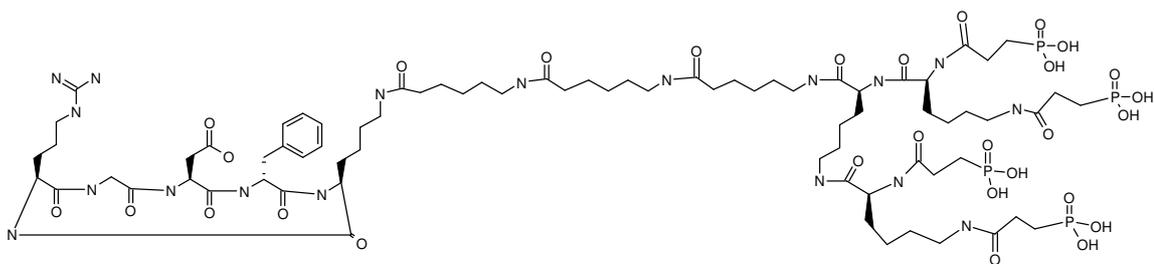
Ein Nachteil des zementfreien Verankerungskonzepts ist das so genannte „stress-shielding“, welches durch Osteolysen und periprothetische Saumbildung und daraus resultierendem Knochensubstanzverlust mit starken Schmerzen für den betroffenen Patienten gekennzeichnet ist (Breusch et al., 2000).

Als weiterer Nachteil dieser Methode ist die Einheilungszeit von durchschnittlich 12 Wochen zu sehen, die benötigt wird, damit der umliegende Knochen in das zementfreie Implantat einwachsen und es somit zu einer stabilen knöchernen Integration kommen kann.

Die verwendeten Prothesenmaterialien müssen neben mechanischer Festigkeit vor allem die Biokompatibilität gewährleisten. Die Prothesenoberfläche muss das Anwachsen des Knochens garantieren. Hydroxylapatit  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  ist ein Tricalciumphosphat, welches natürlicherweise im Knochen vorkommt. HA-beschichtete Implantate kommen zunehmend in der Endoprothetik zum Einsatz, da sie eine hohe Biokompatibilität aufweisen und nachweislich zu einer besseren Osteointegration führen, wofür vornehmlich die Osteokonduktivität dieses Materials verantwortlich ist (Shepperd und Aphorp, 2005). HA hat Festigkeitsmerkmale von Knochen und zeichnet sich durch eine sehr hohe Stabilität aus (Georgiade et al., 1993). Es ist ebenfalls hervorragend als Arzneimittelträger für antimikrobielle und osteogenetisch wirksame Substanzen geeignet (Spector, 1991). HA hat die Fähigkeit eine stabile Anheftung an den angrenzenden Knochen zu erreichen und stimuliert das Einwachsen neu gebildeten Gewebes in das Porengefüge. Es weist eine kristalline Struktur ähnlich zu der des Knochens auf und ist durch eine gute Biokompatibilität gekennzeichnet (Auclair-Daigle et al., 2005). Als Standardtechnologie zum Aufbringen von HA-

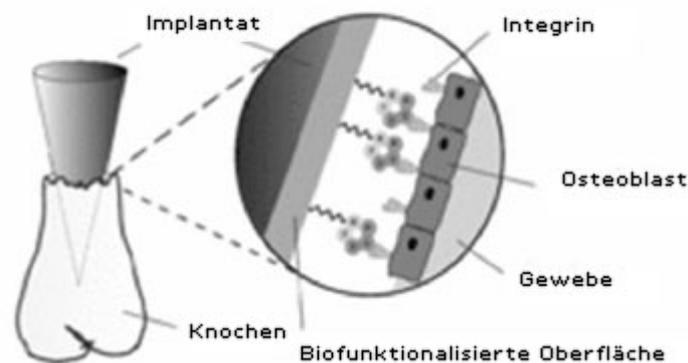
Beschichtungen wird heutzutage das Plasmasprühverfahren angesehen (Tonino et al., 1995).

Trotz guter Ergebnisse bei der Verwendung von HA-beschichteten Implantaten gibt es in der Literatur Hinweise, dass HA selbst Fremdkörperreaktionen mit HA-Partikel-Einkapselung am Interface auslösen kann und somit wiederum aseptische Lockerungen hervorgerufen werden können (Bloebaum et al., 1994, Sun et al., 1999). Daher wurden weitere Überlegungen zur Optimierung der Oberflächenbeschichtung von Implantaten angestellt. Eine Möglichkeit, die zelluläre Adhäsion auf Oberflächen zu stimulieren, wurde mit der Entdeckung der Integrine (Proteine in der Zellmembran) gefunden (Kantlehner et al., 1999). RGD(Arg-Gly-Asp)-Peptide (Abb. 3) sind Liganden für transmembranöse Zellrezeptoren (Integrinrezeptoren), deren Funktion die Zelladhäsion an ein Substrat darstellt.



**Abbildung 3:** Strukturformel RGD. Aus: M. Kantlehner et al., 1999.

Es gibt einige Hinweise darauf, dass RGD-beschichtete Prothesen die Implantatfixation durch Erleichterung der Adhäsion osteogener Zellen an die Implantatoberfläche verbessert (Elmengaard et al., 2005). Osteoblasten exprimieren Integrine auf ihrer Zelloberfläche, an die die RGD-Peptide der beschichteten Implantate binden können (Abb. 4). RGD-Peptide sollen durch diesen Mechanismus die Osteointegration von beschichteten Implantaten verbessern (Elmengaard et al., 2005).



**Abbildung 4:** Knochen-Implantat-Interface. Aus: [www.ortho.med.tu-uenchen.de/forschung/Tissue-Engineering.html](http://www.ortho.med.tu-uenchen.de/forschung/Tissue-Engineering.html).

In vielen der bisher durchgeführten tierexperimentellen Studien über RGD-Peptid-Beschichtungen konnte eine erhöhte Knochenneubildung im Vergleich mit unbeschichteten Implantaten nachgewiesen werden (Kantlehner et al., 1999, Kantlehner et al., 2000, Elmengaard et al., 2005). Jedoch trat trotz gesteigerter Knochenneubildung keine signifikant bessere biomechanische Verankerung der Implantate im Knochen auf (Elmengaard et al., 2005).

In diesen Studien stellte RGD jeweils die einzige Beschichtung der Testimplantate dar. Über zusätzliche osteokonduktive oder antibiotikahaltige Beschichtungen gibt es in der Literatur bisher keine Angaben.

### 1.3.2 Protheseninfektionen

Die Inzidenz von Protheseninfekten nach Implantation eines künstlichen Hüftgelenkes liegt derzeit bei etwa 1,7% (Hanssen et al., 1999). In diesen Fällen ist oftmals ein Revisionseingriff erforderlich. Neben den erheblichen Konsequenzen für den Patienten verursachen diese Eingriffe einen großen personellen, apparativen sowie finanziellen Mehraufwand, den man durch eine sinnvolle Infektionsprophylaxe zu vermeiden sucht.

Ebenfalls zu beachten ist das Mortalitätsrisiko, das bei Protheseninfekten zu verzeichnen ist. Dieses liegt bei 65-jährigen Patienten zurzeit bei 0,4-1,2% und bei 80-jährigen Patienten bei 2-7% liegt (Fisman et al., 2001). Bei Auftreten von

multiresistenten Bakterien gestaltet sich die Behandlung deutlich schwieriger, und es kommt zu schlechteren Ergebnissen als bei Infektionen mit Keimen ohne Multiresistenzen (Kilgus et al., 2002).

### 1.3.2.1 Erregerspektrum

Die am häufigsten nachgewiesenen Keime bei Protheseninfektionen sind grampositive Erreger, vor allem koagulase-negative Staphylokokken, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus spp.* (seltener: *Enterococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* und *Acinetobacter spp.*). Bei den gramnegativen Erregern tritt *Pseudomonas spp.* als Haupterreger in den Vordergrund (seltener: *Bacteroides fragilis*) (Tab. 1) (Atkins et al., 1998, Trampuz und Zimmerli, 2005).

*Staphylococcus aureus* Stämme sind die am häufigsten nachgewiesenen Bakterien bei Knocheninfektionen ohne Implantat und sind auch bei Mischinfektionen häufig zu isolieren (Lew und Waldvogel, 2004; Schnettler et al., 1997; Perry et al., 1991).

*Staphylococcus epidermidis* und andere koagluase-negative Staphylokokken weisen eine besondere Affinität zu eingebrachten Fremdmaterialien auf, wie z.B. Osteosynthesematerialien oder Gelenkendoprothesen. Das häufige Vorkommen dieser Keime bei Protheseninfekten wird vor allem deren Biofilmbildungseigenschaften zugeschrieben. Auch Propionibakterien werden aus diesem Grunde bei Implant-assoziierten Infekten zunehmend häufiger gefunden (Lew und Waldvogel, 2004).

Bakterium	Häufigkeit
Koagulase-negative Staphylokokken	30-43 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	12-23 %
Streptokokken	9-10 %
Enterokokken	3-7 %
Gram-negative Stäbchen	3-6 %
Anaerobier	2-4 %
Mischflora	10-12 %
Unbekannt	10-11 %

**Tabelle 1:** Erreger von Protheseninfektionen in der Endoprothetik. Aus: Trampuz, Zimmerli 2005.

### 1.3.2.2 Pathogenese von Protheseninfektionen

Alle postoperativen Infektionen resultieren zum einen aus einer örtlichen Kontamination mit Keimen und zum anderen aus einer Schwächung der lokalen Immunabwehr. Darüber hinaus spielt die Virulenz des Kontaminationskeims eine bedeutende Rolle (Hansis und Arens, 1996). Oftmals kommt es zur Manifestation der Infektion, wenn die örtliche Infektabwehr zusammenbricht. Die Keime können sich dann ungehemmt vermehren und ausbreiten. Darüber hinaus können sie in der Folge zu Destruktionen körpereigenen Gewebes und zum Auftreten von systemischen Krankheitserscheinungen führen (Kälicke et al., 2004). Die Ursachen für solche postoperativen Infektionen sind vielfältig. Allgemeine Abwehrschwäche, z.B. bei höherem Lebensalter oder das Vorliegen von Vorerkrankungen sind mögliche Gründe (Lazzarini et al., 2004). Als weiterer Faktor sollte die traumatische Schädigung von Haut und Unterhautfettgewebe, Muskulatur und Weichteilen des Knochens sowie die vorübergehend auftretende Minderdurchblutung angeführt werden, die jeder operative Eingriff mit sich bringt (Lazzarini et al., 2004, Schnettler und Alt, 2005). Die Keimeinschleppung erfolgt intraoperativ durch die normale Hautflora des Patienten oder des OP-Personals sowie durch Keime aus der Luft (Bannister, 2002). Die klinische Manifestation einer Infektion wird jedoch stets durch das Zusammenspiel von örtlicher Keimeinsaat und lokaler Wirtsschädigung sowie evtl. durch eine systemisch bestehende Abwehrschwäche bestimmt. Trotz häufiger Kontamination kommt es nur in 1-2% zu einer manifesten Infektion.

Die Pathogenese von Knocheninfektionen, den so genannten Osteitiden, hat durch den vermehrten Einsatz von Osteosynthesematerialien und Gelenkendoprothesen in der Unfallchirurgie und orthopädischen Chirurgie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Bei einem Ungleichgewicht der Keim-Wirt-Beziehung zuungunsten des Wirtes kann es zum Zusammenbruch der lokalen Immunabwehr kommen (Robson, 1979). Die eingebrachten Keime können sich vermehren und infolge dessen kann sich zunächst ein periostaler Abszess bilden, der sich bis in die Haver`schen Kanäle des Knochens hinein fortsetzt. Durch Ausbreitung der intraossären Mikroabszesse und Einwirkung von Bakterientoxinen und –enzymen kommt es im Bereich der Kortikalis zur Minderdurchblutung und letztendlich zum Absterben einzelner Knochenareale (Sequesterbildung) (Müller, 2004/05, Hirner und Weise, 2004). Dies wiederum führt zu einem zunehmenden

Knochenverlust an der Grenze zwischen Implantat und Knochen und dadurch zur Lockerung des Implantats.

Bei chirurgischen Eingriffen, in denen Metall- bzw. Kunststoffimplantate zur Frakturstabilisierung oder zum künstlichen Gelenkersatz eingebracht werden, spielt die Fähigkeit einiger Bakterien zur Biofilmbildung eine bedeutende Rolle.

Glykokalix ist als eine von Bakterien gebildete, hauptsächlich aus Polysacchariden bestehende, extrazelluläre Substanz definiert, während man die angesammelte Biomasse von Bakterien und extrazellulärem Material auf einer festen Oberfläche als Biofilm bezeichnet (Costeron et al., 1999). In diesem Biofilm schaffen sich die Bakterien ein für sie vorteilhaftes Mikroklima mit hohen Konzentrationen an Nährstoffen und virulenzsteigernden Faktoren (Tsai, 1992). *Staphylococcus epidermidis* weist eine besonders ausgeprägte Glykokalix- bzw. Biofilmproduktion auf, die durch Überziehen der Metallfläche die Erreger vor der körpereigenen Immunabwehr und antibiotischen Therapie schützen (Costeron et al., 2005). *In vitro* Studien belegen, dass zur Abtötung von Bakterien innerhalb eines Biofilms eine 1000-fach höhere Antibiotikakonzentration benötigt wird als bei dem entsprechenden Stamm im Nicht-Biofilm-Milieu (Nickel et al., 1985).

Unmittelbar nach Einbringen jeden Implantates in den Organismus erfolgt eine Ablagerung von Proteinen und Glykoproteinen, wie Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen, Albumin und Vitronectin auf der Oberfläche des Fremdmaterials. Diese Schicht stellt eine Angriffsfläche für körpereigene und körperfremde Zellen dar (Malaisrie et al., 1998). Es kommt zu einer Art Wettlauf zwischen wirtseigenen Zellen, wie z.B. Fibroblasten und Osteoblasten, und den Bakterien um die Neubesiedlung der Oberfläche, das so genannte „race for the surface“ (Gristina et al., 1990). Verläuft dieser „Kampf“ zugunsten des Patienten, so bilden die körpereigenen Zellen eine flächendeckende Schicht aus vitalen Zellen auf der Implantatoberfläche, welches eine Infektion stark erschwert oder sogar unmöglich macht. Können jedoch die Bakterien die Oberfläche besiedeln, kommt es zu einem Überzug des Implantates mit Bakterien und anschließender Biofilmbildung und im weiteren Verlauf zu einer Implantat-assoziierten Infektion (Gristina, 1987, Gristina et al., 1990).

Des Weiteren scheint die Phagozytosefähigkeit der Leukozyten in Anwesenheit von Fremdmaterialien, wie Implantaten, herabgesetzt zu sein, was die

Infektanfälligkeit des Organismus zusätzlich steigert (Zimmerli et al., 1984, Shanbhag et al., 1992, Wagner et al., 2003).

*Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*, die häufigsten Vertreter von Protheseninfektionen, besitzen beide die Eigenschaft der Biofilmproduktion. Zusätzlich kann der entsprechende Keim über Exotoxin- und Hydrolasenproduktion in das interstitielle Gewebe sowie in andere Epithel- und Endothelzellen vordringen und somit unter Umständen eine begleitende Weichteilinfektion hervorrufen (Ellington et al., 2003, Sinha et al., 1999).

### **1.3.3 Prophylaxe von Protheseninfektionen**

Die Bedeutung der Antisepsis zur Vermeidung bakterieller Infekte wurde im 19. Jahrhundert durch das Verständnis der Pathogenese bakterieller Infektionen gewonnen (Povacz, 2000). In allen medizinischen Gebieten, jedoch besonders in der Chirurgie, beeinflussen diese Erkenntnisse bis heute das tägliche Handeln zur Infektionsprophylaxe.

#### **1.3.3.1 Allgemeine Prinzipien**

Wie bereits zuvor erwähnt gibt es einige Risikofaktoren, die die Entstehung einer Infektion beeinflussen, wie beispielsweise ein Diabetes mellitus, chronische Entzündungsherde (z.B. Harnwegsinfekte, Infekte im Zahn- und Kiefer- sowie Hautbereich), Über- oder Untergewicht, hohes Alter oder andere Immundefizienz fördernde Faktoren (HIV, Chemotherapie etc.) (Lazzarini et al., 2004).

In der Mehrzahl der Fälle erfolgt eine bakterielle Kontamination der Gelenkprothese intra- oder perioperativ über die körpereigene Mikrobiota des Patienten oder des OP- bzw. Pflegepersonals (Bannister, 2002). Daher ist die vordringlichste Maßnahme zur Minimierung des Infektionsrisikos die Ausschaltung potentieller Kontaminationsquellen im Operationssaal.

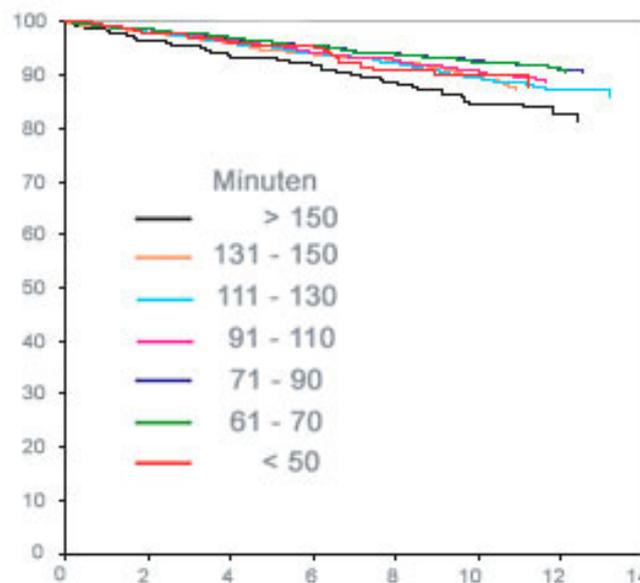
Seltenere Ursache für die Infektion einer Gelenkprothese sind Bakterien, die auf hämatogenem Wege von einem Entzündungsherd im Körper zum Gelenkimplantat gelangen.

Ebenso hat die Operationsdauer bei Endoprothesenimplantationen einen Einfluss auf die Infektionsgenese. Bei einer Operationsdauer von über 150 Minuten

verdoppelt sich das Infektionsrisiko bei der Primärimplantation von Gelenkprothesen (Abb. 5) (Smabrekke et al., 2004).

Weiterhin sind zur postoperativen Infektionsreduktion bzw. –vermeidung eine weichteilschonende Operationstechnik und das Vermeiden ausgedehnter Hämatomentstehungen intraoperativ von entscheidender Bedeutung.

Prothesenüberlebensrate (%)



Zeit nach Primärimplantation in Jahren

**Abbildung 5:** Kaplan-Meier-Überlebenskurve für 28.890 zementierte Hüfttotalendoprothesen in Norwegen zwischen 1987-2001. Aus: Smabrekke et al., 2004.

### 1.3.3.2 Perioperative Antibiotikaphylaxe

Die Wirksamkeit einer perioperativen systemischen Antibiotikaphylaxe in der Hüftendoprothetik ist für die Reduktion von Protheseninfekten in der Literatur anerkannt (Hanssen et al., 1997, Marcelscu und Osmon, 2005, Ruchholtz et al., 2004).

In Deutschland nähert sich die Gesamtrate der perioperativen Antibiotikaphylaxe bei Hüft-TEP-Operationen stetig der 100%-Grenze (2003: 97,6%, 2004: 97,9%, 2005: 98,2%, 2006: 98,8%, 2007: 99,3%) (Abb. 6) ([www.bqs.qualitaetsindikatoren.de/2007/](http://www.bqs.qualitaetsindikatoren.de/2007/)).

Die Applikation von Antibiotika kann entweder systemisch oder lokal oder in einer Kombination aus lokaler und systemischer Gabe erfolgen. Den Stellenwert der

Kombination aus lokaler und systemischer Antibiotikaprophylaxe belegt das Norwegische Hüftprothesen-Register. Demnach haben Prothesen eine längere Überlebenszeit, wenn die Prophylaxe lokal und systemisch erfolgt (Engesaeter et al., 2003).

Perioperative Antibiotikaprophylaxe				
Anteil von Patienten mit perioperativer Antibiotikaprophylaxe an allen Patienten				
Ergebnisse	2004	2005	2006	2007
Gesamtergebnis	97,9 %	98,2 %	98,8 %	99,3 %
Vertrauensbereich	97,8 - 98,0 %	98,2 - 98,3 %	98,8 - 98,9 %	99,3 - 99,4 %
Gesamtzahl der Fälle	137.758	143.993	146.575	152.273

**Abbildung 6:** Gesamtrate der perioperativen Antibiotikaprophylaxe bei Hüft-TEPs von 2004-2007. Aus: [www.bqs.qualitaetsindikatoren.de](http://www.bqs.qualitaetsindikatoren.de)

### 1.3.3.2.1 Systemische Antibiotikaprophylaxe

Mit der systemischen Gabe soll die Penetration des Antibiotikums in das Gewebe und den Knochen im Operationsgebiet gewährleistet und somit eine Senkung der postoperativen Infektionsrate erreicht werden. Zum Zeitpunkt der Hautinzision sollten wirksame Gewebespiegel des verwendeten Antibiotikums erreicht sein. Dies ist in der Regel gegeben, wenn das Antibiotikum zwischen 2 Stunden und 30 Minuten zuvor intravenös appliziert wird. Die in diesem Zeitfenster verabreichte Gabe ist mit den geringsten Infektionsraten korreliert. Frühere oder spätere Gaben lassen schlechtere Ergebnisse erwarten (Classen et al., 1992).

Da die potentiellen Keime in der Hüftendoprothetik vor allem grampositive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* und Gram-negative Keime wesentlich seltener Erreger von Protheseninfektionen sind, sollte ein geeignetes Antibiotikum neben einem breiten Wirkspektrum vor allem auch eine gute Wirksamkeit gegen Staphylokokken bieten. Weiterhin sollte das Antibiotikum rasch im Gewebe anfluten und möglichst lange in bakterizider Konzentration dort vorhanden bleiben (Alt und Schnettler, 2007). Daher gelten bakterizide Antibiotika wie Staphylokokken-wirksame Penicilline (Cloxacillin, Dicloxacillin) sowie Cephalosporine der 1. und 2. Generation (Cephazolin,

Cefuroxim) als gute Wahl zur Prophylaxe (Engesaeter et al., 2003). Das am häufigsten verwendete Antibiotikum ist Cephazolin, da es eine gute Verträglichkeit, eine gute Knochen- und Gewebspenetration und eine lange Halbwertszeit garantiert (Marcelscu und Osmon, 2005) und zudem noch sehr kostengünstig ist.

Als Alternative bei Unverträglichkeit von  $\beta$ -Laktamantibiotika oder Auftreten von multiresistenten Keimen sollte Vancomycin verwendet werden (Bratzler und Houck, 2004). Von einem generellen Einsatz von Vancomycin als Standardantibiotikum in der Endoprothetik sollte jedoch Abstand genommen werden, da Vancomycin im Gegensatz zu den Cephalosporinen eine wesentlich schlechtere Wirksamkeit gegen Staphylokokken aufweist (Fishmann und Brennan, 1997).

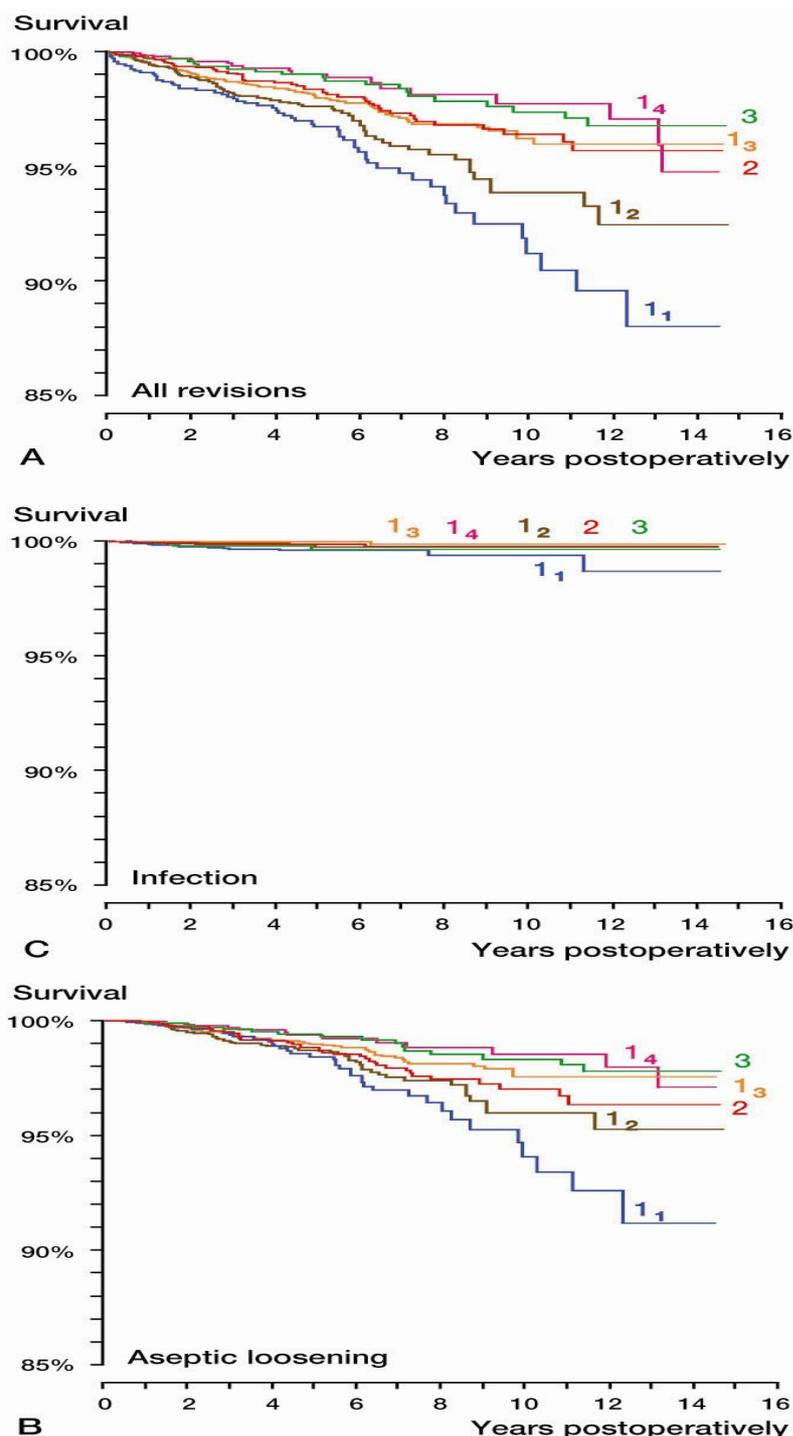
Wie schon zuvor erwähnt ist der Nutzen einer kombinierten systemischen und lokalen Antibiotikagabe zur Infektionsprophylaxe in der Literatur belegt. Engesaeter et al. (2003) fanden eine 1,4-fach erhöhte Revisionsrate nach Implantation von Hüftendoprothesen bei Patienten, die nur eine systemische Antibiotikagabe erhielten im Gegensatz zu Patienten mit lokaler, durch Verwendung von antibiotikahaltigem Knochenzement, und systemischer Prophylaxe.

Auch die Häufigkeit der Applikation des Antibiotikums spielt eine entscheidende Rolle zur Infektionsvermeidung. Es wurde unterschieden zwischen antibiotischen Gaben nur am Operationstag, für insgesamt zwei, drei oder mehr Tage. Das beste Outcome in dieser Studie hatte die viermalige i.v. Gabe am Operationstag (Abb. 7) (Engesaeter et al., 2003).

#### 1.3.3.2.2 Lokale Antibiotikaprophylaxe durch antibiotikabeladenen PMMA-Knochenzement

Polymethylmetacrylat (PMMA) wurde zunächst in der Zahn- und Kieferchirurgie verwendet und schließlich im Jahr 1947 erstmalig von den Judet Brüdern als Fixationsmaterial für Hüftendoprothesen angewendet (Ruckelhausen, 1987).

Im Laufe der Zeit kam es zu einer Weiterentwicklung des Knochenzements und zur Beimengung von Antibiotika, v.a. Gentamicin, zur Infektionsprophylaxe.



**Abbildung 7:** Überlebensraten von Hüftprothesen aus dem Norwegischen Hüftprothesenregister in Abhängigkeit der Häufigkeit und der Länge der systemischen Antibiotikagabe unabhängig des Revisionsgrundes **A**, abhängig von Revisionen aufgrund von Protheseninfektionen **C** oder abhängig von aseptischer Lockerung **B**. Ziffer 1 steht dabei für die eintägige, Ziffer 2 für die zweitägige und Ziffer 3 für eine dreitägige Antibiotikagabe. Die tiefgestellte Zahl unter der Ziffer 1 beschreibt die Häufigkeit der täglichen Antibiotikagabe. Aus: Engesaeter et al., 2003.

Durch die Freisetzung des Antibiotikums aus dem Zement kommt es zu einer lokalen Wirkstoffanreicherung im Knochen und im umliegenden Gewebe (Buchholz und Engelbrecht, 1970).

Gentamicin erweist sich bereits durch seine Hitzestabilität als geeignetes Antibiotikum, da PMMA beim Polymerisationsvorgang beim Aushärten des Zements Temperaturen zwischen 60-70°C in seiner Umgebung erreicht, durch die hitzelabile Wirkstoffe inaktiviert werden würden. Des Weiteren wird Gentamicin prolongiert nach Aushärtung aus dem Knochenzement freigesetzt (Buchholz und Engelbrecht, 1970).

Die zugesetzten Antibiotika im Knochenzement gelangen über Diffusion in das umliegende Gewebe und reichern sich im Wundgebiet an. Zum Erzielen einer ausreichenden Wirkung muss die Konzentration des Wirkstoffes über der minimalen Hemmstoffkonzentration des Bakterienwachstums (MHK), sowie der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) liegen (Engesaeter et al., 2003). Durch diesen Vorgang der lokalen Wirkstoffabgabe wird gerade bei Gentamicin im Gegensatz zu anderen getesteten Antibiotika ein hoher Wirkstoffspiegel im Zielgebiet erreicht. Insbesondere in den ersten Tagen nach der Implantation reichert sich das Antibiotikum im Knochen- und umliegenden Weichteilgewebe an und kann so die frühzeitige Entstehung eines bakteriellen Biofilms verhindern (Engesaeter et al., 2003). Gentamicinzusatz im Knochenzement entfaltet auch nach Jahren noch eine antibiotische Wirkung (Neut et al., 2003). Zudem ist die Antibiotikaanreicherung im Organismus und somit die systemische Belastung durch die lokale Applikation gering. Antibiotikanebenwirkungen treten daher seltener auf (Heck et al., 1995, Engesaeter et al., 2003). Aufgrund seiner guten Freisetzungskinetik, seines breiten Wirkspektrums, der hohen Bakterizidie, der geringen Rate an primär resistenten Erregern und guter Kombinierbarkeit mit anderen Antibiotika gilt Gentamicin als Antibiotikum der Wahl zur Beimengung zu PMMA-Knochenzement (Lidgren und Kühn, 2000).

Trotz positiver Ergebnisse einiger Studien mit antibiotikahaltigem Knochenzement ist dieses Verfahren in Europa zwar weit verbreitet, in der internationalen Literatur jedoch weiterhin umstritten. Besonders in den USA wird Antibiotikazusatz zum Knochenzement meist nur bei septischen Revisionsoperationen und nicht zur primären Infektionsprophylaxe bei Erstimplantationen verwendet (Jiranek et al., 2006). Begründet wird dieses Vorgehen mit fehlenden statistisch signifikanten

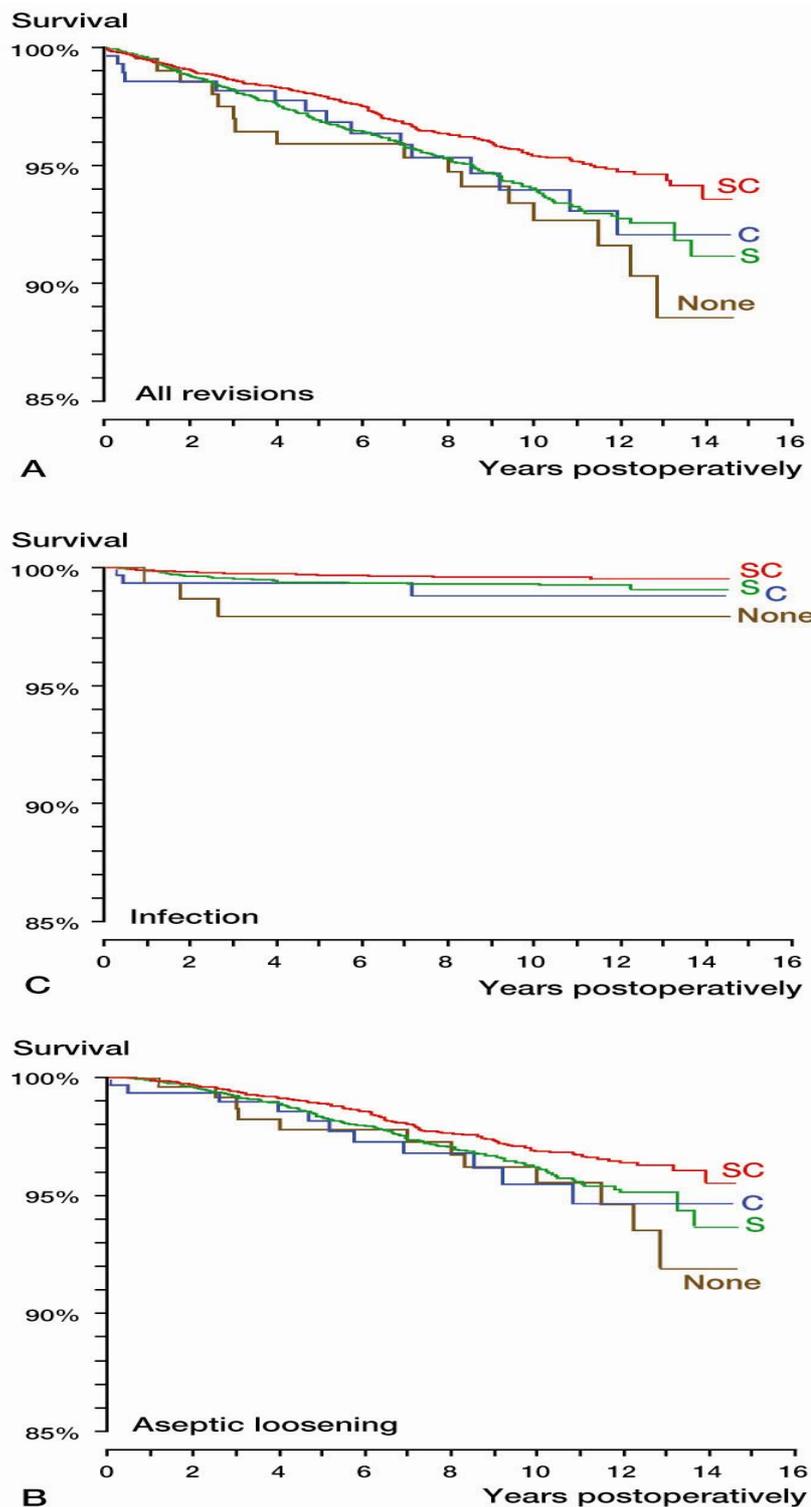
Daten zum Beweis der Reduktion der Infektionsrate bei Prothesenimplantation unter Verwendung von antibiotikahaltigem Zement gegenüber antibiotikafreiem Knochenzement. In Studien des Norwegischen Prothesenregisters konnte jedoch in mehreren Untersuchungen der Vorteil von Antibiotikazement gegenüber wirkstofffreiem Zement gezeigt werden (Malchau et al., 1993, Engesaeter et al., 2006).

Den Stellenwert der Kombination aus lokaler und systemischer Antibiotikaprophylaxe bei Erstimplantation von Hüftprothesen belegt das Norwegische Hüftprothesenregister. In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass Gelenkprothesen eine längere Standzeit aufweisen, wenn die antibiotische Prophylaxe systemisch und lokal verabreicht wird (Engesaeter et al., 2003). Es wurde ein postoperativer Verlauf von 10 Jahren bewertet. Als Endpunktkriterium wurden sämtliche Revisionsoperationen, sowohl alleinige Revisionsoperationen für aseptische Lockerung als auch alleinige Revisionsoperationen für Infektionen mit einbezogen. Bei einzig systemischer Antibiotikaprophylaxe war das Risiko für Revisionsoperationen 1,4fach erhöht im Gegensatz zu den Patienten, die eine kombinierte systemische und lokale Prophylaxe erhielten (Abb. 8).

### **1.3.3.3 Infektraten und -prophylaxe durch Beschichtung in der zementfreien Endoprothetik**

#### 1.3.3.3.1 Revisionsraten in der zementfreien vs. zementierter Endoprothetik

Neuere Studien haben ergeben, dass die Revisionsrate verursacht durch Infektionen bei zementfreien Prothesen ähnlich der von zementierten Endoprothesen mit Antibiotikazusatz des Zements ist (Engesaeter et al., 2006). Im Gegensatz dazu gibt es bei zementierten Hüftendoprothesen ohne Beimengung von Antibiotika zum Knochenzement deutlich schlechtere Ergebnisse hinsichtlich der Revisionsrate (Engesaeter et al., 2006). Diese Studie zeigte jedoch ebenfalls, dass Revisionen aufgrund aseptischer Lockerung bei unzementierten Hüftendoprothesen noch erheblich häufiger notwendig waren als bei zementierter Technik.



**Abbildung 8:** Überlebensrate von Hüftprothesen aus dem Norwegischen Hüftprothesenregister ohne Antibiotikaprophylaxe (None), mit systemischer Antibiose (S), mit antibiotikabeladenem Knochenzement (C) oder einer Kombination aus systemischer Antibiose mit antibiotikahaltigem Knochenzement (SC). Überlebensraten sind unabhängig vom Revisionsgrund (A), abhängig von Revisionen aufgrund aseptischer Lockerung (B) oder abhängig von Protheseninfekten (C) aufgezeigt. Aus: Engesaeter et al., 2003.

Auch das schwedische Hüftregister belegt, dass die Standzeiten bei unzementierter Technik aufgrund höherer aseptischer Lockerungsraten kürzer seien als bei zementierten Totalendoprothesen.

Nach 13 Jahren betrug die Überlebensrate in einer Kohorte von 1989-2002 72 % (zementfrei) gegenüber 92 % (zementiert) (Swedish Hip Arthroplasty Register, 2005). Eskelinen und Mäkelä et al. zeigten wiederum in ihrer Studie mit einem Beobachtungszeitraum von 25 Jahren, dass es keine Unterschiede bezüglich der Überlebenszeit von modernen zementfrei eingebrachten Prothesen gegenüber zementierten Prothesen gibt (Mäkelä et al., 2008).

#### 1.3.3.3.2 Antimikrobielle Beschichtungen für zementfreie Endoprothesen

Bei der zementfreien Verankerung von Hüftendoprothesen gibt es bislang, ausgenommen den allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen und der systemischen Antibiotikagabe, keine adäquate Möglichkeit zur lokalen Infektprophylaxe. Aus diesem Grund werden Überlegungen zur Entwicklung eines wirksamen Infektionsschutzes bei zementfreier Verankerung angestellt. Auf diesem Weg ist die Idee zur Herstellung beschichteter, zementfreier Endoprothesen entstanden, die durch eine Antibiotikabeschichtung auf Basis einer Hydroxylapatit-Matrix eine Methode zur Infektvermeidung darstellt. Es existieren mehrere Studien über die *in vitro* Freisetzungskinetik von Gentamicin, Tobramycin und Vancomycin sowie einigen anderen Wirkstoffen und HA-beschichteten Implantaten, die in mikrobiologischen Untersuchungen allesamt eine antibakterielle Wirksamkeit aufwiesen (Campbell et al., 2000, Stigter et al., 2002, Stigter et al., 2004), jedoch sind bisher keine weiteren Tierstudien oder gar klinische Daten erhältlich.

##### 1.3.3.3.2.1 Das Antibiotikum Gentamicin

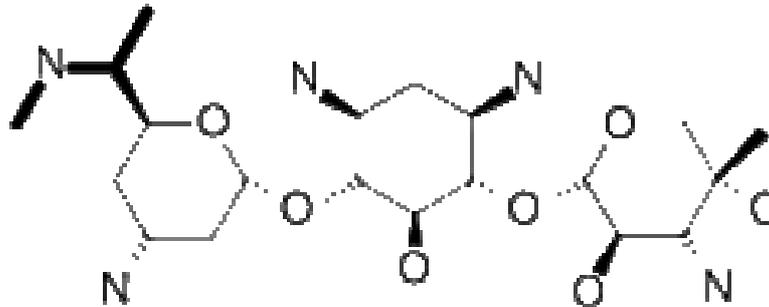
Gentamicin ist ein bakterizid wirkendes Antibiotikum aus der Gruppe der Aminoglykoside. Es besteht aus drei von *Micromonospora purpurea* gebildeten Antibiotika, die man zusammen als Gentamicin bezeichnet (Abb. 9). Dieses Antibiotikum wirkt gleichermaßen auf Bakterien, die sich sowohl in der Ruhephase als auch in der Teilungsphase des Vermehrungszyklus befinden. Das Prinzip beruht auf der Störung der bakteriellen Proteinsynthese. Zum einen kommt es zur

Bindung an die 30S-Untereinheit der Ribosomen, so dass die Anlagerung der N-Formylmethionyl-t-RNA blockiert wird. Der Start der Proteinbiosynthese wird somit unterdrückt. Zum anderen wird eine Blockierung der Bindung der Aminoacyl-t-RNA an die Ribosomen ausgelöst, welches die Verlängerung der angefangenen Eiweißkette verhindert. Zusätzlich werden durch die Ankoppelung des Antibiotikums an die Ribosomen falsche Struktur- und Enzymproteine (sog. „Nonsense-Proteine“) gebildet, die durch massive Membranschädigung der Bakterien zum Absterben der Keime führen.

Gentamicin wird im klinischen Alltag lokal oder systemisch angewendet. Die lokale Applikation findet häufig Gebrauch in der Augenheilkunde in Form von Salben oder Tropfen bei bakteriellen Infekten des Auges oder zur Infektprophylaxe bei operativen Eingriffen am Auge. Bei bakteriellen Wundinfektionen kann Gentamicin lokal als Salbe oder Sprühverband oder als Beimengung von PMMA-Kugelketten zur Vorbeugung und Behandlung einer Osteitis angewendet werden. Infektionen der Atemwege, des Magen-Darm-Traktes sowie des Urogenitaltraktes werden durch systemische Gabe von Gentamicin bekämpft. Weitere Indikationen für den Einsatz dieses Antibiotikums sind Infektionen der Haut, des Weichteilgewebes und des zentralen Nervensystems sowie bei Sepsis und Infektionen nach Verbrennungen. Um eine systemische Wirkung entfalten zu können muss Gentamicin parenteral verabreicht werden, da die Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt bei oraler Applikation zu gering wäre.

Eine Schwäche der Aminoglykoside sind deren geringe therapeutische Breite und erhebliche Nebenwirkungen, die hauptsächlich bei systemischer Anwendung zum Tragen kommen. Im Vordergrund hierbei stehen die gravierende Ototoxizität und Nephrotoxizität, besonders bei Auftreten hoher Antibiotikaspiegel (kritischer Spiegel: 10µg/ml) und vorgeschädigten Nieren. Gentamicin wird renal durch glomeruläre Filtration eliminiert, was die nephrotoxischen Nebenwirkungen bei Überdosierung erklärt. Des Weiteren kann es zur Atemdepression, Blutbildveränderung, Muskelschwäche, Arthralgie, Fieber und Exanthembildung, sowie zu neuromuskulären Blockaden im Bereich des Nervensystems kommen. Manchmal kann eine vorübergehende Erhöhung der Leberenzymwerte (GOT, GPT, AP) auftreten. Allergische Reaktionen werden selten beobachtet, es kommt jedoch zunehmend zur Ausbildung von Kreuzallergien zwischen den Aminoglykosiden. Gentamicin sollte nicht mit anderen nieren- oder gehörgang-

schädigenden Arzneimitteln angewendet werden, da eine Verstärkung der unerwünschten Wirkungen auftreten kann. Vorbestehende Erkrankungen in diesen Bereichen stellen eine Kontraindikation für die Anwendung von Aminoglykosiden dar (Strauß 1999, Kayser 2001, Daschner 2002).



**Abbildung 9:** Strukturformel des Antibiotikums Gentamicin. Aus: [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)

Gentamicin hat ein breites Wirkungsspektrum, das sich von gramnegativen Stäbchen, einschließlich *Pseudomonas aeruginosa*, bis hin zu grampositiven Kokken, hauptsächlich *Staphylococcus aureus*, erstreckt. Pneumokokken,  $\beta$ -Streptokokken sowie Enterokokken sind jedoch nur mäßig sensibel bis resistent. Bei zusätzlicher Gabe von Gentamicin zu Penicillinen und Cephalosporinen (allg.  $\beta$ -Laktamantibiotika) kommt es zu einer synergistischen Wirkungssteigerung dieser Antibiotika (Daschner, 2002, Strauß, 1999).

Aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums, seiner Hitzebeständigkeit und seiner vorteilhaften Elutionskinetik stellt Gentamicin den gebräuchlichsten Antibiotikazusatz zu Knochenzement dar (Neut et al., 2003).

Gentamicin ist auch für die Beschichtung von Implantaten ein geeignetes Antibiotikum. Es existieren bereits mehrere tierexperimentelle Studien über den Gebrauch von Gentamicin als antimikrobielle Beschichtung von Osteosynthesematerialien, die dessen Wirksamkeit zur Infektionsprophylaxe belegen (Lucke et al., 2003, Lucke et al., 2005).

### 1.3.3.3.3 Spezielle Aspekte von Beschichtungen für zementfreie Endoprothesen

Bei zementierten Prothesen kann durch Zusatz von Antibiotika zum Knochenzement eine lokale Prophylaxe zusätzlich zur systemischen erfolgen. Beschichtungen von zementfreien Endoprothesen mit einem Antibiotikum wären ein Fortschritt zur Verbesserung der Infektionsprophylaxe bzw. die Möglichkeit der Durchführung einer lokalen Antibiotikaprophylaxe auch bei dieser Implantationstechnologie.

Jedoch gibt es in der Literatur Hinweise, dass sowohl Gentamicin als auch Tobramycin negative Effekte auf Osteoblasten ausüben (Düwelhenke et al., 2007, Miclau et al., 1996), die die knöcherne Integration des Implantats erschweren könnte. Somit muss bei der Entwicklung von adäquaten Implantatbeschichtungen sowohl die antimikrobielle Komponente als auch die Osteointegrationsfähigkeit des Materials berücksichtigt werden.

Hydroxylapatit, welches in der Vergangenheit eine gute Osteointegrationsfähigkeit aufgewiesen hat, wird üblicherweise mit Hilfe des „Plasma-Spray-Coatings“ auf die Implantate aufgebracht. Dieses Verfahren ist jedoch für die Beschichtung einer Oberfläche mit biologisch aktiven Molekülen ungeeignet, da durch die enormen Temperaturen, die bei diesem Vorgang entstehen, die Moleküle inaktiviert würden und somit nutzlos wären (Stigter et al., 2002).

Deshalb wird nach neuen Methoden gesucht, um Antibiotika auf eine Implantatoberfläche aufzubringen. Ein Ansatz ist ein „biomimetisches“ Verfahren, bei dem Calciumphosphat als Grundlage für weitere Beschichtungen dient (Stigter et al., 2004). Dabei wird das zu beschichtende Metallimplantat in eine mit Kalziumphosphat gesättigte Lösung eingetaucht. Im Anschluss daran findet eine Immersion in eine Antibiotika-Kalziumphosphat-Lösung statt. Mittels dieser Technik konnte die *in vitro* Freisetzungskinetik des Antibiotikums, in diesem Falle wurde Tobramycin getestet, im Gegensatz zu einer Beschichtung durch einfaches Eintauchen („soaking“) in eine Antibiotikallösung verbessert werden (Stigter et al., 2002). Für andere Antibiotika zeigte dieses Verfahren jedoch unvorteilhafte Freisetzungskinetiken, so dass die Anwendung dieser Technik wieder verworfen wurde. Daher besteht weiter Forschungsbedarf, um eine adäquate Methode zum Aufbringen von Antibiotika auf Oberflächen von Prothesen zu entwickeln, die gute Freisetzungskinetiken des Antibiotikums zeigt und gleichzeitig die knöcherne Integration des Implantats nicht stört.

## 1.4 Problemstellung

Protheseninfektionen stellen immer noch eine häufige Komplikation in der zementfreien Endoprothetik dar. In der zementierten Endoprothetik konnte durch antibiotikabeladenen Knochenzement eine adäquate Lösung zur lokalen Antibiotikaprophylaxe mit deutlicher Reduktion der Infektionsraten gefunden werden. Eine ähnliche Möglichkeit zur lokalen Antibiotikaprophylaxe konnte für zementfreie Prothesen bisher nicht entwickelt werden. Viele der getesteten antimikrobiellen Beschichtungen zeigten eine schlechte *in vitro* Freisetzungskinetik des Antibiotikums oder bargen das Risiko einer Verschlechterung der knöchernen Integration des Implantats.

In tierexperimentellen Studien führte das Aufbringen einer Aminosäuresequenz (RGD) zur Stimulation des Knochenwachstums und somit zur besseren Osteointegration von Titanimplantaten. Diese Eigenschaft von RGD könnte die negativen Auswirkungen von Gentamicin auf Osteoblasten kompensieren.

Die Problemstellung der vorliegenden Arbeit ist, die antimikrobielle Wirksamkeit einer kombinierten Gentamicin-HA- bzw. Gentamicin-HA-RGD- im Vergleich zu einer reinen HA-Beschichtung zu testen. Diese Beschichtungen wurden auf K-Drähten aufgebracht und in einem Kaninchen-Infektionsprophylaxe-Modell mit Inokulation eines *Staphylococcus aureus* Stamms evaluiert.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

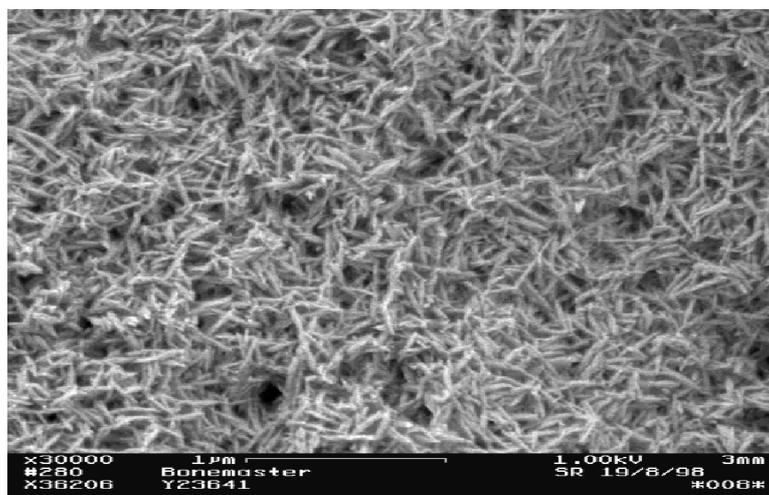
### 2.1 Implantate und Beschichtungstechnologien

#### 2.1.1 Kirschner-Drähte

Zum Einsatz für das Versuchsvorhaben kamen Kirschner-Drähte (K-Drähte) aus Implantatstahl (1.4441) mit einer Länge von 11 cm und einem Durchmesser von 2 mm, die als Grundlage für die Beschichtungen dienten. Die Oberfläche dieser Pins wurde mit Sandstrahlen (EK 54) aufgeraut. Einseitig wiesen die Stifte ein so genanntes Apex-Design (Trokar-Spitze) auf (Abb. 14).

#### 2.1.2 Hydroxylapatit(HA)-Beschichtung

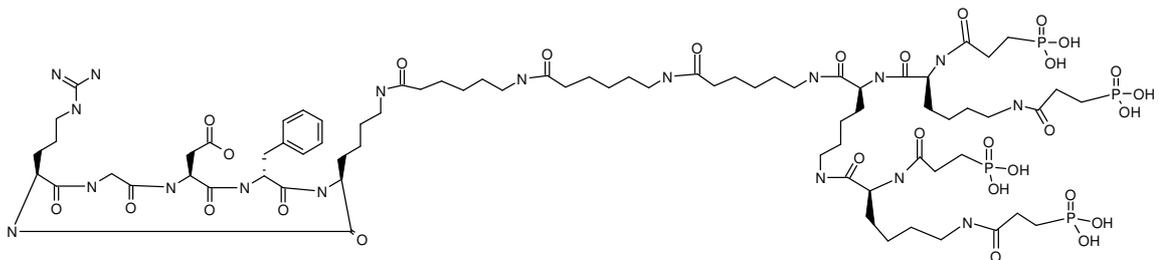
Die Beschichtung der Implantatstifte erfolgte mit Hilfe eines elektrochemisch gestützten Verfahrens. Hydroxylapatit wurde unter galvanostatischen Bedingungen bei Stromdichten von bis zu  $-10 \text{ mA/cm}^2$  für ca. 120 min. mittels kathodischer Polarisation der Probe durch eine  $(\text{Ca}^{2+}/\text{H}_x\text{PO}_4^{(3-x)-})$  enthaltene Elektrolytlösung (0,033 M  $\text{CaCl}_2$  und 0,02 M  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , im Verhältnis 1:20 mit Wasser verdünnt) bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  und einem pH-Wert von 6,4 auf das Trägermaterial aufgebracht. Daraus resultierte eine HA-Beschichtung mit einer Dicke von  $5 \mu\text{m}$ , die eine nadelartige Morphologie, bestehend aus Kristalliten mit einer typischen Länge von 300 nm und einem Durchmesser von 60 nm, aufwies (Abb. 10).



**Abbildung 10:** Hydroxylapatitbeschichtung. Aus: Roessler et al., 2003.

### 2.1.3 RGD-Beschichtung

Ein Teil der K-Drähte erhielt zusätzlich eine Beschichtung aus cyclischem RGD-Peptid (Abb. 2), welches hochselektiv für  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_v\beta_5$ - Integrinrezeptoren von Osteoblasten ist (Kantlehner et al., 1999). Das Aufbringen des Moleküls auf die HA beschichtete Oberfläche erfolgte durch vier Phosphonatgruppen als Ankermoleküle mittels einer bezüglich der Länge optimierten Spacersequenz. Die Beschichtung wurde durch eine 12-stündige Inkubation der Proben über Nacht in einer RGD-Lösung in Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  erreicht. Anschließend erfolgte eine Spülung mit Wasser, um überschüssiges Material in Form von ungebundenem Protein abzuwaschen.



**Abbildung 11:** Strukturformel des Phosphonatpeptids. Aus: M. Kantlehner et al., 1999.

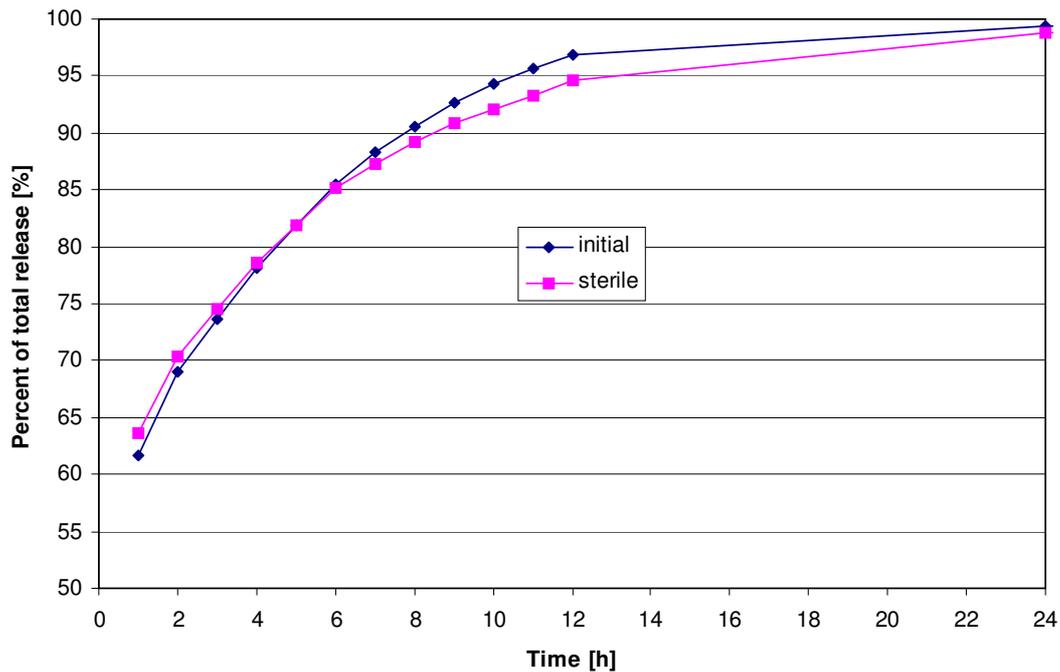
### 2.1.4 Gentamicin-Beschichtung

Eine zusätzliche Gentamicin-Beschichtung wurde sowohl bei HA beschichteten als auch bei HA-RGD beschichteten K-Drähte aufgebracht. Das Antibiotikum wurde mittels eines InkJet-Verfahrens auf die Implantatoberfläche mit Hilfe eines Industrieroboters aufgebracht (Abb. 12). Dieses Verfahren erlaubt eine genaue Einstellung des Spritzvolumens, so dass die Belegungsdichte der Oberfläche von 250  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Gentamicin einheitlich erzielt werden kann. Die aufgebrauchte Gentamicin-Lösung besteht zu 50% aus leicht wasserlöslichem Gentamicinsulfat (Fujian Fukang Pharmaceutical, Fuzou, China) mit einer schnellen Freisetzungsrate und zu 50% aus schwer wasserlöslichem Gentamicincrobat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit einer langsameren Freisetzungsrate.

Bei dieser kombinierten Beschichtung werden 60 % des Gesamtgentamicins sofort innerhalb der ersten zwei Stunden freigesetzt (Abb. 13). Anschließend kommt es zu einer weiteren prolongierten Freisetzung über insgesamt 24 Stunden. In den ersten beiden Stunden werden das gesamte leicht wasserlösliche Gentamicinsulfat und 10-15 % des schwer wasserlöslichen Gentamicincrobefats abgegeben während dann über weitere 22 Stunden die Restfreisetzung des Gentamicincrobefats erfolgt. Im Anschluss an das Aufbringen des Gentamicins auf die Implantate findet ein Sterilisationsprozess mittels Gammastrahlung statt, der die Freisetzungskinetik nur unwesentlich beeinträchtigt (Abb. 13).



**Abbildung 12:** Industrieroboter zum Aufbringen der Gentamicin-Beschichtung. Roboter mit Mehrgelenkarm und Spritzdrüsenvorrichtungen zum Aufbringen der Kombinierten Gentamicin-Sulfat-Crobefat-Beschichtung auf das Implantat (Fa. Biomet, Berlin).



**Abbildung 13:** Freisetzungskinetik der Gentamicin-Kombinationsbeschichtung aus Gentamicin-Crobofat und Gentamicin-Sulphat vor und nach der Sterilisation mit Gamma-Strahlung (25 kGy).

### 2.1.5 Getestete Implantatbeschichtungen

In der vorliegenden Arbeit kamen verschiedene Implantatbeschichtungen zum Einsatz (Abb. 14). Als Kontrollgruppe (Gruppe 1) diente ein durch Sandstrahlung aufgerauter Kirschner-Draht aus Implantatstahl (1.4441) mit Hydroxylapatitbeschichtung mit einem Durchmesser von 2,0 mm. Auf diese Implantate wurde dann entweder eine Gentamicin- (Gruppe 2) oder eine kombinierte RGD-Gentamicin-Beschichtung (Gruppe 3) aufgebracht (Abb. 14). Die Gentamicinbeschichtung bestand wie zuvor erläutert zu 50 % aus Gentamicinsulfat und zu 50 % aus Gentamicincrobofat. Die Grünfärbung dieser Implantatstifte kommt durch das Aufbringen des gelblichen Gentamicincrobofats auf die graue Hydroxylapatitgrundschrift zustande.



**Abbildung 14:** K-Drähte mit den unterschiedlichen Beschichtungen. K-Draht mit Hydroxylapatit-Beschichtung (Nr. 1), K-Draht mit Hydroxylapatit- und Gentamicin-Beschichtung (Nr. 2), K-Draht mit Hydroxylapatit-, RGD- und Gentamicin-Beschichtung (Nr. 3).

## 2.2 Tierversuche

### 2.2.1 Studiendesign

#### 2.2.1.1 Ethikkommissionsvotum

Der Tierversuchsantrag auf Genehmigung dieses Versuchsvorhabens wurde gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes bei der Tierschutzkommission des Thüringischen Landesamtes für Lebensmittel- und Tierschutz des Regierungspräsidiums Thüringen gestellt und genehmigt (Registrationsnummer: 14-03/04).

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

#### 2.2.1.2 Randomisierung der Tiere

Um Schwankungen innerhalb der Versuchsgruppen minimal zu halten und somit vergleichbare Bedingungen zwischen den Tieren der verschiedenen Gruppen schaffen zu können, wurden die einzelnen Tiere mithilfe einer Randomisierungsliste den verschiedenen Gruppen zugeteilt. Diese Liste wurde

durch einen computergesteuerten Zufallsgenerator erstellt. Den Tieren wurde dann in der Pilot- und Hauptstudie der durch die Randomisierungsliste vorgesehene Implantattyp in die Tibia eingesetzt.

### 2.2.1.3 Pilotstudie

Es wurde an 12 Tieren zunächst eine Pilotstudie durchgeführt, um die ideale Keimdosis für die Hauptstudie zu testen. Zu diesem Zweck wurden 6 Kaninchen Gentamicin freie HA-beschichtete (Negativkontrollgruppe) und 6 Tieren Gentamicin-HA-beschichtete K-Drähte implantiert. Jeweils 2 Tieren dieser Gruppen wurden nach Einlage des K-Drahtes Keimsuspensionen mit Konzentrationen von  $10^4$ ,  $10^6$  und  $10^8$  keimbildende Einheiten (KBE) *Staphylococcus aureus* injiziert. Die Beobachtungsdauer der Tiere betrug vier Wochen.

Implantate	HA-beschichteter K-Draht	Gentamicin-HA-beschichteter K-Draht
Keimmenge	Anzahl der Tiere	Anzahl der Tiere
$10^4$ KBE	2	2
$10^6$ KBE	2	2
$10^8$ KBE	2	2

**Tabelle 2:** Studiendesign und Anzahl der Tiere für die Pilotstudie zur Bestimmung der Inokulationsdosis für die Hauptstudie.

### 2.2.1.4 Hauptstudie

Für die Hauptstudie wurden 30 Tiere randomisiert 3 Gruppen zugeteilt. Gruppe 1 erhielt Gentamicin freie HA-beschichtete Implantate und diente somit als Kontrollgruppe. Den Tieren aus Gruppe 2 wurden Gentamicin-HA-beschichtete und denen aus Gruppe 3 Gentamicin-HA-RGD-beschichtete K-Drähte implantiert. Die in der Pilotstudie ermittelte Infekt auslösende Keimmenge von  $10^7$  KBE *Staphylococcus aureus* wurde allen Tieren der Hauptstudie in den rechten

Tibiamarkkanal injiziert. Der Beobachtungszeitraum betrug wiederum vier Wochen.

	HA-beschichteter K-Draht	Gentamicin-HA- beschichteter K-Draht	Gentamicin-HA- RGD-beschichteter K-Draht
<b>Anzahl der Versuchstiere</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

**Tabelle 3:** Studiendesign und Anzahl der Tiere für die Hauptstudie zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit mit einer Kontroll- und zwei Gentamicin-Gruppen.

### 2.2.2 Bakterien

Als bakteriologisches Inokulum wurde ein Human- und Kaninchen-pathogener *Staphylococcus aureus* Stamm, der vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen stammte, verwendet.

Die Bakterien wurden aus dem Leistenabstrich eines Menschen mit vorliegender Wundinfektion isoliert. Es erfolgte die Anzüchtung des Keimes in Reinkultur und die Benennung des so gewonnenen Referenzstammes in EDCC (Eugen Domann Culture Collection) 5055. Das Isolat wurde durch Testung der biochemischen Charakteristika von *St.aureus* mittels API®Staph (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) sowie durch Sequenzierung des 16S rDNA Gens und des Nachweises der *femB*- und *coa*-Gene durch PCR geprüft. Als besondere Merkmale des Stammes traten eine starke hämolytische Aktivität und eine gute Biofilmbildung in den Vordergrund. Es bestand eine Sensibilität des Bakteriums gegenüber Flucloxacillin, Ofloxacin und Gentamicin. Als minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) von Gentamicin wurde 0,25 µg/ml ermittelt.

Zur Herstellung der zu verwendenden Keimsuspension für die Operationen wurde das Isolat in Brain Heart Infusion (BHI)-Nährbouillon bei 37°C 16 Stunden unter kräftigem Schütteln inkubiert. Dieses Nährmedium ermöglicht durch eine optimale Nährstoffzusammensetzung (Gehirn-Herz-Bestandteile vom Rind, Casein, Peptongemisch, Hefeextrakt, Dextrose, Natriumchlorid) ein gutes Wachstum der

Keime. Die Kultur wurde 1:50 mit PBS-Puffer verdünnt und wiederholt mit oben beschriebenen Verfahren für 4 Stunden bearbeitet. Anschließend erfolgte eine weitere Verdünnung auf 1:10 und die Kultivierung der Keimsuspension auf BHI-Agarplatten. Um eine genau definierte Konzentration des *Staphylococcus aureus*-Stammes (in keimbildenden Einheiten (KBE/ml)) zu erhalten, erfolgte die Ausimpfung mittels „Spiral Plater“ (Abb. 15a).

Unter einem „Spiral Bacterial Plater“ versteht man einen Mikroprozessor gesteuerten Dispenser, der flüssige Proben in einer linearen Bewegung in einem Spiralmuster auf die Oberfläche einer rotierenden Agarplatte aufträgt. Mit Hilfe dieser Technik wird eine vom Zentrum zur Peripherie abnehmende Probenmenge auf der Platte platziert (Abb. 15b). Diese Methode erlaubt eine schnelle Aufzählung von Bakterien, ohne zusätzliche Verdünnungsschritte durchführen zu müssen.

Für die Operationen wurden mehrere Suspensionen mit einem Endvolumen von 160  $\mu\text{l}$  und einer Konzentration von  $10^7$  KBE / 20  $\mu\text{l}$  in BHI / 20% Glycerol für die Hauptstudie und Konzentrationen von  $10^4$ ,  $10^6$  oder  $10^8$  KBE für die Pilotstudie hergestellt und bis zu ihrem Gebrauch bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Intraoperativ wurden 20  $\mu\text{l}$  dieser Suspension, also  $10^7$  KBE in der Hauptstudie bzw.  $10^4$ ,  $10^6$  oder  $10^8$  KBE in der Pilotstudie in den Tibiamarkkanal inokuliert.



**Abbildung 15:** Spiral Bacterial Plater (Topac, Cohasset, USA) (a) mit im Spiralmuster beimpfter Agarplatte (b).

### **2.2.3 Versuchstiere**

Kaninchen werden in der Literatur häufig für Infektionsversuche verwendet und wurden auch als Tierspezies für dieses Vorhaben ausgewählt.

Die Versuchsreihen wurden an New Zealand White Rabbits aus der Kleintierzucht R. Krieg (Krieg, 06255 Wunsch/Niederwünsch) durchgeführt.

Die Aufzucht erfolgte unter einheitlichen Bedingungen. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren die Tiere ca. drei Monate alt und wiesen ein Körpergewicht von durchschnittlich 3600 g (2840-4200 g) auf. Die Haltung der Tiere erfolgte im Laufstall mit Einstreu. Um eine Gewöhnung der Tiere an die Umgebung zu erreichen wurden sie 14 Tage vor Versuchsbeginn eingestallt. Die Versuchstiere erhielten täglich 300 g Kaninchenstandarddiätfutter und waren zu jeder Zeit mit ausreichend Wasser und Heu versorgt. Die Ernährung erfolgte ohne Zugabe von Antibiotika zum Futter.

### **2.2.4 Narkose**

Die Versuchstiere wurden durch Injektionsnarkose anästhesiert und von einer Tierärztin während der kompletten Narkosedauer überwacht.

10 Minuten nach der initialen Verabreichung des Hypnotikums Xylazin (6 mg/kg KG; Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen) erhielten die Kaninchen Ketamin (60 mg/kg KG) sowie Atropin (0,1 mg/kg KG; Braun, Melsungen) als intramuskuläre Injektion. Bei Bedarf wurden 0,2 ml/kg KG Ketamin nachdosiert. Die OP-Dauer betrug ca. 20-30 Minuten, wofür eine Injektionsnarkose ausreichend war.

Direkt postoperativ erhielten die Tiere Carprofen (0,4 mg/kg KG s.c., Rimadyl<sup>®</sup>, Pfizer, Karlsruhe) als Schmerzmedikation, was auch zur weiteren Analgesie in den ersten postoperativen Tagen verabreicht wurde.

Vor der Euthanasie erhielten die Tiere erneut Ketamin (60 mg/kg KG), die Tötung selbst erfolgte durch eine intrakardiale Injektion von 4-5 ml Embutramid (T61<sup>®</sup>, Hoechst Veterinär, Unterschleißheim).

### 2.2.5 Operationstechnik mit Inokulation der Bakterien

Die Operationen wurden nach Genehmigung des Tierversuchantrags in einem tierklinischen Operationssaal im Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie (fzmb) e.V. in Bad Langensalza, Thüringen, unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. In Vorbereitung auf den operativen Eingriff wurde zunächst das rechte Bein der Tiere rasiert und das Hautareal über der Tibia desinfiziert (Braunovidon<sup>®</sup>, B. Braun, Melsungen). Das Operationsfeld wurde mit Einmaltüchern steril abgedeckt, die Kaninchen darauf platziert und deren Körper ebenfalls in sterile Tücher gehüllt.

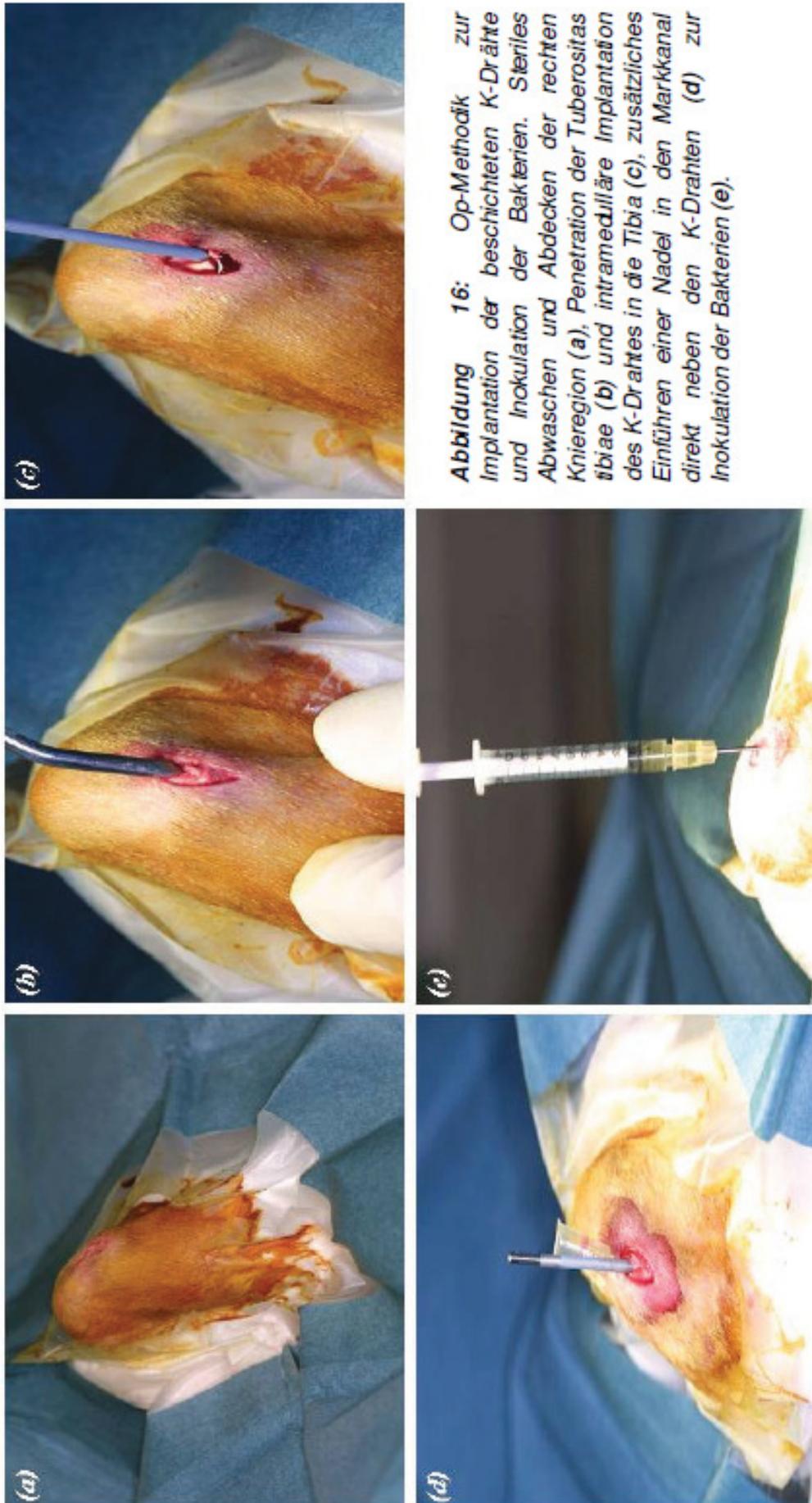
Die Haut wurde durch einen 1 cm langen infrapatellaren Schnitt inzidiert. Anschließend erfolgte die Spaltung der Patellarsehne in Längsrichtung. Die Tuberositas tibiae wurde mit Hilfe eines Pfriems durchstoßen und somit die Markhöhle eröffnet. Der beschichtete K-Draht wurde nun bis zur distalen Tibia eingeführt und der überstehende Teil auf Höhe der Tuberositas tibiae abgeschnitten (Abb. 16).

Anschließend wurden 20 µl der *Staphylococcus aureus*-Suspension (entsprechend der festgelegten Keimdosis) mittels einer langen Kanüle in den Intramedullarkanal injiziert. Die Injektion des Inokulums erfolgte auf Höhe der Tibiadiaphyse zwischen K-Draht und Kortikalis. Zur Bestätigung der Keimmenge wurden nachfolgend weitere 20 µl der Suspension zur Kontrolle der Vitalität der Keime auf BHI-Agarplatten ausgeimpft. Nach sorgfältigem Ausspülen der Wunde wurden das Peritendineum der Patellarsehne sowie die darüber liegende Haut genäht und mit Hautklammern und Sprühpflaster verschlossen.

### 2.2.6 Postoperative Röntgenkontrolle

Eine postoperative Röntgenkontrolle wurde bei jedem Tier noch in Narkose zwecks Sicherung der korrekten Implantatlage im Knochenmarkskanal durchgeführt (Abb. 17).

Als Röntgengerät wurde ein Gierth HF 300 (Gierth X-ray, Riesa) benutzt. Bei einem Abstand des Unterschenkels zum Röntgengerät von 30 cm wurde mit 40 kV und 60 mA gearbeitet.





**Abbildung 17:** Postoperative Röntgenkontrolle nach Implantation eines K-Drahtes in die rechte Tibia. Das Einbringen des Drahtes erfolgte bis distal in das Ende des Markkanals. Am Knie sind zwei Wundklammern zu sehen, die als Wundverschluss über der Tuberositas tibiae dienen.

### 2.2.7 Postoperative Beobachtung

Das Befinden der Tiere wurde während der gesamten 4-wöchigen Versuchsdauer täglich kontrolliert, wobei speziell auf klinische Anzeichen einer Infektion wie Schwellung oder Rötung der Wunde, Schonhaltungen der operierten Gliedmassen, Schmerzáußerungen, verminderte Futteraufnahme, Anstieg der Körpertemperatur oder eventuell plötzlich auftretende Apathie geachtet wurde. Ebenso wurde der Heilungsprozess der Operationswunde bei jedem Tier beobachtet. Die postoperative Beaufsichtigung erfolgte wie auch die Narkose durch eine Tierärztin.

Da postoperativ mit einem geringgradigen Wundschmerz zu rechnen war, erhielten die Tiere das nicht-steroidales Antiphlogistikum Carprofen (0,4 mg/kg/KG, Rimadyl<sup>®</sup>, Pfizer, Karlsruhe) über sieben Tage subcutan zur Analgesie.

Da durch die intramedulläre Implantation der K-Drähte keine Instabilität der betroffenen Extremität auftrat, war eine Vollbelastung des operierten Beines sofort möglich.

Nach zehn Tagen wurde bei den Tieren das einliegende Faden- und Wundklammermaterial entfernt.

### **2.2.8 Euthanasie der Tiere**

Die Euthanasie der Versuchstiere erfolgte nach Ende des Beobachtungszeitraums von vier Wochen. Die Tiere erhielten zunächst erneut Ketamin (60 mg/kg/KG Ketanest<sup>®</sup>, Pfizer, Karlsruhe) und wurden anschließend durch intrakardiale Verabreichung von 4-5 ml Embutramid (T61<sup>®</sup>, Hoechst Veterinär, Unterschleißheim) getötet.

### **2.2.9 Auswertung der Versuche**

Die Auswertung der Versuche erfolgte durch Röntgenanalyse, klinische Inspektion sowie mit Hilfe mikrobiologischer und histologischer Methoden zum Nachweis typischer Zeichen einer Knocheninfektion. Zur klinischen Infektbeurteilung wurden allgemeine Parameter wie Schwellung, Rötung und Eiterbildung herangezogen. Klassische Bakterienkulturtechnik auf Agarplatten aber auch die PCR-basierte Puls-Feld-Gel-Elektrophorese bildeten den Kern der mikrobiologischen Untersuchungen. Histologisch wurde vor allem auf Gewebsreaktionen im Sinne von Osteolysen, Abszessformation und den direkten Nachweis von Bakterien geachtet.

#### **2.2.9.1 Röntgenologische Auswertung**

Von jedem Versuchstier wurden 2 Röntgenaufnahmen im lateralen Strahlengang angefertigt. Das erste Bild diente zur Kontrolle der korrekten Pinplatzierung (s. Abb. 17) und wurde direkt nach Implantation der K-Drähte durchgeführt. Die zweite Aufnahme erfolgte vor Entnahme des Unterschenkels um radiologisch

sichtbare Anzeichen einer Entzündung im Bereich um die Implantate feststellen zu können. Hierbei galten als radiologische Infektzeichen:

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

Zur Diagnosestellung wurde das Auftreten einer dieser Parameter als ausreichend angesehen.

### **2.2.9.2 Entnahme der Tibiae und klinische Auswertung**

Nach Durchführung der erneuten radiologischen Kontrollaufnahme von jedem Tier erfolgte das Töten der Tiere. Die Tibiae der Kaninchen wurden unter streng aseptischen Bedingungen entnommen, mit einer oszillierenden Säge in Längsrichtung gespalten und die K-Drähte entfernt. Während der Explantation wurde besonderes Augenmerk auf klinische Anzeichen einer lokalen Infektion wie Rötung, Schwellung, Sekretion und Eiterbildung im Kniegelenksbereich gerichtet. Die so entstandenen Tibiahälften wurden anschließend mikrobiologischen und histologischen Untersuchungen zugeführt (Abb. 18).

Die explantierten Implantate wurden zunächst durch einen Bolzenschneider in 2 Hälften geteilt und jeweils auf eine BHI-Agarplatte ausgerollt. Für die mikrobiologische Untersuchung des Knochens wurden die medialen Tibiahälften gewogen, mit einem Phosphatpuffer (10 ml PBS-Puffer pro 1 g Knochenmasse) versetzt und anschließend in einem Knochenzermahler nach der Methode von Nijhof et al. (2000) zerkleinert. Es wurde eine Verdünnungsreihe (1:1, 1:10 und 1:100) mit den so erhaltenen Knochensuspensionen hergestellt und jeweils eine Menge von 10 µl der drei verschiedenen Konzentrationen auf BHI-Agarplatten ausgeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C für 24 Stunden.

Als Infektion wurde das Wachstum des *Staphylococcus aureus* auf den inokulierten Nährmedien definiert. Die Menge der gewachsenen Keime in KBE wurden für jede Agarplatte ausgezählt. Dabei bestimmte man die Anzahl der KBE/g Knochen durch Division der Anzahl der KBE durch das initiale Gesamtgewicht der jeweiligen Knochenprobe. Um die genaue Menge in KBE/g

Knochen für jedes Tier festlegen zu können, wurde ein Durchschnittswert aus allen drei Verdünnungen errechnet.

Um den auf den Nährböden gewachsenen Keim exakt zu identifizieren und mit dem inokulierten *Staphylococcus aureus* EDCC 5055-Stamm zu vergleichen sowie eine Kontamination auszuschließen erfolgte eine genetische Identifizierung der gewachsenen Kolonien mittels Pulsfeldgelelektrophorese.

Die lateralen Tibiahälften der Tiere wurden für die histologische Untersuchung abwechselnd in Karnovsky- oder PFA-Lösung (4%ig) für vier Wochen eingelegt. Anschließend wurden sie mittels der Trenn-Dünnschliff-Technik (Donath und Breuner, 1982) als Knochenschliffe weiter verarbeitet und mit zwei unterschiedlichen Färbemethoden angefärbt.



**Abbildung 18:** Durch oszillierende Säge gespaltene Tibia nach Entfernung des K-Drahtes. Eine Hälfte der Tibia wurde für die Histologie, die andere für mikrobiologische Untersuchungen verwendet. Der K-Draht wurde ebenfalls für mikrobiologische Untersuchungen auf Keimnachweis herangezogen.

### 2.2.9.3 Mikrobiologische Untersuchungen

Die mikrobiologische Probenaufbereitung fand im Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen statt.

Die mikrobiologischen Tests wurden durchgeführt, um eine bakterielle Besiedlung des Knochens und des Implantats und somit eine Implantat-assoziierte Knocheninfektion aufdecken zu können. Des Weiteren konnte durch biochemische und mikrobiologische Verfahren eine genaue Ermittlung des Genoms des isolierten Keims und somit dessen genaue Identifikation erfolgen. Auf diesem Wege konnte mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nachgewiesen

werden, dass die beobachteten Infektionen tatsächlich auf den inokulierten *Staphylococcus aureus* EDCC 5055 zurückzuführen waren und im Verlauf eine Kontamination mit einem anderen Keim somit ausgeschlossen werden konnte.

#### 2.2.9.3.1 Agarplatten-Test

Für die Bakterienkultivierung wurden – wie vorher beschrieben – BHI-Platten verwendet. Das Vorliegen einer Infektion wurde durch positives Bakterienwachstum auf den Agarplatten definiert. Es wurden Untersuchungen zum Nachweis von Keimen sowohl auf dem K-Draht als auch im Knochen selbst durchgeführt.

Zunächst wurde der bei der Entfernung des Unterschenkels der K-Draht in steriler Art und Weise aus dem Tibiamarkkanal extrahiert. Dieser wurde dann in einem sog. "Roll-Out" Verfahren auf einer BHI-Platte ausgerollt, um eventuell sich auf der Implantatoberfläche befindliche vitale Keime auf die Agarplatte zu bringen und diese durch die folgende Kultivierung nachzuweisen (Lucke et al., 2003).

Der Nachweis von Bakterien im Knochen erfolgte mit Hilfe eines Gewebezerkleinerers Polytron T 2100 (Kinematica, Littau, Schweiz) in Anlehnung an die Methodik von Nijhof et al. (2000). Zuvor wurde wie oben bereits beschrieben die Tibia longitudinal unter sterilen Kautelen mit einer oszillierenden Säge in zwei Hälften gespalten, wovon eine für den Bakteriennachweis herangezogen wurde. Der mittlere Schaftbereich wurde dann mit Hilfe eines Luers zerkleinert und gewogen. Knochenmaterial von ca. 2 -3 g pro Tier wurde dann in den Gewebezerkleinerer gegeben, um es durch diesen Prozess in sterilem PBS-Puffer zu homogenisieren und ausplattieren zu können (Abb. 19a). Die Zerkleinerung der Knochenstücke in der Maschine erfolgte unter steigender Rotationsgeschwindigkeit über 10 Minuten. Die Lösung wurde anschließend verdünnt (1:2, 1:10, 1:100), wovon jeweils 10 µl auf einer BHI-Platte ausplattiert wurde. Die Platten wurden jeweils bei 37°C über 24 h in einem Kulturschrank kultiviert. Die mikrobiologische Definition eines vorliegenden Infektes war der Nachweis von Keimen auf der Agarplatte (Abb. 19c). Die Anzahl der keimbildenden Einheiten (KBE) wurde pro Agarplatte bestimmt. Diese konnte dann zum Gewicht des Knochens, der für diese Untersuchung zerkleinert wurde, ins Verhältnis gesetzt und daraus die Kenngröße KBE/g Knochen errechnet

werden. Aus den drei unterschiedlichen Verdünnungen einer Knochenprobe wurde schließlich der Durchschnittswert von KBE/g Knochen für jedes Tier mit Bakteriennachweis berechnet.

#### 2.2.9.3.2 Latexagglutinationstest

Zur genauen Identifizierung der gewachsenen Kolonien wurde ein Latexagglutinationstest (Staphaurex Plus<sup>®</sup>, Remel Europe Ltd. Dartford, England) durchgeführt. Dieser Test dient der Differenzierung von Staphylokokken, die zellwandgebundene Koagulase (Clumping-Faktor), Protein A sowie bestimmte Kapselpolysaccharide bilden, und solchen, die diese Eigenschaften nicht aufweisen.

##### *Prinzip:*

Ein klassisches Kriterium zur Identifikation eines *Staphylococcus aureus* ist die Fähigkeit, dass der Organismus Plasma durch die Aktivierung des Clumping-Faktors, auch Staphylokoagulase genannt, „verklumpen“ kann. Diese Erscheinung beruht darauf, dass die extrazelluläre freie Koagulase mit Prothrombin im Plasma interagiert und somit Staphylothrombin produziert. Dieses wiederum wandelt Prothrombin in seine aktive Form um, und es kommt zur Freisetzung von Fibrinopeptiden aus Fibrinogen. Es entsteht auf diesem Wege im Organismus ein Fibrinwall um die Bakterien, die der körpereigenen Immunabwehr den Zugriff auf die Bakterien erschweren soll. Diese Fähigkeit hat sich zur Identifizierung des *Staphylococcus aureus* als sehr hilfreich erwiesen. Das Prinzip des Tests ist somit die Differenzierung mittels Latexkoagulation. Das Latexreagenz, bestehend aus Latexpartikeln, die mit Fibrinogen, IgG und spezifischen monoklonalen Antikörpern beschichtet sind, wird mit Kulturoisolat gemischt. Eine Agglutination weist auf das Vorhandensein eines *Staphylococcus aureus* hin.

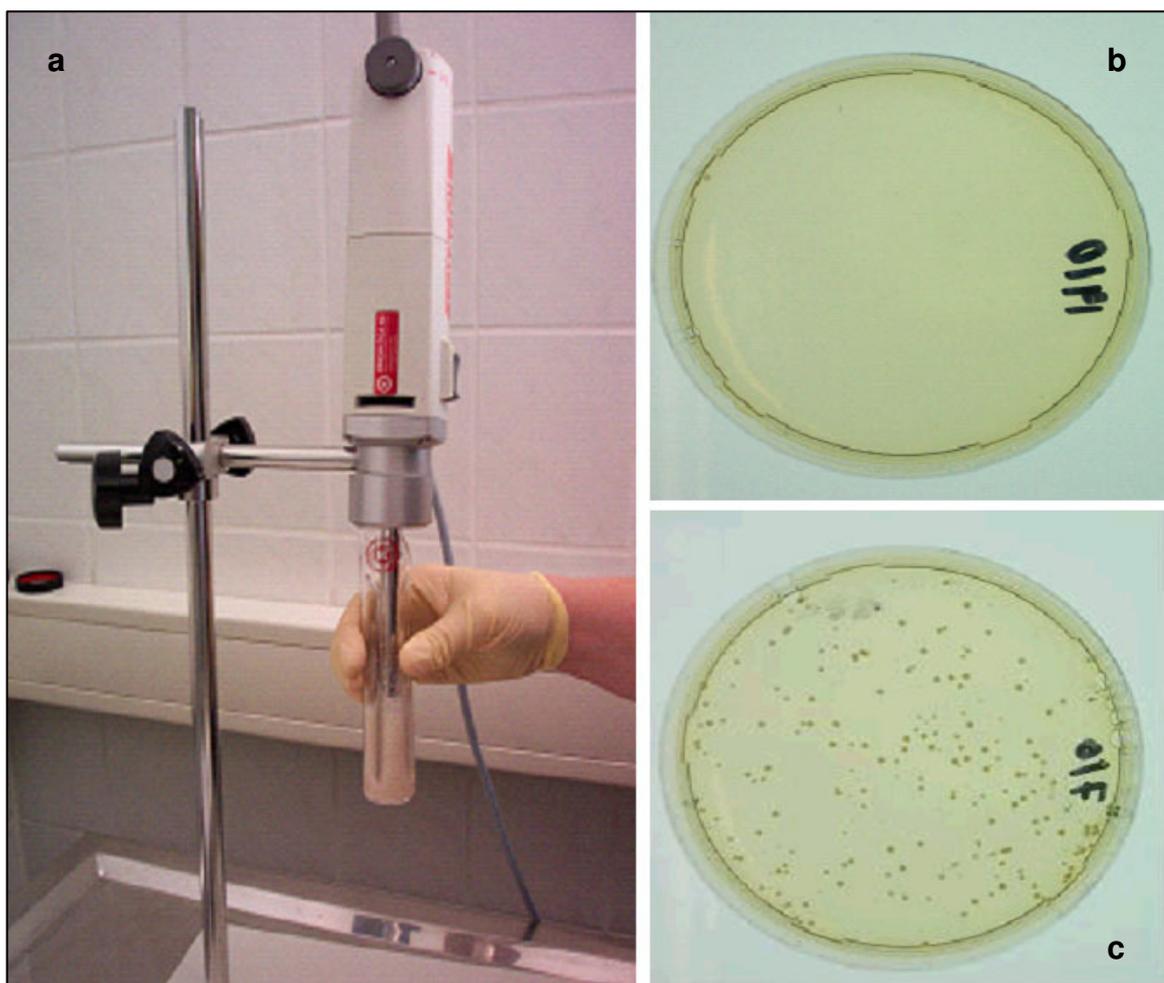
##### *Durchführung:*

Nach ausreichender Homogenisierung der Testreagenzien durch Schütteln wird in einen Kreis der Reaktionskarte ein Tropfen Latexreagenz, in einen weiteren Kreis ein Tropfen Latexkontrollreagenz aufgetragen. Anschließend werden mit einer sterilen Einmalpipette 1-3 Bakterienkolonien vom Nähragar entnommen und in die

jeweiligen Lösungen gerieben. Durch leichtes Rotieren der Reaktionskarte erfolgt die Homogenisierung der Suspensionen.

*Auswertung:*

Bei sofortiger Agglutination im ersten Kreis und nicht agglutinierender Suspension im zweiten Kreis (Negativkontrolle) der Reaktionskarte kann der Test als positiv gewertet werden. Behalten beide Suspensionen ihr milchiges Aussehen, spricht man von einem negativen Ergebnis. Kommt es zur Agglutination der Negativkontrolle, ist der Test nicht auswertbar.



**Abbildung 19:** Technik zum Bakteriennachweis in den Knochenproben. Zermahlen des Knochengewebes im Gewebezerkleinerer Polytron T 2100 (Kinematika, Littau, Schweiz) (a). Die Suspension wurde anschliessend auf BHI-Agarplatten ausplattiert. Fehlendes bakterielles Wachstum wurde als Infektfreiheit (b), der Nachweis von bakteriellem Wachstum (c) als Infektion gewertet.

### 2.2.9.3.3 API®Staph (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Frankreich)

Dieser Test stellt ein standardisiertes System zur Identifizierung von Staphylokokken, Mikrokokken und verwandten Mikroorganismen anhand biochemischer Reaktionen dar.

#### *Prinzip:*

Der API®Staph-Teststreifen, besteht aus 20 Mikroröhrchen, die in ihren jeweiligen Vertiefungen Substrate in dehydriertem Zustand enthalten. Es wird mit Hilfe des API®Staph-Mediums eine Keimsuspension hergestellt, womit der Teststreifen anschließend beimpft wird. Es kommt zum Auflösen der Substrate und nach 18-24stündiger Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer kann die Ablesung erfolgen. Die während der Inkubation entstandenen Stoffwechselprodukte bewirken, direkt oder indirekt nach Zugabe von Reagenz, einen Farbumschlag der in den Röhrchen enthaltenen Substrate. Die Ergebnisse werden mittels einer Ablesetabelle (Tab. 4) ermittelt, und durch einen Analytischen Profil Index oder eine Identifizierungssoftware können die Keime benannt werden.

#### *Durchführung:*

Die zu ermittelnden Bakterien müssen zuerst auf einem geeigneten Nährmedium, in diesem Fall BHI-Agar, angezüchtet werden. Anschließend muss eine homogene Keimsuspension nach McFarland-Standard 0,5 (Trübungsstandard) unter Verwendung des API®Staph-Mediums hergestellt werden. Das beimpfte Medium wird in die Röhrchen pipettiert, wobei die Vertiefungen ADH und URE zusätzlich mit Paraffinöl überschichtet werden müssen um anaerobe Bedingungen für diese Reaktionen zu schaffen. Daraufhin erfolgt die Inkubation für 18-24 Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer (Inkubationswanne mit 5 ml destilliertem Wasser gefüllt) um ein Austrocknen der Mikroröhrchen zu verhindern. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird jeweils ein Tropfen der mitgelieferten Reagenzien in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gefüllt. Nach etwa 10 Minuten kann der Test dann abgelesen werden.

*Auswertung:*

Die Auswertung des Teststreifens erfolgt durch Erstellung eines numerischen Profils. Jeder biochemischen Reaktion wird je nach Ergebnis ein Zahlenwert zugeordnet, und innerhalb der in 3er Gruppen eingeteilten Röhrchen erfolgt die Addition dieser Ziffern. Daraus resultiert ein 7-stelliges numerisches Profil, welches mit Hilfe einer Profilliste oder einer Software identifiziert werden kann.

#### 2.2.9.3.4 16S rDNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung des 16S rDNA-Gens hat sich als ein nützliches Werkzeug bei der Identifizierung von bakteriellen Reinkulturen erwiesen. Sie gehört daher heute zu einem häufig benutzten Verfahren, um z.B. eine exakte Zugehörigkeit von Bakterienstämmen zu ermitteln (Petti et al., 2005).

*Prinzip:*

Bei dieser Methode handelt es sich um ein Verfahren zum Nachweis erregerspezifischer Nukleotidsequenzen. Zunächst erfolgt die Isolierung der DNA durch Lyse der Bakterienzellen unter Verwendung von Enzymen. Im nächsten Schritt wird die DNA des zu identifizierenden Bakteriums mittels einer Pufferlösung extrahiert, und anschließend werden mithilfe einer „broad-range“-PCR große Teilabschnitte des 16S rDNA-Gens amplifiziert. Nach Amplifikation erfolgt die Sequenzierung des PCR-Produktes, wobei Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen, die in der nachfolgend durchgeführten Gelelektrophorese aufgetrennt werden und an einer charakteristischen Position eine Bande bilden. Die so ermittelte Basensequenz wird mittels einer speziellen Software identifiziert und einer Bakterienart zugeordnet (Domann et al., 2003, Sears et al., 1992).

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

**Tabelle 4:** Farbtabelle zur Identifizierung der zu untersuchenden Bakterienkolonie. Aus: Grund-Bakteriologie, bioMérieux Deutschland GmbH, Marcy L'Etoile, Frankreich.

\*Zur Ablesung der Säuretests muss ein Vergleich des Farbumschlages mit der Negativ- sowie Positivkontrolle erfolgen.

*Durchführung:*

Die zu testenden Bakterienkulturen wurden über Nacht in BHI-Medium bei 37°C kultiviert. Es wurde eine 10-minütige Zentrifugation bei 12000 UpM durchgeführt und anschließend Lysepuffer hinzugefügt um die bakterielle DNA zu extrahieren. Die so gewonnene Probe wurde dann als Vorlage für die Amplifikation mittels PCR genommen. Die ribosomale DNA wurde zur initialen Denaturierung bei 95°C für 3 min erhitzt, im Anschluss daran erfolgten 30 Denaturierungszyklen für je 1 min bei ebenfalls 95°C um die Doppelstränge der DNA aufspalten zu können. Nach Zugabe von Primern, die synthetisch hergestellte Oligonukleotide (17-25 Basen) darstellen, die sich an eine bestimmte Stelle der DNA anlagern und Desoxy(ribo)nukleosid-Triphosphaten (*dNTPs*), die als Bausteine für die Herstellung eines neuen DNA-Stranges durch die PCR dienen, wurde das Gemisch zunächst auf ca. 50-55°C abgekühlt. Nun erfolgte die Zugabe einer thermostabilen DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) um die DNA-Synthese starten zu können. Das Gemisch wurde für 1 min auf 72°C erwärmt um das Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase für die Reaktion zu erhalten. Durch diesen Schritt wurden die DNA-Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen vervollständigt. Darauf folgte eine weitere Inkubation bei 72°C für 5 min. Die Temperaturerzeugung erfolgte mit Hilfe eines *Thermocyclers*. Anschließend wurden Restriktionsendonukleasen hinzugegeben und das Gemisch für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Als letzter Schritt wurde eine Auftrennung der vervielfältigten DNA-Sequenzen in der Gelelektrophorese angeschlossen. Um eine Größenbestimmung der PCR-Produkte ermöglichen zu können wurden in der ersten und in der letzten Spur des Gels spezielle Marker aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese erfolgten die Anfärbung des Gels mit Ethidiumbromid-Lösung für 5 min und die Sichtbarmachung der Fragmente unter UV-Licht sowie die Erstellung von Photographien zur Dokumentation (Misbah et al., 2005, Rodrigues da Silva et al., 2005, Krimmer et al., 1999).

#### 2.2.9.3.5 *femB*-und *coa*-Gen-Nachweis mittels PCR

Zur weiteren Sicherung der Identifizierung des *Staphylococcus aureus*-Stamms wurden zusätzlich folgende keimtypische Sequenzen der DNA dargestellt: das *femB*-und das *coa*-Gen.

Das *femB*-Gen codiert die Bildung eines Proteins, welches am Aufbau der DNA-Helix beteiligt ist. Das *coa*-Gen enthält die Information zur Bildung des Koagulase Proteins, welches einen wichtigen Virulenzfaktor von *Staphylococcus aureus* darstellt.

##### *Prinzip & Durchführung:*

Das Prinzip der Methode und die Durchführung wurden zuvor schon bei der 16S rDNA-Sequenzierung erläutert. Für die Erkennung der Nukleotidsequenzen des *femB*-und *coa*-Gens wurden jeweils spezifische Primer eingesetzt. Dann erfolgte die Amplifikation der gesuchten Sequenzen wie oben beschrieben. Als letzte Schritte wurden Gelelektrophorese und Färbung des Gels angeschlossen.

#### 2.2.9.3.6 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE ist ein molekulares Typisierungsverfahren zur Identifizierung von Bakterienstämmen durch Aufspaltung einzelner Moleküle. Diese besondere Art der Gelelektrophorese kann im Gegensatz zur konventionellen Methode, die eine Darstellung von Molekülen mit einer Größe von bis zu 30 kb ermöglichen kann, DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 1000 kb analysieren.

##### *Prinzip:*

Wie bei der konventionellen Gelelektrophorese werden bei der PFGE chromosomale DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Während jedoch bei den ursprünglichen Methoden ein unidirektionales Spannungsfeld benutzt wird, kommt es bei der PFGE durch Anwendung eines multidirektionalen elektrischen Spannungsfeldes mit häufigen Richtungswechseln auch zur Aufspaltung von großen Molekülen. Um die bakterielle DNA vor Scherkräften und damit unspezifischer Restriktion zu bewahren müssen die Bakterien zunächst in Agarose eingebettet werden. Anschließend wird die

Zellwand enzymatisch (Lysozym/Lysostaphin) lysiert. Die freigelegte DNA wird durch Zugabe einer Endonuclease (*Sma*I) restringiert, so dass ungefähr 15-20 relativ große Fragmente entstehen, die nun mit Hilfe der PFGE aufgetrennt werden können. Die *Sma*I-Restriktionsendonuclease ist in der Lage folgende DNA-Sequenz zu erkennen: CCCGGG. Das in verschiedene Richtungen wechselnde Spannungsfeld erlaubt nun kleineren Molekülen schneller durch die Gelmatrix zu wandern als größeren Fragmenten. Es kommt also zu einer schnelleren Orientierung der kleineren Fragmente und infolge dessen zu einer effizienten Auftrennung der Bakterien-DNA. Als Ergebnis erhält man ein DNA-Bandenmuster, welches durch die Restriktionsfragmente des Bakteriengenoms gebildet wird und für den jeweiligen Stamm typisch ist. Letztendlich werden diese Banden durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht, und der Keim kann anhand dieses „DNA-Fingerprints“ identifiziert werden.

*Durchführung:*

Probenvorbereitung:

Einige Kolonien der zu untersuchenden Bakterienkulturen wurden in 10 ml BHI-Medium eingerieben und bei 37°C für 24 Stunden bebrütet. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde eine 1:10 Verdünnung der Bakteriensuspension hergestellt und eine Optische Dichtemessung bei einer Wellenlänge von 600 nm am Spektralphotometer durchgeführt um eine Bakteriendichtebestimmung zu erhalten. Die Durchführung dieses Verfahrens ist notwendig, um einer Überladung mit DNA vorbeugen zu können (OD = 1,0-1,5). Anschließend wurde 1 ml der verdünnten Bakteriensuspension bei 5400 UpM für 10 Minuten abzentrifugiert, das entstehende Pellet in 1 ml TEN-Puffer resuspendiert und bei 15000 UpM erneut 4 Minuten abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, bevor das Pellet in 500 µl EC-Puffer gebracht wurde. Die jeweilige Tube konnte dann nach Abkleben der Blöckchengussform in den Heizblock gestellt und mittels einer Pipette mit 500 µl Agarose gemischt werden. Sofort danach wurden je 100 µl des Bakterien-Agarose-Gemischs in die dafür vorbereiteten Formen gefüllt und die Blöckchen zum Erkalten 15 Minuten auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zellyse. Dazu wurden die Blöckchen mit je 1 ml Lysepuffer, bestehend aus Lysepuffer (844,4 µl), Lysostaphin (55,6 µl) und Lysozym (100 µl), überschichtet und bei 37°C für 17-24 Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss

daran wurde der Lysepuffer mit einer sterilen Pipette abgesaugt und die Blöckchen zweimal für mindestens 1 Stunde in 2-4 ml Deproteinisierungspuffer, bestehend aus Deproteinisierungspuffer (800 µl), Proteinase K (100 µl) und Sarkosyl (100 µl), äquilibriert. Der Überstand wurde anschließend wieder abgezogen. Zur vollständigen Deproteinisierung wurden die Blöckchen im Wasserbad bei 55°C 18 Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte eine mindestens dreimalige Waschung für 30-120 min bei Raumtemperatur in 14-20 ml TE-Puffer. Für den Äquilibrierungsvorgang wurden die Blöckchen für mindestens 30 Minuten einzeln in 1 ml Restriktionspuffer ohne Enzym gestellt. Als nächste Schritte erfolgten das Absaugen des Puffers und das Ersetzen durch 150 µl frischen Restriktionspuffers, dem anschließend 40 U des Enzyms zugegeben wurden, und der Ansatz konnte nun bei 25°C für 18-22 Stunden im Wasserbad inkubiert werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 50 µl Stopppuffer abgebrochen.

#### Gelelektrophorese:

Die Gelkammer wurde aufgebaut und mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden Geltaschen mit 1%igem Agarosegel gegossen. Nach Erstarren des Gels wurden die Blöckchen und der PFGE-Marker in die Taschen eingefügt und mit einer Agaroseschicht überzogen. Dann erfolgte das Einlegen des vorbereiteten Gels in die Gelkammer und das Anlegen des Stroms (6 V, 5-50 s Pulszeit, 26 h Laufzeit). Nach Ende des Gellaufs wurde die Färbung in einem Ethidiumbromidbad (Konz.: 2,5 mg/l 0,5x TBE) für 30 Minuten angeschlossen. Als nächster Schritt musste das Gel 30 Minuten in 1 l 0,5x TBE entfärbt und im Anschluss daran unter UV-Licht fotografiert werden. Die Gelelektrophorese fand im CHEF-DR II Pulsed Field Electrophoresis System (BioRad, München) statt.

#### *Auswertung:*

Das entstehende DNA-Bandenmuster ist für die jeweiligen Stämme charakteristisch, so dass nach Vergleich mit dem Referenzstamm der Keim mit Hilfe einer Software eindeutig identifiziert werden kann. Die Ergebnisse werden in 4 Klassen eingeteilt: Klasse I bei identischen Bandenmustern der Proben (= identische Stämme), Klasse II, wenn sich 1-3 Bandenmuster unterscheiden (= eng verwandte Stämme), bei Differieren von 4-5 Banden spricht man von Klasse III (=

vielleicht verwandte Stämme) und Klasse IV (=verschiedene Stämme) bei einer Differenz von mehr als 6 Banden (Becker, 2004, van Belkum et al., 1998, Claus et al., 1996, Prevost et al., 1992, Römling et al., 1995, Schmitz et al., 1995, Schwarzkopf et al., 1995, Tenover et al., 1994, Witte et al., 1994).

#### **2.2.9.4 Histologische Auswertung**

Die Aufbereitung der für die Histologie entnommenen Proben sowie die Herstellung und Auswertung der Dünnschliffe erfolgten im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität in Gießen.

Die histologische Beurteilung des Probenmaterials wurde durchgeführt, um eventuelle Gewebeveränderungen und zelluläre Reaktionen im Falle einer bakteriellen Infektion morphologisch darzustellen.

Nach Entnahme der Unterschenkel der Versuchstiere und Einbringen der lateralen Tibiahälften in wechselweise Karnowsky und 4%ige PFA-Lösung wurden diese Proben für 4 Wochen zum Fixieren im jeweiligen Medium belassen.

Anschließend erfolgte die Weiterverarbeitung der Proben mittels der Dünnschliff-Technik (Donath und Breuner, 1982). Diese Methode wird zur Herstellung histologischer Präparate aus nicht schneidbaren Geweben wie zahntragenden Kieferabschnitten mit Füllungen, Kronen und Brücken, dicken Kortikalis, hypermineralisierten Knochenanteilen oder implantattragenden Kiefer- und Röhrenknochen verwendet.

##### **2.2.9.4.1 Trenn-Dünnschliff-Technik**

###### *Vorbehandlung des Gewebematerials:*

Nach ausreichender Fixation des Gewebes erfolgte die Entwässerung der unentkalkten Proben in aufsteigender Alkoholreihe. Dabei sind die Entwässerungszeiten von der Dicke der Gewebescheiben abhängig. Für diesen Versuch wurden die Proben für jeweils 48 Stunden in Technovit® / reinem Ethanol in den Mischverhältnissen 30/70%, 50/50%, 70/30%, 100/0% gestellt. Dieser Vorgang fand mit Hilfe des Entwässerungssystems 510 (Entwässerungs- und Infiltrationsautomat, EXAKT Apparatebau, Norderstedt) statt. Anschließend

erfolgte für neun Tage die Kunststoffinfiltration mit Technovit 7200 VLC<sup>®</sup>, einem lichthärtenden Einkomponentenkunststoff auf Methacrylatbasis, mit 1%igem Dibenzoylperoxid (EXAKT-BPO-Penetrationsbeschleuniger, Heraeus-Kulzer, Wehrheim). Die Kunststoff-infiltrierte Gewebescheiben wurden dann in Einbettmulden gegeben. Zur Vermeidung der Abhebung von der Bodenplatte wurden die Präparate mit dem Fixationskleber Technovit 7230 VLC<sup>®</sup> (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) am Boden der Mulden fixiert und mit Technovit 7200 VLC<sup>®</sup> mit 1% BPO überschichtet. Nach Aufbringen dieses Einbett-Kunststoffes erfolgte die Polymerisation bei Lampenlicht (Wellenbereich 400-500 nm). Der Polymerisationsvorgang gliedert sich in zwei Schritte. Zunächst wurde eine Vorpolymerisation durch Gelblichtbestrahlung zur Vermeidung von Spannungsrissen für zwei Stunden im Lichtpolymerisationsgerät Histolux (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) durchgeführt, danach schloss sich die endgültige Polymerisation durch Blaulichtbestrahlung für vier Stunden in selbigem Gerät an. Anschließend erfolgte die Aushärtung der Probenblöcke für 16 Stunden bei einer Polymerisationstemperatur von 40 °C im Wärmeschrank.

#### *Schliff-Herstellung:*

Die Gewebeblöcke wurden nun aus der Einbettform entfernt und so angeschliffen, dass die histologisch zu untersuchende Fläche an die Oberfläche der Kunststoffblöcke trat. Zum Erreichen einer planen Fläche wurden die Blöcke mit dem Technovit 4000<sup>®</sup> mit Hilfe einer Vakuum-Klebpresse (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) auf Plexiglas-Objektträger aufgebracht. Dann wurden die Oberflächen der Blöcke mit dem EXAKT-Mikroschleifsystem bearbeitet. Der Schleifvorgang galt als beendet, wenn alle zu untersuchenden Gewebeabschnitte unter gleichzeitigem Vorliegen einer Planparallelität angeschliffen und an der Oberfläche sichtbar waren. Anschließend erfolgt das Aufkleben eines Glasobjektträgers auf die angeschliffene Präparatoberfläche mit Technovit 7210 VLC<sup>®</sup> Präzisionskleber (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) mit der Vakuum-Klebeeinrichtung (EXAKT Apparatebau, Norderstedt). Zuvor wurden die Oberflächen von Block und Objektträger mit einem organischen Lösungsmittel (Aceton, Alkohol oder Petrolbenzin) gereinigt. Bei gleichmäßiger Verteilung des Präzisionsklebers im Klebespalt und somit gutem Klebeergebnis wurde ein Photopolymerisationsvorgang für ca. 10 min. durchgeführt. Im nächsten Schritt

wurden die Präparat-Objektträger-Sandwiches in das Trennschleifsystem (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) eingespannt und ca. 100 µm dicke Scheiben mit einem wassergekühlten, diamantbeschichteten Trennband hergestellt, die jeweils den Glasobjektträgern anhafteten. Danach kam es zur Abschleifung und Polierung der Präparatscheiben mit dem EXAKT-Mikroschleifsystem (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) bis zur gewünschten Zieldicke von 5 µm.

#### 2.2.9.4.2 Färbung der Dünnschliffe

Pro Versuchstier wurden zwei Schnitte angefertigt und jeweils mit Toluidinblau sowie Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Zuvor erfolgte ein Anätzen der Schliffoberflächen mit 10%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 10 min und anschließendem Ausspülen der Objektträger in aqua dest., da sich durch diese Voroxidation Plexiglasschnitte mit konventionellen Färbemethoden mit ähnlich gutem Ergebnis wie Paraffinschnitte färben lassen.

##### *Toluidinblau-Färbung:*

Die Toluidinblau-Färbung wurde in der histologischen Routinediagnostik eingeführt, da sie sehr schnell durchzuführen ist, und die Metachromasie eine Aussage über die Knochenan- und -umbauprozesse erlaubt. Metachromasie bedeutet, dass sich eine Struktur aufgrund ihres Bauprinzips in einer von dem angewandten Farbton abweichenden Nuance anfärbt.

##### *Färbeprinzip:*

Toluidinblau ist ein basischer Teerfarbstoff und gehört somit zur Gruppe der Thiazinfarbstoffe. Es kommt in saurem Milieu (pH 4) zu einer elektropolaren Anlagerung des basischen Farbstoffes an die sauren Gruppen der Nukleinsäuren. Da der Farbstoff gut alkohollöslich ist, erfolgt die Differenzierung in Aceton-Alkohol (Burck, 1988).

##### *Durchführung:*

1. 15 min Färben mit Toluidinblau
2. Abspülen in Leitungswasser
3. Trocknen des Schliffs
4. Eindecken

*Färbeergebnis:*

Die mineralisierte Hartgewebematrix stellt sich ungefärbt bis blassblau, Zellen und Weichgewebe blau, Knorpelmatrix metachromatisch bis rotviolett und die verkalkte Knochenmatrix dunkelblau dar.

*Hämatoxylin-Eosin-Färbung:*

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung gehört zur Gruppe der Übersichtsfärbungen und findet aufgrund ihrer einfachen und schnellen Durchführung häufig Anwendung im Routinebetrieb.

*Färbeprinzip:*

Hämatoxylin ist einer der am häufigsten benutzten Kernfarbstoffe. Die Substanz muss erst durch Oxidation in den richtigen Farbstoff Hämatein überführt werden. Der Farbstoff ist positiv geladen und gehört zur Gruppe der sauren Farbstoffe. Diese lagern sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA des Zellkerns (Chromatins). Die Färbung wird am besten in stark saurem Milieu (pH 3) durchgeführt. Eosin ist ein schwach saurer Farbstoff und gehört zur Fluorescein-Gruppe. Er ist sehr gut wasserlöslich und wird deshalb gewöhnlich in 1%iger wässriger Lösung mit einem Tropfen Eisessig auf 100 ml Farblösung benutzt. Er färbt Cytoplasma, Kollagenfasern und Bindegewebe kräftig rot (Burck, 1988).

*Durchführung:*

1. Färben in Hämalan nach MAYER für 5-10 min
2. in Eisessigwasser ( 1 ml auf 100 ml a.d. ) Schwenken für 1 min
3. in Leitungswasser Bläuen für 10 min
4. 1 min Färben in Eosin
5. Abspülen in a.d.
6. Trocknen
7. Eindecken des Schiffs

*Färbeergebnis:*

Die Zellkerne, Kalk, grampositive Bakterien und die Knorpelgrundsubstanz stellen sich blau, Cytoplasma, Kollagenfasern, Bindegewebe und Erythrozyten rot dar.

#### 2.2.9.4.3 Histologische Kriterien zur Infektionbeurteilung

Als typische histologische Entzündungszeichen im Sinne einer bakteriell bedingten Implantat-assoziierten Infektion wurden folgende Parameter gewertet (Adler, 1983, Strauß, 1999):

1. Abszessformation mit Ödembildung im Markraum oder kortikalen Knochenanteilen
2. Infiltrate von Entzündungszellen: neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und mehrkernige Riesenzellen
3. Nachweis von Bakterien
4. Aufhebung der lamellären Knochengewebsschichtung mit subperiostaler Knochenneubildung und Periostabhebung
5. Nekrosenbildung mit leeren Osteozytenlakunen
6. Bildung von Sequestern im kortikalen Knochen oder im Markraum

#### **2.2.9.5 Statistik**

Sämtliche Daten wurden mit EXCEL erfasst und mit „SPSS for Windows“ (Version 12.0; SPSS Inc., Chicago, USA) statistisch ausgewertet. Die Datenanalysen haben durchweg explorativen Charakter, die errechneten Irrtumswahrscheinlichkeiten zu den einzelnen getesteten Hypothesen erscheinen im Ergebnisteil.

Grundlage der Stichprobenberechnung war eine klinisch relevante Reduktion der Infektionsrate um 50%, ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  sowie eine Power von 0,8. Mit Hilfe des Chiquadrat-Tests für Kreuztabellen wurde dann der Therapieeffekt beurteilt.

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Pilotstudie**

Zur Etablierung des Tiermodells und Festlegung einer geeigneten Inokulationsdosis des *Staphylococcus aureus* Stammes EDCC 5055 für die Hauptstudie wurde eine Pilotstudie an 12 Tieren mit den Keimdosen  $10^4$ ,  $10^6$  und  $10^8$  KBE durchgeführt. Dabei wurden HA-beschichtete K-Drähte als Negativkontrolle und Gentamicin-HA-beschichtete Implantate zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit verwendet. Der Beobachtungszeitraum der Tiere lag bei vier Wochen.

##### **3.1.1 Klinische Ergebnisse der Pilotstudie**

Über den Beobachtungszeitraum von vier Wochen wurden regelmäßig Wundkontrollen und Gewichtsmessungen vorgenommen. Nach der Tötung der Tiere wurde bei der operierten Extremität zunächst auf äußere Anhaltspunkte einer Infektion geachtet. Als klinische Infektzeichen galten hierbei Rötung, Schwellung, Überwärmung, eine prolongierte Wundsekretion oder nekrotische Gewebsveränderungen. Anschließend erfolgte die Abtrennung der Tibia von Knie- und Sprunggelenk und die erneute Observation. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf das umliegende Weichteilgewebe gelegt, die angrenzenden Gelenke auf Gewebeveränderungen, Ergüsse und Abszessbildungen hin untersucht. Nach Spaltung der Tibia mittels einer oszillierenden Säge für die anschließenden Untersuchungen erfolgte die genaue Inspektion der Knochenstruktur und des Knochenmarks, ebenfalls hinsichtlich makroskopischer Infektzeichen wie Osteolysen oder Eiteransammlungen. Die klinische Auswertung der Ergebnisse der Pilotstudie zeigt Tabelle 5,6 und 7.

Tier	Implantat	Keimdosis	makroskopische Infektzeichen	Gewichtsentwicklung
BC-AMP 5	HA	10 <sup>4</sup>	entzündliches Gewebe von proximal bis distal der Markhöhle	Zunahme
BC-AMP 9	HA	10 <sup>4</sup>	sulziges Gewebe von proximal bis distal der Markhöhle	Zunahme
BC-AMP 2	HA	10 <sup>6</sup>	Eiter proximal bis distal der Markhöhle; Osteolysen	Abnahme
BC-AMP 7	HA	10 <sup>6</sup>	Eiterstrasse in der Markhöhle proximal bis distal; Osteolysen	Abnahme
BC-AMP 3	HA	10 <sup>8</sup>	Eiter und sulziges Gewebe proximal bis distal der Markhöhle	Abnahme
BC-AMP 4	HA	10 <sup>8</sup>	Ø*	Ø
BC-AMP 1	Genta+HA	10 <sup>4</sup>	Ø	Zunahme
BC-AMP 10	Genta+HA	10 <sup>4</sup>	Ø	Zunahme
BC-AMP 6	Genta+HA	10 <sup>6</sup>	Ø*	Ø
BC-AMP 11	Genta+HA	10 <sup>6</sup>	sulziges Gewebe proximal und Eiter distal	Zunahme
BC-AMP 8	Genta+HA	10 <sup>8</sup>	minimale Eiteransammlung im distalen Schaftbereich	Zunahme
BC-AMP 12	Genta+HA	10 <sup>8</sup>	sulziges Gewebe im distalen Schaftbereich	Zunahme

**Tabelle 5:** Klinische/makroskopische Entzündungszeichen und Gewichtsentwicklung der einzelnen Tiere in der Pilotstudie.

\* Tier vorzeitig vor Versuchsende verstorben

<i>Makroskopische Infektzeichen</i>	<b>EDCC 5055 10<sup>4</sup> KBE</b>	<b>EDCC 5055 10<sup>6</sup> KBE</b>	<b>EDCC 5055 10<sup>8</sup> KBE</b>
<b>HA-beschichteter K-Draht (Kontrollgruppe)</b>	1/2	2/2	1/1*
<b>Gentamicin-HA-beschichteter K-Draht</b>	0/2	0/1*	0/2

**Tabelle 6:** Klinische Ergebnisse der Pilotstudie.

\* Tier vorzeitig vor Versuchsende verstorben

<i>Gewichtsabnahme</i>	<b>EDCC 5055 10<sup>4</sup> KBE</b>	<b>EDCC 5055 10<sup>6</sup> KBE</b>	<b>EDCC 5055 10<sup>8</sup> KBE</b>
<b>HA-beschichteter K-Draht (Kontrollgruppe)</b>	0/2	2/2	1/1*
<b>Gentamicin-HA-beschichteter K-Draht</b>	0/2	0/1*	0/2

**Tabelle 7:** Gewichtsabnahme als indirektes Infektzeichen bei den Tieren in der Pilotstudie.

\*Tier vorzeitig vor Versuchsende verstorben

Bei den 6 Tieren, bei denen Gentamicin-freie K-Drähte implantiert wurden, konnten mit einer Ausnahme nach der Euthanasie und anschließenden Präparation des betroffenen Beines makroskopische Infektzeichen in Form von putriden, pastösen Sekretion in der Markhöhle (Abb. 20) sowie Gewebsoftlockerung und -ödeme und bei 2 Tieren makroskopisch sichtbare Osteolysen nachgewiesen werden. Ein Tier mit der inokulierten Höchstkonzentration von 10<sup>8</sup> Keimen verstarb noch vor Implantatentnahme mit eindeutigen Zeichen einer lokalen und systemischen Infektion.

Abschließend konnte also bei 50 % der Tiere mit der inokulierten Keimdosis von  $10^4$  KBE, und bei 100 % der Tiere mit der Inokulationsdosis von  $10^6$  KBE und  $10^8$  KBE klinische Zeichen der Infektion beobachtet werden. Bei einem Tier mit der erhaltenen Keimhöchstosis von  $10^8$  KBE wurde eine septische Bakteriämie diagnostiziert. Somit konnte eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung in Bezug auf die Höhe der inokulierten Keimdosis und der Entwicklung von Infektzeichen gezeigt werden.

Dieser Zusammenhang konnte auch bei der Körpergewichtsentwicklung beobachtet werden. Bei den Tieren mit einer geringen inokulierten Keimdosis trat eine Gewichtszunahme, bei den Tieren mit einer Dosis ab  $10^6$  KBE eine Gewichtsabnahme auf.

Zusätzlich zeigten die Tiere mit einer Inokulationsdosis ab  $10^6$  KBE schon während des Beobachtungszeitraums eine verringerte Futteraufnahme, erhöhte Temperatur und Schonhaltung der betroffenen Extremität.



**Abbildung 20:** klinische Infektzeichen eines Tieres aus der HA-Gruppe (links) mit deutlicher intramedullärer Eiteransammlung (Pfeile) verglichen mit einer sich physiologisch darstellenden Markhöhle eines HA-Gentamicin-Versuchstieres (rechts)

In der Versuchsgruppe, die Gentamicin-beschichtete K-Drähte erhielt, zeigten sich bei keinem Tier direkte makroskopische entzündliche Veränderungen. Bei den Tieren mit der inokulierten Keimmenge von  $10^8$  KBE sowie einem Tier mit injizierten  $10^6$  KBE kam es zu minimalen Veränderungen in Form von sulzigen Auftreibungen oder pastöser Sekretion im unteren Schaftbereich. Ein Tier verstarb frühzeitig an einer Durchfallerkrankung, die nicht in Zusammenhang mit der Operation oder Keiminokulation stand. Bei keinem dieser Tiere kam es zu einer Gewichtsabnahme während des 4-wöchigen Beobachtungszeitraumes.

### 3.1.2 Mikrobiologische Ergebnisse der Pilotstudie

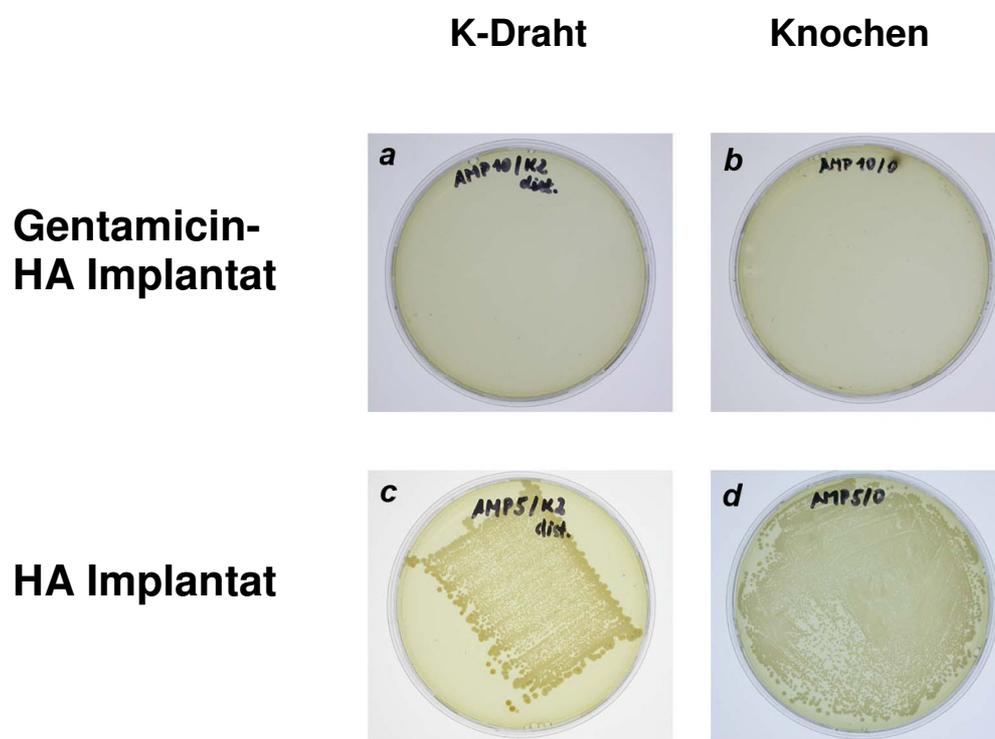
Zur mikrobiologischen Untersuchung wurde eine Tibiahälfte sowie der explantierte K-Draht der Tiere verwendet und aufbereitet. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte bei keinem Versuchstier der Gentamicin-HA-Gruppe ein Keimwachstum auf den Agarplatten nachgewiesen werden. Die Agarplatten blieben ausnahmslos steril.

Dahingegen konnte bei 5 von 6 Tieren aus der Kontrollgruppe ein positiver Keimnachweis erfolgen (Tab. 8). Lediglich bei einem Versuchstier mit der inokulierten Keimdosis von  $10^4$  KBE wurde kein Wachstum auf der entsprechenden Agarplatte beobachtet. Zum Ausschluss einer Kontamination der Platten erfolgte die weitere Differenzierung der gewachsenen Kolonien mittels Latex-Agglutinationstest, API<sup>®</sup>Staph, 16SrDNA-Sequenzierung, *femB*- und *coa*-Gen-Nachweis, PCR und Pulsfeldgelelektrophorese. In allen Fällen konnte der Nachweis des inokulierten EDCC 5055 *Staphylococcus aureus* erbracht werden.

<i>Keimnachweis im Knochen</i>	<b>EDCC 5055 <math>10^4</math> KBE</b>	<b>EDCC 5055 <math>10^6</math> KBE</b>	<b>EDCC 5055 <math>10^8</math> KBE</b>
<b>HA-beschichteter K-Draht</b>	1/2	2/2	1/1*
<b>Gentamicin-HA-beschichteter K-Draht</b>	0/2	0/1*	0/2

**Tabelle 8:** Keimnachweis im Knochen für Gentamicin-HA und reine HA-Beschichtung in Abhängigkeit der Inokulationsdosis. \* Tier vorzeitig vor Versuchsende verstorben

Zusätzlich zum Keimnachweis im Knochen erfolgte eine Aufbereitung bzw. mikrobiologischer Nachweis vitaler Bakterien auf der Implantatoberfläche. Dazu wurden die explantierten K-Drähte auf jeweils einer Agarplatte ausgerollt und diese anschließend bei 37°C genau wie die Nährböden für den Nachweis des bakteriellen Knochenbefalls bebrütet. Die sich ergebenden Keimnachweise korrelierten mit denen der Knochenprobenauswertung (Abb. 21, Tab. 9). Die gewachsenen Kulturen wurden wiederum mittels vorher beschriebenen diversen mikrobiologischen Verfahren eindeutig als der inokulierte *Staphylococcus aureus*-Stamm identifiziert. Eine Kontamination der Kulturplatten konnte somit ausgeschlossen werden. Für alle Tiere der Gentamicin-HA-Beschichtung waren weder Keime auf der Implantatoberfläche noch in der Tibia selbst nachzuweisen. Somit zeigte sich eine sehr gute Korrelation der Keimbestimmung im Knochen und auf dem K-Draht selbst. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass bei diesem Tiermodell im Falle einer etablierten Infektion es sowohl zu einer bakteriellen Infiltration des Knochens als auch zur Besiedelung des einliegenden K-Drahtes kommt.



**Abbildung 21:** Vergleich der Agarplattenbesiedelung zwischen Gentamicin-HA- und reiner HA-Beschichtung zum Keimnachweis. Bei positivem Keimnachweis zeigte sich in allen Fällen Bakterien sowohl im Knochen als auch auf dem K-Draht.

<i>Keimnachweis auf K-Draht</i>	<b>EDCC 5055 10<sup>4</sup> KBE</b>	<b>EDCC 5055 10<sup>6</sup> KBE</b>	<b>EDCC 5055 10<sup>8</sup> KBE</b>
<b>HA-beschichteter K-Draht</b>	1/2	2/2	1/1*
<b>Gentamicin-HA- beschichteter K- Draht</b>	0/2	0/1*	0/2

**Table 9:** Keimnachweis auf explantierten K-Drähten für Gentamicin-HA- und reine HA-Beschichtung in Abhängigkeit der Inokulationsdosis. \* Tier vorzeitig vor Versuchsende verstorben

### 3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Pilotstudie

Die Durchführung der Pilotstudie konnte die Eignung des gewählten experimentellen Infektionsmodells bestätigen. Es kam zu einer sehr guten Korrelation sowohl der klinischen zu den mikrobiologischen Ergebnissen als auch innerhalb der mikrobiologischen Nachweise zwischen K-Draht und Knochenproben.

Es wurde beobachtet, dass es bei 7 von 8 Tieren, denen ein reiner HA-beschichteter K-Draht implantiert wurde, zu einer Infektion kam. Dabei ließ sich eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung aufzeigen. Bei Inokulation der geringsten Keimdosis von 10<sup>4</sup> KBE kam es bei lediglich einem der zwei Versuchstiere zum Ausbruch einer Infektion, wohin gegen sich bei allen Tieren mit der Inokulationsdosis von 10<sup>6</sup> und 10<sup>8</sup> KBE eine Infektion etablierte. Bei einem Tier mit der inokulierten Keimdosis von 10<sup>8</sup> KBE kam es sogar zur systemischen Bakteriämie. In der Gruppe der Tiere, die Gentamicin-HA-beschichtete Implantate erhielten, traten keine Infektzeichen auf. Dort blieben alle Nährböden zum mikrobiologischen Keimnachweis im Knochen und auf der Implantatoberfläche steril.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Hauptstudie eine Inokulationsdosis von 10<sup>7</sup> KBE gewählt.

### 3.2 Hauptstudie

In der Hauptstudie kamen zusätzlich zu den HA- und Gentamicin-HA-beschichteten Implantaten auch noch Gentamicin-RGD-HA-Kombinationsbeschichtungen zur Testung zum Einsatz. Auch diese Beschichtungskombination sollte auf ihre mikrobiologische Potenz hin untersucht werden. Somit ergaben sich in der Hauptstudie drei Gruppen zur Testung der antimikrobiellen Wirksamkeit: HA-Beschichtung (Negativkontrollgruppe), Gentamicin-HA- und Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung. Pro Gruppe wurden je 10 Tiere getestet.

#### 3.2.1 Klinische Ergebnisse der Hauptstudie

In der Hauptstudie verstarben drei Tiere an akuter Diarrhoe, welches weder als Auswirkung der Operation noch als Folge der Inokulation der Bakterien gewertet werden kann.

Die Ergebnisse der klinischen Inspektion der einzelnen Versuchstiere können Tabelle 10 entnommen werden. 2 Tiere in der Negativkontrollgruppe und ein Tier in der Gentamicin-RGD-HA-Gruppe verstarben vorzeitig an einer akuten Diarrhoe, die nicht mit der Bakterieninokulation in Verbindung stand.

7 von 8 verbliebenen Tieren aus der Antibiotikum-freien Implantat-Gruppe zeigten massive klinische Zeichen einer Infektion (Tab. 11).

Die Tiere mit Antibiotikum-beschichteten K-Drähten zeigten keinerlei Anzeichen für das Vorliegen eines entzündlichen Prozesses im Kniegelenk. Lediglich bei einem Tier mit Gentamicin-RGD-beschichtetem Pin konnte eine Flüssigkeitsansammlung im Schaffbereich ohne Eiternachweis und ohne Verbindung zum Gelenk nachgewiesen werden.

Bezüglich der Gewichtsentwicklung der Tiere konnten in der Kontrollgruppe nur 8 von 10 Tieren ausgewertet werden, da es bei zweien, wie zuvor erwähnt, zum frühzeitigen Versterben durch eine Durchfallerkrankung kam (Tab. 10, Tab. 12). Bei den für die Auswertung verbliebenen 8 Tieren zeigten 6 eine Gewichtsreduktion sowie Auftreten von klinischen Infektzeichen. Bei einem Tier zeigte sich eine Gewichtszunahme trotz Vorliegen makroskopischer Entzündungszeichen, ein Tier zeigte keinerlei Anzeichen einer Infektion und

ebenfalls eine Gewichtszunahme, so dass hierbei von einer Infektfreiheit ausgegangen werden kann.

Bei allen Versuchstieren der Gentamicin-HA-Gruppe kam es zu einer Gewichtszunahme, bei einem Tier der Gentamicin-RGD-HA-Gruppe, welches Flüssigkeitsansammlungen im Schaffbereich aufwies, konnte eine Gewichtsreduktion festgestellt werden. Bei allen anderen Tieren dieser Gruppe kam es ebenfalls zu einer Gewichtszunahme.

### **3.2.2 Röntgenologische Ergebnisse der Hauptstudie**

Bei den Röntgenkontrolluntersuchungen des Unterschenkels nach 28 Tagen wurden, wie bereits zuvor erwähnt, Knochen- und Gelenkdestruktionen, Sequesterbildung, Osteolysen und Verdickungen der Kortikalis mit periostaler Reaktion als radiologische Infektzeichen gewertet.

Die Ergebnisse der radiologischen Auswertung bei Testende können Tabellen 10 und 13 entnommen werden.

Auch hierbei zeigten sich bei 7 von 8 Versuchstieren der Kontrollgruppe deutliche radiologische Entzündungszeichen im Sinne von Osteolysen sowohl am distalen Femur sowie auch an der proximalen Tibia und periostalen Reaktionen (Abb. 22). Bei diesen Tieren deuteten auch schon die klinische Inspektion sowie die Gewichtsentwicklung auf ein entzündliches Geschehen hin und konnten somit auch radiologisch bestätigt werden. Ein Tier der Kontrollgruppe, welches auch klinisch eine Infektfreiheit vermuten ließ und bei dem eine Gewichtszunahme zu verzeichnen war, zeigte auch röntgenologisch keinen Anhaltspunkt für eine Infektion.

Korrelierend mit der klinischen Inspektion und der Gewichtsentwicklung konnte bei sämtlichen Tieren mit Gentamicin-beschichtetem Implantat kein radiologischer Hinweis auf einen Infekt erbracht werden (Abb. 22). Lediglich bei dem einen Tier mit Gentamicin-RGD-HA-Implantat, welches schon zuvor mit dezenter klinischen Infektzeichen sowie einer Gewichtsreduktion aufgefallen war konnten röntgenologisch kleinere Osteolysen am distalen Femur und der proximalen Tibia gefunden werden.

<b>Tier-nr.</b>	<b>Implantat</b>	<b>Makroskopische Infektzeichen</b>	<b>Gewichts-Entwicklung</b>	<b>Röntgenologische Infektzeichen</b>
AW 1	HA	<i>Tier verstorben</i>		
AW 7	HA	Osteolysen und Eiter über die gesamte Tibia hinweg; Kniedestruktion	Abnahme	Osteolyse distales Femur und proximale Tibia, periostale Reaktion
AW 11	HA	Eiteransammlung rund um das Femur; Gelenk völlig deformiert	Abnahme	Osteolysen femoral und tibial, periostale Reaktion
AW 12	HA	viel Eiter; Gelenk destruiert	Abnahme	Osteolysen proximale Tibia, periostale Reaktion
AW 22	HA	∅	Zunahme	∅
AW 23	HA	<i>Tier verstorben</i>		
AW 25	HA	Abszess am Knie	Zunahme	Osteolysen Tibiakopf und -schaft, periostale Reaktion
AW 27	HA	Viel Eiter; Gelenk destruiert	Abnahme	Osteolysen proximale Tibia, periostale Reaktion
AW 28	HA	Knöcherner Destruktion; massive Osteolysen; viel Eiter	Abnahme	Osteolysen distaler Femur und proximale Tibia
AW 30	HA	Abszess mit massiver Eiteransammlung im Kniegelenk	Abnahme	Osteolysen femoral und tibial
AW 2	Genta + HA	∅	Zunahme	∅
AW 3	Genta + HA	∅	Zunahme	∅
AW 4	Genta + HA	∅	Zunahme	∅
AW 8	Genta + HA	∅	Zunahme	∅
AW 10	Genta + HA	∅	Zunahme	∅
AW 14	Genta + HA	∅	Zunahme	∅
AW 15	Genta + HA	∅	Zunahme	∅
AW 21	Genta + HA	<i>Tier verstorben</i>		
AW 26	Genta + HA	∅	Zunahme	∅
AW 29	Genta + HA	∅	Zunahme	∅
AW 5	Genta+RGD+HA	∅	Zunahme	∅
AW 6	Genta+RGD+HA	∅	Zunahme	∅
AW 9	Genta+RGD+HA	∅	Zunahme	∅
AW 13	Genta+RGD+HA	∅	Zunahme	∅
AW 16	Genta+RGD+HA	Flüssigkeitsansammlung ohne Gelenkverbindung	Abnahme	Kleine Osteolysen femoral und tibial
AW 17	Genta+RGD+HA	∅	Zunahme	∅
AW 18	Genta+RGD+HA	∅	Zunahme	∅
AW 19	Genta+RGD+HA	∅	Zunahme	∅
AW 20	Genta+RGD+HA	∅	Zunahme	∅
AW 24	Genta+RGD+HA	∅	Zunahme	∅

**Tabelle 10:** Klinische und radiologische Infektzeichen der Tiere in der Hauptstudie.

	<i>Makroskopische Infektzeichen</i>
<b>HA-beschichteter K-Draht (Kontrollgruppe)</b>	7/8*
<b>Gentamicin-HA-beschichteter K-Draht</b>	0/10
<b>Gentamicin-HA-RGD-beschichteter K-Draht</b>	1/9**

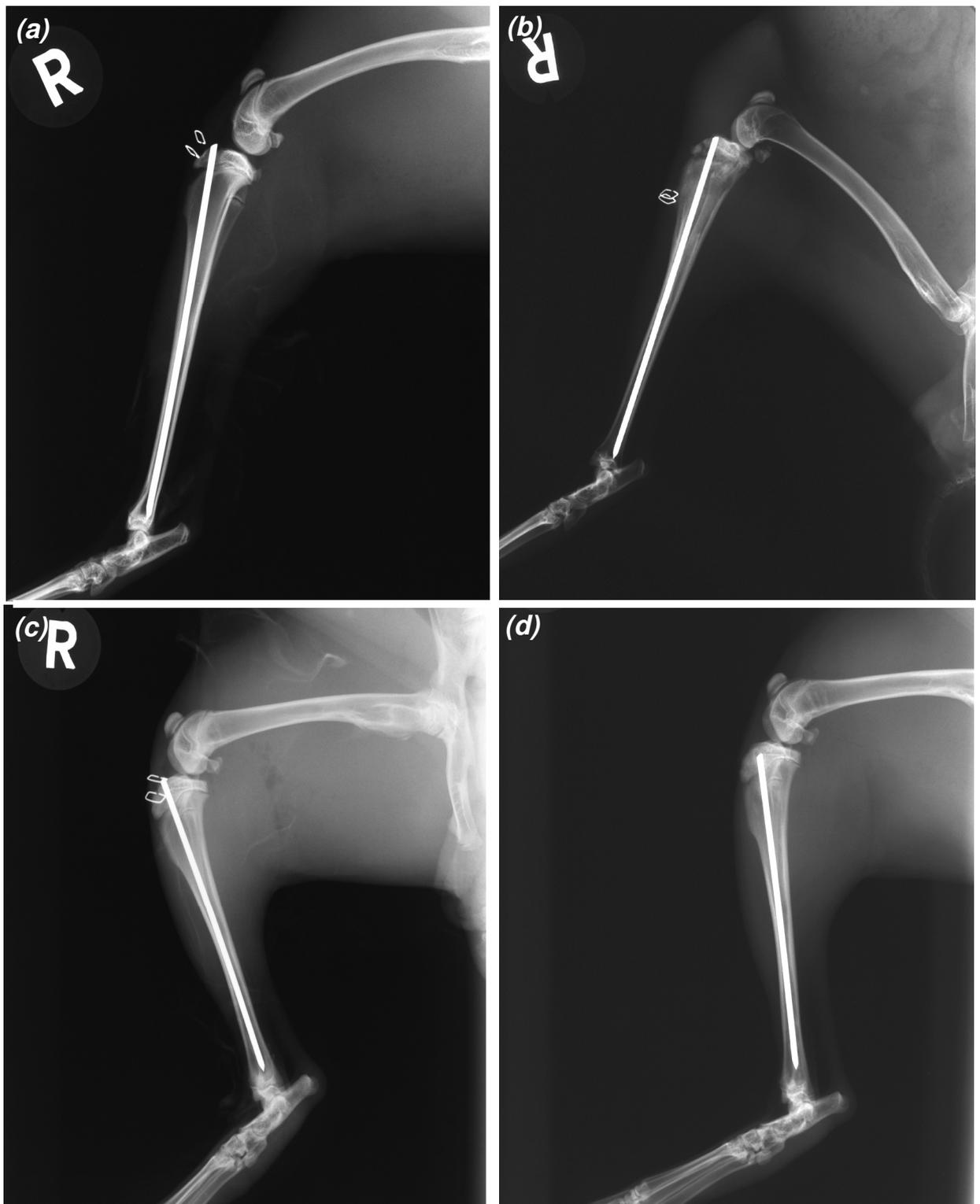
**Tabelle 11:** Klinische Ergebnisse der Hauptstudie zur antimikrobiellen Wirksamkeit. \*Zwei Tiere vorzeitig vor Versuchsende verstorben. \*\*Ein Tier vorzeitig vor Versuchsende verstorben.

	<i>Gewichtsabnahme</i>
<b>HA-beschichteter K-Draht (Kontrollgruppe)</b>	7/8*
<b>Gentamicin-HA-beschichteter K-Draht</b>	0/10
<b>Gentamicin-HA-RGD-beschichteter K-Draht</b>	1/9**

**Tabelle 12:** Gewichtsabnahme als indirektes Infektzeichen bei den Tieren der Hauptstudie zur antimikrobiellen Wirksamkeit. \*Zwei Tiere vorzeitig vor Versuchsende verstorben. \*\*Ein Tier vorzeitig vor Versuchsende verstorben.

	<i>Röntgenologische Infektzeichen</i>
<b>HA-beschichteter K-Draht (Kontrollgruppe)</b>	7/8*
<b>Gentamicin-HA-beschichteter K-Draht</b>	0/10
<b>Gentamicin-HA-RGD-beschichteter K-Draht</b>	1/9**

**Tabelle 13:** Röntgenologische Ergebnisse der Hauptstudie zur antimikrobiellen Wirksamkeit. \*Zwei Tiere vorzeitig vor Versuchsende verstorben. \*\*Ein Tier vorzeitig vor Versuchsende verstorben.



**Abbildung 22:** Röntgenologische Ergebnisse der Hauptstudie zur antimikrobiellen Wirksamkeit. Postoperative Röntgenkontrolle nach korrekter Implantation eines HA-K-Drahts (a). Nach 4 Wochen zeigen sich Osteolysen an der proximalen Tibia, eine Ausdünnung der Kortikalis und periostale Reaktion als röntgenologische Hinweise auf eine Infektion (b). Im Gegensatz hierzu die Entwicklung nach korrekter Implantation eines Gentamicin-HA-K-Drahtes (c) ohne Hinweise auf infektiöses Geschehen nach 4 Wochen (d).

### 3.2.3 Mikrobiologische Ergebnisse der Hauptstudie

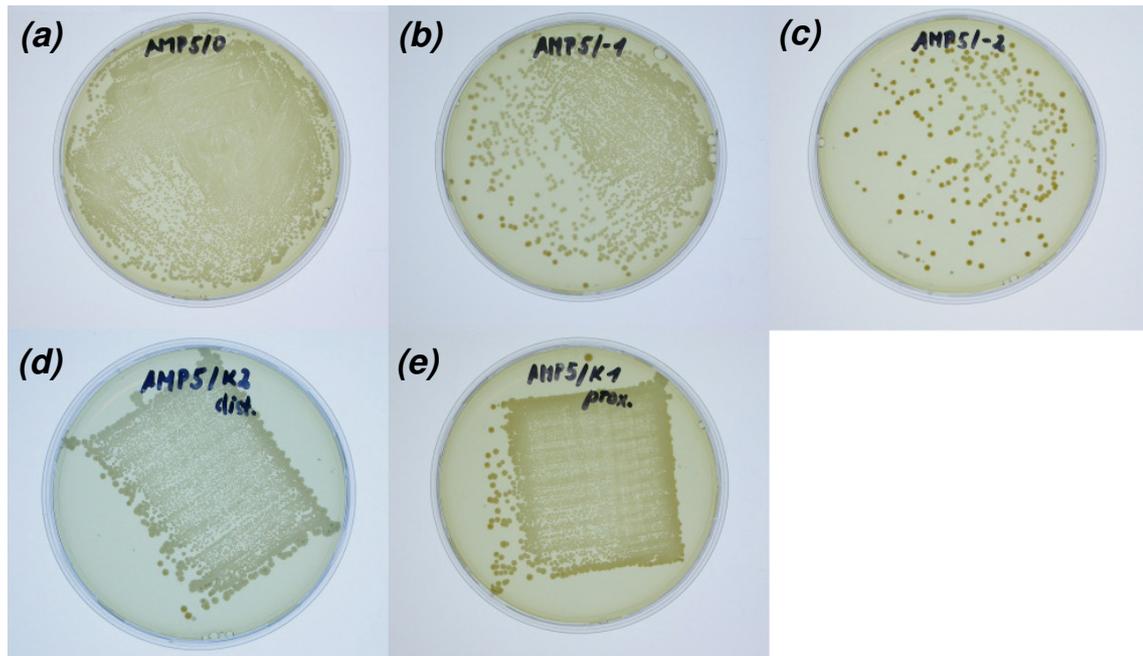
In der Hauptstudie konnte bei 7 der 8 verbliebenen Tiere der Kontrollgruppe ein eindeutiges Keimwachstum nachgewiesen werden. Es konnte korrelierend ein positives Bakterienwachstum sowohl auf den Platten mit den ausgerollten K-Drähten als auch auf den Nährböden mit den Verdünnungen des zermahlenden und aufbereiteten Knochenmaterials gefunden werden (Tab. 14, Abb. 23, Abb. 24). In allen Reihenverdünnungen (1:1, 1:10, 1:100) der infizierten Tiere wurden annähernd  $5 \times 10^5$  KBE pro g Knochen ausgezählt. Das dichte Keimwachstum auf den Agarplatten nach dem Ausrollen der K-Drähte ließ auf eine bakterielle Besiedelung des kompletten Implantates schließen (Abb. 23). Nach der genetischen Verifizierung der Keime mittels PFGE konnte in allen Fällen ausschließlich der inokulierte *Staphylococcus aureus* Stamm EDCC 5055 (Abb. 27) nachgewiesen und somit eine Kontamination ausgeschlossen werden.

Bei keinem Tier der Gentamicin-HA- und der Gentamicin-RGD-HA-Gruppe konnte ein Bakterienwachstum auf den Nährböden nachgewiesen werden (Tab. 14, Abb. 24). Weder die Kultivierung der Knochenproben noch der der ausgerollten K-Drähte führte zu einem Keimwachstum. Somit kam es durch beide Gentamicin-Beschichtungen zu einer hochsignifikanten Reduktion der Infektrate ( $p < 0,001$ ) gegenüber der Kontrollgruppe. Insgesamt konnte auch für diese beiden Gruppen eine 100%ige Korrelation der Ergebnisse aus den Knochen- und K-Draht-Proben gezeigt werden. Aufgrund des fehlenden Keimnachweises sowohl bei den K-Draht als auch bei den Knochenproben wurde das Tier aus der Gentamicin-RGD-HA-Gruppe, bei dem bei der klinischen Inspektion ein intramedullärer Flüssigkeitsverhalt und Gewichtsabnahme auffielen, als infektfrei eingestuft.

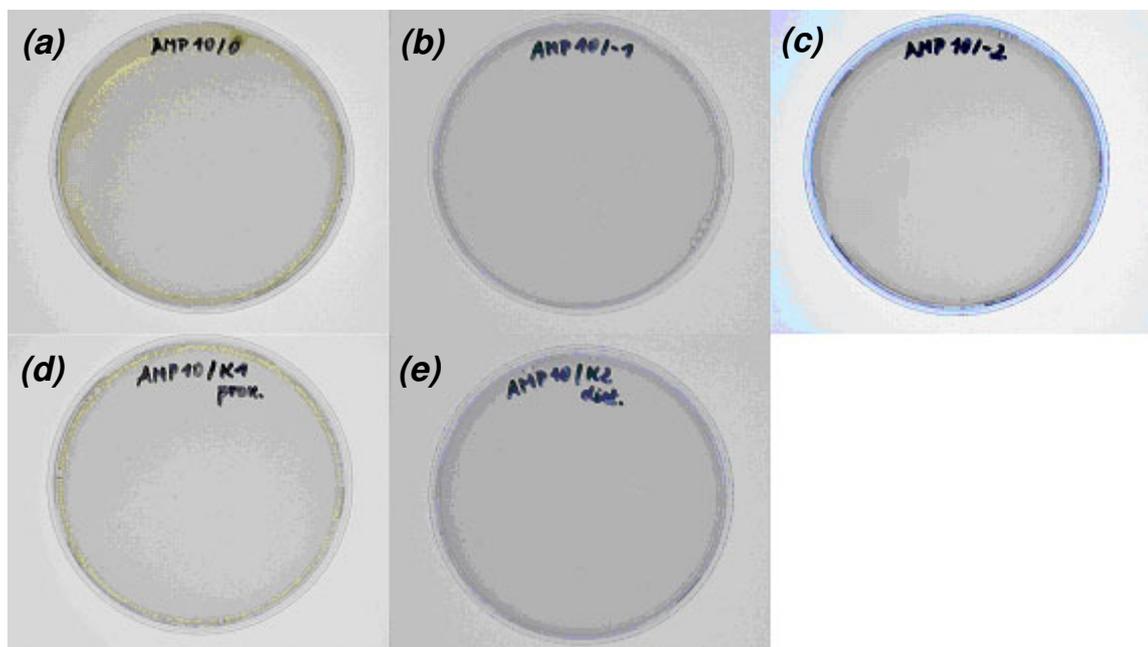
Somit zeigte sich bei allen Tieren der Pilot- und Hauptstudie eine 100%-ige Korrelation der Knochen- und K-Draht-Ergebnisse woraus sich schließen lässt, dass bei dem untersuchten Infektionsmodell bei Infektfreiheit weder ein Keimnachweis im Knochen noch auf den Implantaten selbst erbracht werden kann. Dahin gegen tritt bei Vorkommen einer Infektion eine Keimbesiedelung sowohl des Knochens als auch des K-Drahtes über seine gesamte Länge hin auf.

<b>Tiernummer</b>	<b>Implantat</b>	<b>Keimnachweis im Knochen</b>	<b>Keimnachweis auf K-Draht</b>
<b>AW 1</b>	HA	<i>Tier verstorben</i>	
<b>AW 7</b>	HA	Keimwachstum	Keimwachstum
<b>AW 11</b>	HA	Keimwachstum	Keimwachstum
<b>AW 12</b>	HA	Keimwachstum	Keimwachstum
<b>AW 22</b>	HA	∅	∅
<b>AW 23</b>	HA	<i>Tier verstorben</i>	
<b>AW 25</b>	HA	Keimwachstum	Keimwachstum
<b>AW 27</b>	HA	Keimwachstum	Keimwachstum
<b>AW 28</b>	HA	Keimwachstum	Keimwachstum
<b>AW 30</b>	HA	Keimwachstum	Keimwachstum
<b>AW 2</b>	Genta + HA	∅	∅
<b>AW 3</b>	Genta + HA	∅	∅
<b>AW 4</b>	Genta + HA	∅	∅
<b>AW 8</b>	Genta + HA	∅	∅
<b>AW 10</b>	Genta + HA	∅	∅
<b>AW 14</b>	Genta + HA	∅	∅
<b>AW 15</b>	Genta + HA	∅	∅
<b>AW 21</b>	Genta + HA	<i>Tier verstorben</i>	
<b>AW 26</b>	Genta + HA	∅	∅
<b>AW 29</b>	Genta + HA	∅	∅
<b>AW 5</b>	Genta+RGD+HA	∅	∅
<b>AW 6</b>	Genta+RGD+HA	∅	∅
<b>AW 9</b>	Genta+RGD+HA	∅	∅
<b>AW 13</b>	Genta+RGD+HA	∅	∅
<b>AW 16</b>	Genta+RGD+HA	∅	∅
<b>AW 17</b>	Genta+RGD+HA	∅	∅
<b>AW 18</b>	Genta+RGD+HA	∅	∅
<b>AW 19</b>	Genta+RGD+HA	∅	∅
<b>AW 20</b>	Genta+RGD+HA	∅	∅
<b>AW 24</b>	Genta+RGD+HA	∅	∅

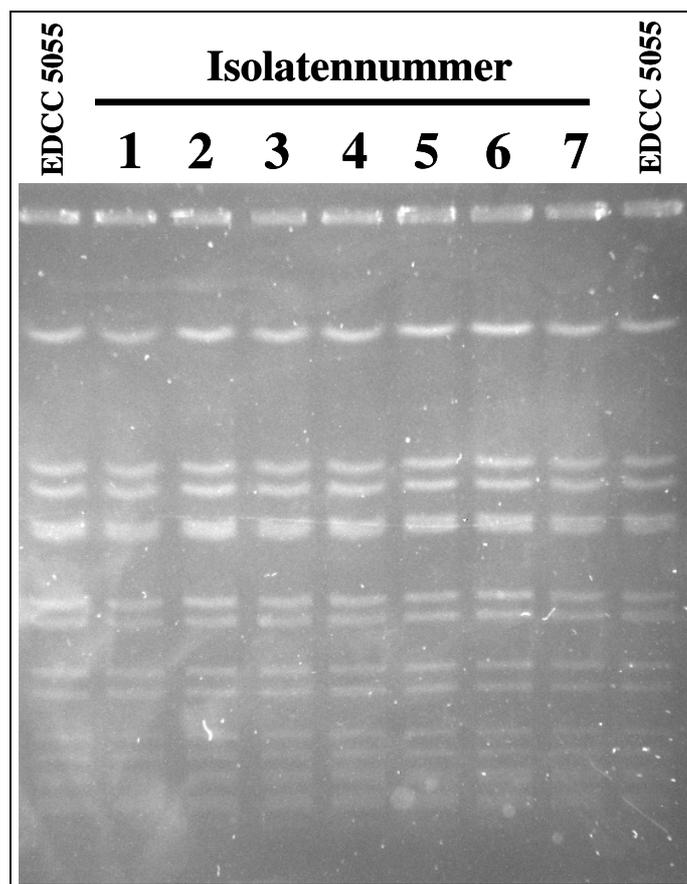
**Tabelle 14:** Keimnachweis im Knochen sowie auf den K-Drähten in der Hauptstudie zur antimikrobiellen Wirksamkeit.



**Abbildung 23:** Keimnachweis nach Agarplatteninkubation der Knochenproben eines Tieres aus der HA-Kontrollgruppe. Reihenverdünnung 1:1 (a), 1:10 (b) und 1:100 (c). Die Auswertung der Reihenverdünnung liefert eine Keimanzahl von ca.  $5 \times 10^5$  KBE pro g Knochen in jeder Verdünnung. Der flächige Keimnachweis der Agarplatten der proximalen (d) und der distalen Hälfte (e) des ausgerollten K-Drahtes zeigt eine komplette bakterielle Besiedelung des K-Drahtes über dessen gesamte Länge hinweg.



**Abbildung 24:** Agarplatteninkubation der Knochenproben eines Tieres aus der Gentamicin-HA-Gruppe. Reihenverdünnung 1:1 (a), 1:10 (b) und 1:100 (c) und der ausgerollten proximalen (d) und distalen Hälfte (e) des ausgerollten K-Drahtes. Alle Agarplatten blieben ohne Keimnachweis.



**Abbildung 25:** Bandenmuster der Pulsfeld-Gel-Elektrophorese der nachgewiesenen Keime der Knochenproben der sieben infizierten Tiere der Kontrollgruppe im Vergleich mit dem inokulierten Keim *Staphylococcus aureus* EDCC 5055. In allen sieben Fällen konnte EDCC 5055 anhand des Bandenmusters eindeutig identifiziert werden.

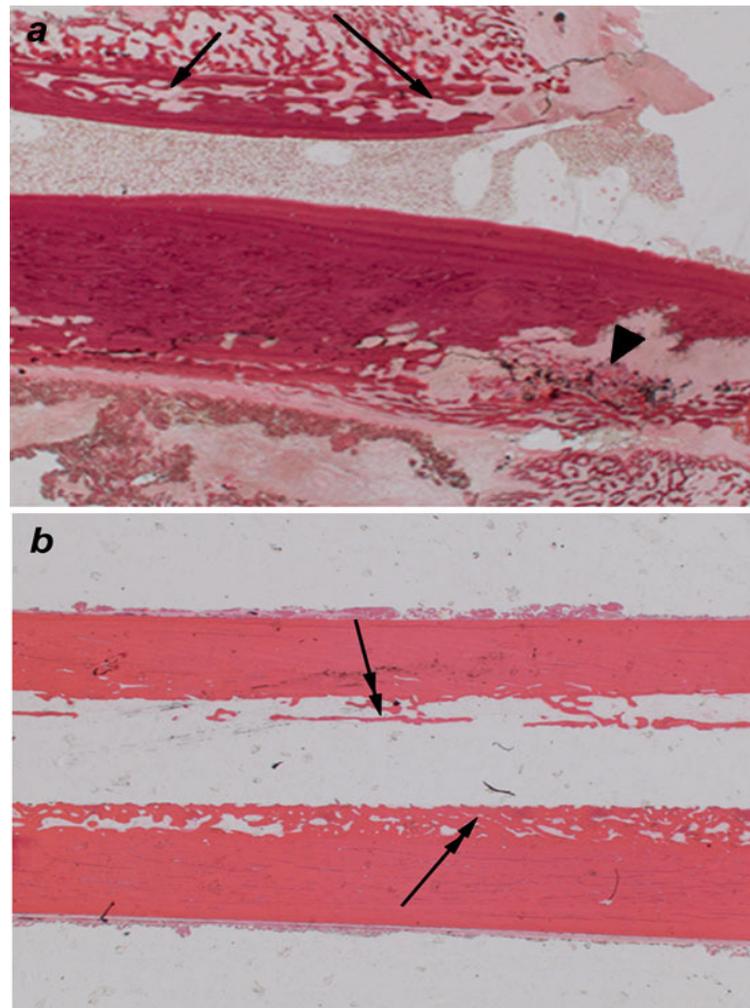
### 3.2.4 Histologische Befunde

Sowohl in der Pilotstudie als auch in der Hauptstudie wurden zusätzlich histologische Präparate angefertigt, um eventuelle infektiöse morphologische Veränderungen des Knochens nachweisen zu können.

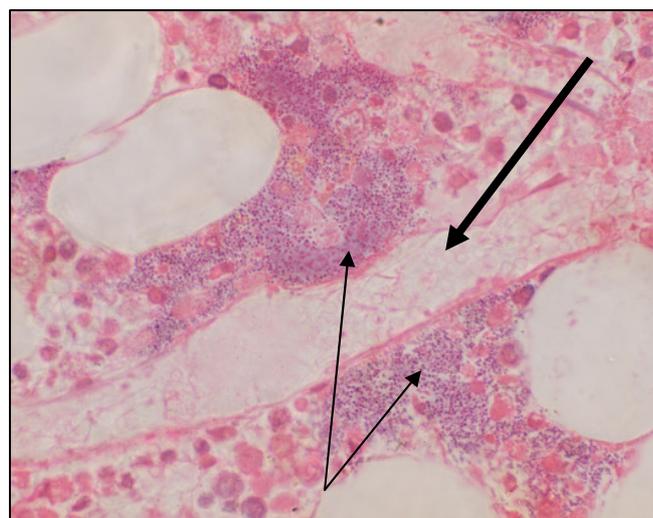
In der Gruppe der Versuchstiere ohne Gentamicinbeschichtung zeigten sich nach Färbung der hergestellten Dünnschliffpräparate bei 7 von 8 Tieren typische Zeichen einer Entzündungsreaktion wie Markraumödeme, lokal umschriebene Nekroseherde im Knochenmark, Kortikalislyse, Abszessbildung und überschießende pathologische subperiostale Knochenbildungen (Abb. 26), während bei den infektfreien Tieren der Gentamicingruppen derartige Veränderungen nicht auftraten. Die dort zu sehende reaktive subperiostale Knochenneubildung bestand aus Formation multipler kleinerer Knochenfragmente mit deutlichen Abständen zwischen den einzelnen Knochenfragmenten.

In der Detailhistologie konnten bei den infizierten Tieren Kolonien von Staphylokokken nachgewiesen werden (Abb. 27). Dabei war zu erkennen, dass die Bakterien vornehmlich im Knochenmark aber auch bei den Abszessformationen in der Kortikalis auftraten. In der Markhöhle waren in direkter Nachbarschaft zu den Bakterienkolonien sowohl Nekrosen des Knochenmarkes als auch der trabekulären Knochenstruktur zu erkennen. Bei den Tieren der Gentamicin-HA- bzw. Gentamicin-RGD-HA-Gruppe konnten histologisch keine Bakterien nachgewiesen werden.

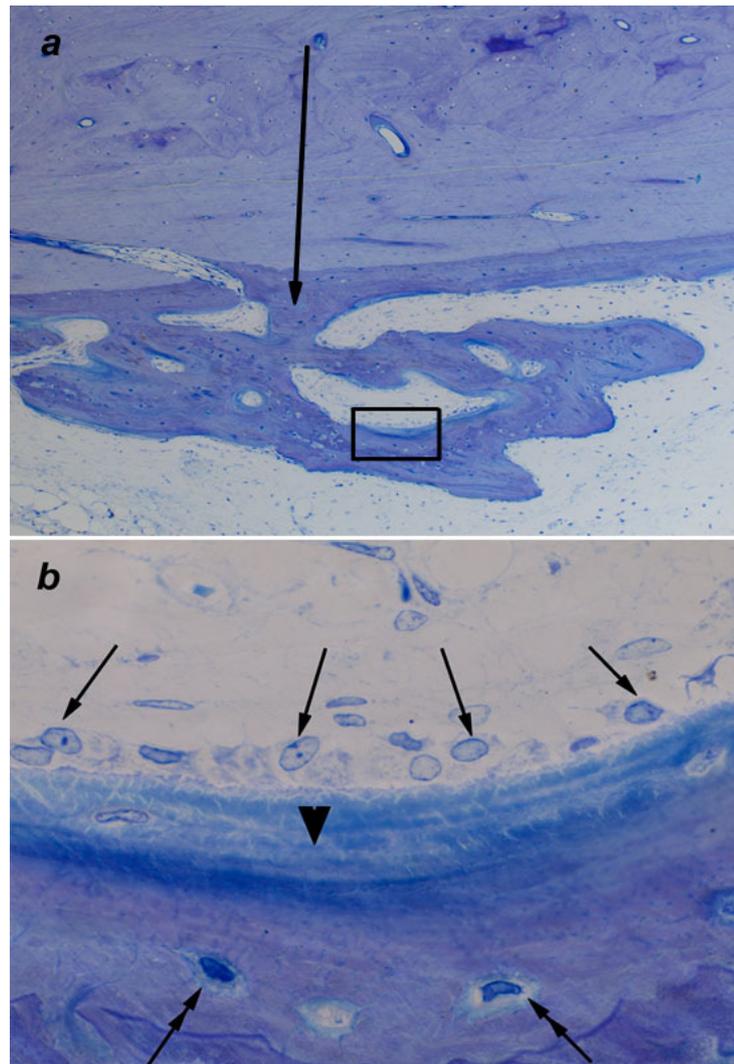
Bei den Tieren der Gentamicin-HA- bzw. Gentamicin-RGD-HA-Gruppe wurde nicht nur der Infekt verhindert, sondern es wurde histologisch sogar teilweise eine deutliche Knochenneubildung innerhalb der Knochenmarkhöhle in Richtung des Implantates festgestellt (Abb. 26, Abb. 28). Diese Knochenneubildung nahm vom Endost aus seinen Ursprung und stellte physiologische Knochenneubildung dar, bei der sämtliche Phasen der physiologischen Knochenneubildung der Knochendefektheilung in Form von Osteoidmatrixproduktion durch Osteoblasten, anschließende Mineralisation der Osteoidmatrix mit Transformation der Osteoblasten zu Osteozyten deutlich zu erkennen waren (Abb. 28). Die Osteoblasten lagerten sich in Schichten nebeneinander und starteten zunächst die Produktion der Osteoid-Extrazellulärmatrix im Sinne einer beginnenden Knochenapposition. In einem nächsten Schritt kam es dann zu einer Mineralisation des zunächst mineralfrei synthetisierten Osteoids. Während dieses Prozesses zeigte sich allmählich ein Einschluss der Osteoblasten durch die produzierte Extrazellulärmatrix, die zu einer Reduktion der Stoffwechselaktivität der Osteoblasten und zu deren Transformation zu Osteozyten führte. Die Osteozyten lagen dann „eingemauert“ in der verknöcherten Osteoidmatrix, wobei die „Füßchen“ der Osteozyten deutlich zu erkennen waren, die zu den typischen histologischen Kennzeichen intakter Osteozyten gehören. Die Knochenneubildung fand teilweise bereits Anschluß an die Oberfläche des Implantates und war ein Zeichen beginnender knöcherner Integration. Dabei konnte bei einzelnen Tieren ein knöcherner Implantatkontakt fast über die gesamte Implantatlänge festgestellt werden. Es wurde jedoch kein qualitativer Unterschied zwischen der Gentamicin-HA und Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung festgestellt.



**Abbildung 26:** Vergleich der histologischen Ergebnisse zwischen Kontrollgruppe und Gentamicin-Gruppe. Kortikale Lysen (Pfeil) und Abszessformation (Pfeilspitzen) als typische Zeichen einer Osteitis bei einem Tier der Kontrollgruppe mit HA-Implantat (a) im Vergleich zu normaler Knochenstruktur bei einem infektfreien Tier der Gentamicin-HA-Gruppe, wo es zusätzlich zu einer beginnenden Knochenformation (Doppelpfeil) in Richtung auf das Implantat als Zeichen einer beginnenden knöchernen Integration kam (b).



**Abbildung 27:** Knochenmarknekrose (dicker Pfeil) bei einem Tier der Kontrollgruppe. Die Staphylokokken sind als kugelförmige Strukturen im Knochenmarkt zu erkennen (dünne Pfeile), wo sie sich zu Kolonien zusammenlagern.



**Abbildung 28:** Knochenneubildung innerhalb des Markraumes bei einem Tier der Gentamicin-HA-Gruppe. Start der Knochenneubildung (Pfeil) vom Endost des kortikalen Knochens (a). In der Detailhistologie der rechteckig markierten Region zeigen sich Osteoblasten (Pfeile), die, wie bei pyhsiologischer Knochenneubildung, zunächst mit Osteoidbildung beginnen, das anschliessend mineralisiert wird. Während der Osteoidbildung werden die Osteoblasten sukzessive vom Osteoid (Pfeilspitze) umschlossen und wandeln sich zu Osteoblasten um (Doppelspitzenpfeile) (b).

### 3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Hauptstudie

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die klinischen, radiologischen, mikrobiologischen und histologischen Befunde in der Hauptstudie sehr gut miteinander korrelieren. Bei den Tieren mit Infekt wurde der Nachweis in allen vier Auswertungskategorien erbracht. Nur bei einem Versuchstier aus der Gentamicin-RGD-HA-Gruppe konnten klinische und radiologische Infektzeichen evaluiert werden, mikrobiologisch und histologisch kam es zu keinem Infekt- bzw. Keimnachweis, so dass letztendlich bei diesem Tier von einer Infektfreiheit ausgegangen wurde.

## 4 DISKUSSION

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass aufgrund der sich stetig erhöhenden Lebenserwartung der Bevölkerung auch die Zahl der zu implantierenden Endoprothesen ständig ansteigt. Zurzeit wird die Summe der jährlich durchgeführten Hüftgelenkimplantationen in Europa mit 500 000 beziffert (Breusch et al., 2000). Die postoperative Infektionsrate nach Einbringen eines künstlichen Hüftgelenks beträgt momentan ungefähr 1,7%, was bedeutet, dass bei ca. 8500 Patienten pro Jahr eine Infektion auftritt, die meist einen Revisionseingriff erforderlich macht. Das Infektionsrisiko bei Revisionsoperationen ist verglichen mit Erstimplantationen nochmals erhöht (Hanssen et al., 1999).

Protheseninfektionen stellen sowohl für den Patienten, den behandelnden Arzt als auch für das gesamte Gesundheitssystem ein großes Problem dar. Deutlich herabgesetzte Lebensqualität für den Patienten und mehrfache Revisionseingriffe mit erheblichen Kosten verdeutlichen die Notwendigkeit der Verbesserung der Infektionsprophylaxe in der Endoprothetik.

### 4.1 Der Nutzen lokaler Antibiotika in der Endoprothetik

Heutzutage ist die systemische Antibiotikaprophylaxe bei Prothesenoperationen etabliert, da in vielen klinischen Studien die Wirksamkeit bezüglich der Reduktion von Protheseninfektionen nachgewiesen werden konnte (Engesaeter et al., 2003, Hanssen et al., 1997, Marcelscu und Osmon, 2005, Ruchholtz et al., 2004).

Als häufig gebräuchliche Antibiotika zur systemischen perioperativen Prophylaxe gelten die Cephalosporine der 1. und 2. Generation, wie z.B. Cephazolin, Cefuroxim oder Cefotiam, da eine gute Wirksamkeit bei Knocheninfektionen nachgewiesen wurde. Diese Wirkstoffe zeichnen sich durch eine insgesamt gute Verträglichkeit, ein breites Wirkspektrum, v.a. auch gegen Staphylokokken, eine lange Halbwertszeit sowie eine gute Knochen- und Weichteilpenetration aus (Marcelscu und Osmon, 2005, Schneider und Richling, 2005, Karow und Lang-Roth, 2007).

Dabei ist die Applikationsdauer und –frequenz der systemischen Antibiotikagabe von Bedeutung. Engesaeter et. al konnten in einer Datenauswertung aus dem Norwegischen Hüftprothesenregister mit 22.000 Hüftprothesenoperationen zeigen, dass die viermalige intravenöse Antibiotikaapplikation am Tag der Operation die beste Infektreduktion erbringt, während die i.v. Gabe über 2 oder 3 Tage keine weitere Verbesserung der Infektrate erzielt (Engesaeter et al., 2003).

Jedoch stehen bei der systemischen Gabe des Antibiotikums zwischen Applikations- und Wirkort Moleküle, Membranen, Zellen und Organe, die penetriert oder umgangen werden müssen, welches als ein Nachteil dieses Standardverfahrens angesehen werden kann. Der meist parenteral verabreichte Wirkstoff gelangt in die Körperflüssigkeiten und erreicht über diese den Zielort sowie auch andere Gewebe und Organe. Durch diesen großen Raum, in dem sich das Antibiotikum zu verteilen hat, kommt es jedoch zu einer teilweisen Inaktivierung und Ausscheidung bevor der eigentliche Zielort erreicht wird (Strauß, 1999). Ein weiteres negatives Kriterium der systemischen Antibiotikagabe ist das vermehrte Auftreten der Nebenwirkungen des Wirkstoffs bei dieser Applikationsart, die systemische Toxizität.

Unter Risiko-Nutzen-Abwägung steht jedoch eindeutig die positive Wirkung auf die Senkung der Infektionsrate im Vordergrund, so dass die negativen Aspekte der systemischen Antibiotikagabe in den Hintergrund treten.

Im Gegensatz dazu wird die Anwendung einer zusätzlichen lokalen Antibiotikaprophylaxe in der Endoprothetik noch immer kontrovers diskutiert (van de Belt et al., 2001).

Heutzutage wird in Europa eine Kombination aus systemischer und lokaler Antibiotikagabe in Form von Antibiotika-beladenem Knochenzement präferiert, weil in vielen klinischen Studien beste prophylaktische Ergebnisse bezüglich der postoperativen Infektionsentstehung erzielt werden konnten (Engesaeter et al., 2003, Lucke et al., 2003, Espehaug et al., 1997).

Dahingegen wird in den USA eine Prophylaxe durch Antibiotika-Knochenzement noch immer abgelehnt (Hanssen und Osmon, 1999, Jiranek et al., 2006).

In den USA wird dieses Vorgehen dadurch begründet, dass in der Literatur bisher keine überzeugenden prospektiven, randomisierten und kontrollierten Studien für die Infektratenreduktion durch Verwendung von Antibiotika-Knochenzement gegenüber nicht antibiotikahaltigem Zement existieren. Somit scheint der

finanzielle Mehraufwand, der durch den Gebrauch von antibiotikahaltigem Zement entsteht, nicht gerechtfertigt. Es wird dabei auf einige prospektive, randomisierte Studien zurückgegriffen, die diese Haltung untermauern sollen. Bei einer Studie konnte bei 295 Patienten mit Hüft- und Knieprothesen und Zugabe von Cefuroxim zum Knochenzement keine signifikante Infektionsreduktion im Vergleich zu einer alleinig durchgeführten systemischen Cefuroximgabe gesehen werden (McQueen et al., 1987). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Gruppe der Patienten, bei denen der antibiotikahaltige Zement verwendet wurde, keinerlei zusätzliche systemische Prophylaxe erhielt, so dass dieser Studie bei fehlender klinischer Relevanz nur eine bedingte Aussagekraft zufällt. Eine weitere Studie mit 1688 Patienten und Verwendung von Antibiotikazement versus nicht antibiotikahaltigem Knochenzement zeigte eine deutliche Reduktion der Infektrate in der Gruppe mit Antibiotika-Knochenzement nach 5 Jahren, jedoch konnte nach einer Gesamtbeobachtungsdauer von 10 Jahren keinerlei signifikante Verbesserung durch die lokale Infektionsprophylaxe mehr beobachtet werden (Joseffson und Kolmert, 1993).

In einer neueren Studie an 340 primären Knieendoprothesen konnte unter Verwendung von Cefuroxim-haltigem Zement eine statistisch signifikante Infektreduktion erzielt werden. Es konnte bei keinem der Patienten mit antibiotikahaltigem Knochenzement eine Infektion nachgewiesen werden, wohingegen sich bei 3,1% ( $p=0,02$ ) der Vergleichsgruppe ohne Cefuroximzusatz eine tiefe Infektion entwickelte. Beide Gruppen erhielten zusätzlich eine systemische und orale Antibiose mit Cephazolin und Gentamicin über 7 Tage. Der Beobachtungszeitraum betrug hierbei 49 Monate (Chiu et al., 2002).

In einer weiteren prospektiven, randomisierten Studie wurde der Effekt dieses Cefuroxim-imprägnierten Zementes bei 78 Knieprothesen bei Patienten mit Diabetes mellitus getestet. Der Beobachtungszeitraum betrug 50 Monate. Es konnte in der Gruppe mit Cefuroxim-Knochenzement wiederum keinerlei Fälle von Infektion beobachtet werden, während bei 13,5% ( $p=0,02$ ) der Patienten ohne lokale Antibiotikaprophylaxe eine Infektion auftrat (Chiu et al., 2001). Somit zeigt sich in dieser Studie deutlich die Wirksamkeit von antibiotikahaltigem Knochenzement als lokale Prophylaxe zur Verhinderung von Protheseninfektionen auch bei Patienten mit Diabetes mellitus. Jiranek et al. wiederum argumentierten, dass diese Studie nicht aussagekräftig genug sei, da die untersuchten Patienten

allesamt an Diabetes mellitus litten und somit in eine Hochrisikogruppe für die Entstehung von Infektionen eingeteilt werden müssten. Bei einem Patientenkollekt ohne Diabetes mellitus in der Anamnese gäbe es keine Indikation zur Durchführung einer lokalen Antibiotikaphylaxe bei der Primärimplantation von Prothesen, da es bei diesen Patienten zu keinerlei Infektionen gekommen wäre (Jiranek et al., 2006). In dieser Studie wird weiterhin angeführt, dass antibiotikahaltiger Knochenzement laut der United States Food and Drug Administration nur für Revisionseingriffe zur Elimination einer aktiven periprotetischen Infektion zum Einsatz kommen solle.

Patienten mit Diabetes mellitus gehören jedoch zum typischen Patientengut für den Totalersatz eines Hüft- und Kniegelenkes und gerade bei der durch den Diabetes herabgesetzten Immunantwort wäre eine verbesserte Infektionsprophylaxe unbedingt wünschenswert.

In der zuvor schon mehrfach angeführten Studie des Norwegischen Hüftregisters mit mehr als 22.000 Primärhüftendoprothesen konnten Engesaeter et al. eindrücklich die Wirksamkeit einer Kombination aus systemischer und lokaler Antibiotikaphylaxe darstellen (Engesaeter et al., 2003). Die Reduktion der Infektrate führte hierbei zu einer statistisch signifikanten längeren Überlebenszeit der Prothese innerhalb der ersten 10 postoperativen Jahre. Bei dem Patientenkollekt, welches lediglich eine systemische Prophylaxe erhielt war das Risiko eines Revisionseingriffes aufgrund einer Protheseninfektion um 1,8fach erhöht ( $p=0,01$ ) gegenüber der Gruppe, die systemisch und lokal, in Form einer intravenösen Antibiose und eines antibiotikahaltigen Knochenzements, Antibiotika erhielten.

Bei dieser Studie handelt es sich zwar um eine retrospektive Datenanalyse und nicht um eine prospektiv randomisiert durchgeführte Studie, jedoch kann bei der hohen Anzahl der Fälle von einer ausreichend guten Qualität der so gewonnenen Daten ausgegangen werden.

Aufgrund der zuvor aufgezeigten Ergebnisse verschiedener Studien kann zusammenfassend festgehalten werden, dass es genügend Anhaltspunkte für die bessere Infektionsprophylaxe bei der Primärimplantation von Prothesen durch den Einsatz von Antibiotika-Knochenzement zusätzlich zur systemischen Antibiotikagabe gibt. Somit ist die Anwendung dieses in Europa anerkannten Standardverfahrens gerechtfertigt.

Engesaeter et al. konnten in einer weiteren Studie des Norwegischen Hüftprothesenregisters ähnlich gute Ergebnisse für die Infektionsreduktion bei der Anwendung von zementfreien Prothesen verglichen mit zementierten Hüftendoprothesen erzielen. Die Infektionsrate bei zementfreien Implantaten und antibiotikahaltigem Knochenzement war signifikant niedriger als bei Verwendung von antibiotikafreiem Knochenzement (Engesaeter et al., 2006).

Im Hinblick auf die gesundheitlichen Konsequenzen für die betroffenen Patienten sowie der hohen Kosten für das Gesundheitssystem, die durch Revisionsoperationen auftreten sollte die Infektionsprophylaxe weiterhin optimiert werden, auch für zementfrei implantierte Endoprothesen. Eine Antibiotikabeschichtung wäre dabei eine gute Möglichkeit zur Vermeidung von Protheseninfektionen.

#### **4.2 Antimikrobielle Beschichtungen für zementfreie Endoprothesen**

Antimikrobielle Beschichtungen auf zementfreien Endoprothesen sollen die Infektionsrate senken, ohne dabei die knöchernen Integration des Implantates negativ zu beeinflussen. Aus diesem Grund wird die Antibiotikaschicht auf einer HA-Basissschicht aufgebracht, so dass die Osteointegration weiterhin gegeben ist. Dabei ist die Technik zum Aufbringen beider Schichten von großer Bedeutung und deshalb näher zu erläutern.

Eine häufig angewandte Methode zur Beschichtung orthopädischer Implantate mit Hydroxylapatit o.ä. stellt die „Plasma Spray“ Technologie dar, welche die Langzeitfixation der Prothesen nachweislich zu verstärken vermag (Geesink, 1993). Die extrem hohen Temperaturen, die bei diesem Beschichtungsverfahren zum Aufbringen der Beschichtung notwendig sind, limitieren den Einsatz dieser Technik bezüglich der Verwendung organischer Moleküle, wie z.B. Antibiotika (Stigter et al., 2002), da diese zumeist hitzelabil sind und somit während des Beschichtungsprozesses inaktiviert würden.

Deshalb wurde nach Alternativen gesucht, wo z.B. durch Eintauchen des Implantats in eine Antibiotikallösung bei Raumtemperatur die Inaktivierung des Antibiotikums verhindert wird (Radin et al., 1997). Dabei wurde zunächst die Kalziumphosphatgrundschrift durch einen elektrophoretischen

Abscheidungsprozess mit anschließender Sinterung bei 900° C auf das Titan aufgebracht. Mittels dieses Schrittes wurde eine Schichtdicke von ca. 50-80 µm erreicht. Anschließend erfolgte das Eintauchen in eine Vancomycinlösung bei einer Temperatur von 37° C für 6-24 Stunden mit Konzentrationen der Antibiotikallösung von entweder 1 mg/ml oder 10 mg/ml. Dieses Verfahren ergab jedoch eindeutige Nachteile im Sinne einer zu schnellen Freisetzung des antimikrobiell wirksamen Agens. Zum Erreichen einer optimalen Wirksamkeit der Beschichtungen wurde daher versucht eine zusätzliche Lipidschicht auf das Implantat aufzubringen, welches jedoch zu Beeinträchtigungen im Einwachsverhalten der Prothesen geführt hat und deshalb keine Anwendung in der Endoprothetik findet (Radin et al., 1997, Campbell et al., 2000, Stigter et al., 2002).

Ein weiteres Verfahren, das „biomimetische“ Coating, wurde von Stigter et al. mit einer Tobramycin-Kalziumphosphatbeschichtung getestet (Stigter et al., 2002). Dabei wurde das Titanimplantat zunächst in eine gesättigte Kalziumphosphatlösung für 24 Stunden bei 37° C gebracht und anschließend in eine Tobramycin-Kalziumphosphatlösung mit Konzentrationen von 0-800 mg/l für 48 Stunden ebenfalls bei 37° C eingetaucht. Dadurch ergab sich eine Hydroxylapatit-Karbonatschicht mit einer Dicke von ca. 40 µm. Zusätzlich konnte eine Konzentration von annähernd 3 µg/l Tobramycin auf den Titanimplantaten erreicht werden, welches einen 10fach höheren Wert als bei den „Plasma Spray“ behandelten Implantaten ergab. Bei der „Plasma Spray“ Methode wurden die Implantate ebenfalls in eine reine 800 mg/l starke Tobramycinlösung eingetaucht, konnten jedoch nur eine maximale Schichtdicke von 0,3 µg/mg aufweisen. Somit konnte der Vorteil der „biomimetischen“ Methode gegenüber dem „Plasma Spray“ Verfahren in dieser Studie eindeutig belegt werden. Des Weiteren konnte die Wirksamkeit der so entstandenen co-präzipitierten Tobramycin-Kalziumphosphatbeschichtung gegenüber *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden.

Auf der Grundlage dieses „biomimetischen“ Verfahren wurden diverse Antibiotika als Beschichtungswirkstoff getestet: Cephalothin, Carbenicillin, Amoxicillin, Cefamandol, Tobramycin, Gentamicin und Vancomycin (Stigter et al., 2002). Die besten Werte hinsichtlich der Freisetzungskinetik zeigten dabei die Antibiotika der Carboxyl-Gruppe wie z.B. Cephalothin, Carbenicillin und Cefamandol. Alle

getesteten Antibiotika zeigten eine gute *in vitro* Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus*. Trotz dieser positiven Ergebnisse der *in vitro* Wirksamkeit der Antibiotika existieren zurzeit keine experimentellen Daten in Form von Tierversuchen zur Testung des *in vivo* Verhaltens der Hemmstoff-beschichteten Implantate.

Eine weitere Möglichkeit der Beschichtung von Implantaten mit einer Basisschicht bestehend aus HA stellt die Kombination mit Chlorhexidin dar, welches an Fixateur-Pins getestet wurde (Campbell et al., 2000). Die Wirksamkeit dieses Verfahrens konnte im Schafsmodell mit deutlicher Reduktion von Pin-track-Infektionen nachgewiesen werden. Jedoch kann die Methode lediglich zur Infektionsprophylaxe bei Fixateur-Pins angewendet und nicht auf die zementfreie Endoprothetik übertragen werden.

Zum Zeitpunkt der Durchführung unserer Studie zur antimikrobiellen Wirksamkeit von Gentamicin-beschichteten Implantaten existierten keine entsprechenden anderen tierexperimentellen Studien bezüglich dieses Themas. Somit konnte die vorliegende Arbeit als erstes den erfolgreichen Einsatz einer antimikrobiellen Beschichtung zur Reduktion der Infektionsrate in der zementfreien Endoprothetik zeigen. Zwischenzeitlich sind weitere Studien am Ratteninfektionsmodell mit Rifampicin-Monocyclin-Beschichtungen durchgeführt und publiziert worden (Darouiche et al., 2007). Die Ergebnisse werden im folgenden Text noch erläutert und diskutiert.

### **4.3 Verwendetes Tiermodell**

Zur Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit zementfreier Endoprothesen wurde in dieser Arbeit an einem Tiermodell gearbeitet. In der Literatur existieren bereits mehrere Studien zur Induktion von Implantat-assoziierten Knocheninfektionen am Tiermodell. Die bedeutendsten dabei stellen wohl die Arbeiten von Lucke et al. (2003) am Rattenmodell und Nijhof et al. (2001) an einem Kaninchenmodell dar, in denen jeweils eine intramedulläre Knocheninfektion hervorgerufen wird. Bei Lucke et al. waren der Versuchsablauf und die Methodik ähnlich wie bei den vorliegenden Untersuchungen. Es wurden Ratten unbeschichtete sowie mit Gentamicin-beschichtete Kirschner Drähte in den Tibiamarkkanal implantiert. Zuvor wurde der Knochenmarkkanal mit

*Staphylococcus aureus* infiziert. Die Inokulationsmenge hierbei betrug 10 µl entsprechend 10<sup>3</sup> KBE. Da die Bakteriensuspension in dieser Studie vor der K-Draht Implantation eingebracht wurde, besteht bei dieser Technik die Gefahr, dass bei Einführen der Implantate durch den erhöhten intramedullären Druck ein Teil der inokulierten Bakterien wieder aus dem Knochenmarkkanal herausgedrückt wird und somit eine niedrigere Restmenge mit weniger Keimen als zuvor verbleibt. Eine Standardisierung dieser Versuchsreihe erscheint somit unmöglich. Daher wurden bei den Testreihen der vorliegenden Arbeit zunächst das Implantat und anschließend 20 µl der Bakteriensuspension in Höhe des mittleren Schaftes in den Knochenmarkskanal eingebracht. Durch dieses Vorgehen wurde ein Austreten der inokulierten Bakterienmenge vermieden und eine Standardisierung des Verfahrens erreicht.

Für die weitere Auswertung unserer Versuchsreihe wurden Erfahrungswerte aus der zuvor schon erwähnten Studie von Nijhof et al. (2001), in der der Effekt von Tobramycin-haltigem Knochenzement als lokale und Cefazolin als zusätzliche systemische Infektionsprophylaxe an einem Kaninchenmodell getestet wurde, herangezogen. Nach Inokulation von *Staphylococcus aureus* in die Knochenmarkkanäle der rechten Tibiae der Kaninchen wurde anschließend jeweils ein Implantat platziert. Dabei wurde bei einem Teil der Versuchstiere einfacher Knochenzement ohne antibiotischen Zusatz und bei einem anderen Teil Tobramycin-haltiger Knochenzement in die Markhöhle injiziert. Nach 28 Tagen erfolgte die Entnahme der Tibiae zur Durchführung weiterer Untersuchungen. Dabei wurde ein Verfahren zur Quantifizierung der Bakterienkontamination pro Gramm Knochen durch Homogenisierung der Knochenproben für die Auswertung von Knocheninfektionsversuchen vorgestellt, die auch in der vorliegenden Studie verwendet wurde. Durch die zunächst sagittale Teilung des Knochens in zwei Hälften kann ein Teil für mikrobiologische und der andere für histologische Zwecke untersucht werden, welches den Vergleich zwischen den beiden Untersuchungsmethoden erlaubt und somit einen großen Vorteil dieses Modells darstellt.

Als Infektionskeim für diese Studie wurde ein *Staphylococcus aureus*-Stamm verwendet, da dieser Erreger zusammen mit *Staphylococcus epidermidis* als Hauptverursacher von Protheseninfektionen gilt und aufgrund seiner Virulenz in

Tiermodellen zu hohen Infektionsraten in den Negativkontrollgruppen führt (Darouiche et al., 2007, Lucke et al., 2003, Nijhof et al., 2001).

Durch die Kombination der Aufarbeitung der Knochenproben und der Durchführung der „Roll out“-Technik der K-Drähte, die nach Explantation auf Agarplatten zum ergänzenden Nachweis vitaler Keime auf der Implantatoberfläche ausgerollt wurden, konnte eine Korrelation der Ergebnisse beider Keimnachweise aufgezeigt werden. Lucke et al. (2003) verwendete selbiges Verfahren in seiner Arbeit. Bei der hier vorliegenden Arbeit konnte dabei eine 100%ige Übereinstimmung sowohl bei negativem als auch bei positivem Keimnachweis beobachtet werden. Wurden vitale Keime auf der Implantatoberfläche nachgewiesen, erfolgte ebenso der Keimnachweis in der Knochenprobe. Das gleiche galt für Knochenproben ohne Bakterienwachstum und den dazugehörigen sterilen Agarplatten der ausgerollten Implantate.

Somit kann geschlussfolgert werden, dass es bei einer Infektion sowohl zur bakteriellen Besiedlung des Implantats als auch zu einer Infiltration des Knochens in dem entwickelten Tiermodell kommt.

Nach Abschluss der Pilotstudie dieser Versuchsreihe konnte bereits ein sehr hohes Infektionsauftreten in der Negativkontrollgruppe beobachtet werden, was aus statistischer Sicht die Durchführung einer Studie mit überschaubarer Gesamtanzahl bei der Ermittlung des notwendigen Stichprobenumfangs erlaubte. In der Hauptstudie kam es dann zu einer Infektionsrate von 88% in der Negativkontrollgruppe, was die Eignung und Verlässlichkeit des angewandten Modells bestätigte.

Da es sich bei dem inokulierten Keim um einen Kommensalen der physiologischen Hautflora handelt, war die Möglichkeit einer Superinfektion durch einen weiteren *Staphylococcus aureus*-Stamm gegeben. Durch die hier durchgeführten biochemischen Untersuchungen, dem Nachweis keimtypischer DNA-Sequenzen und dem Vergleich der DNA-Muster der isolierten Bakterien mittels Pulsfeld-Gel-Elektrophorese konnte eine Kontamination ausgeschlossen und der gefundene Keim in allen Fällen eines Keimnachweises eindeutig als der inokulierte *Staphylococcus aureus* EDCC 5055 identifiziert werden.

Dieses zeigte zum einen die Verlässlichkeit des verwendeten Staphylokokken-Stammes hinsichtlich der Auslösung von Knocheninfektionen und zum anderen

konnte eine Kontamination bei der Operation und der anschließenden Auswertung ausgeschlossen werden.

Verglichen mit dem Modell von Lucke et al. (2003) wurde in der hier vorliegenden Studie den Versuchstieren keine systemische Antibiose verabreicht und somit die klinische Situation nicht genau wiedergespiegelt. Diese Untersuchungen am Kaninchenmodell zielten jedoch vorrangig auf die Verbesserung der lokalen Antibiotikaphylaxe und die Wirksamkeit der Gentamicinbeschichtung in der zementfreien Endoprothetik ab. Studienumfang und Anzahl der Versuchstiere hätten weitaus höher sein müssen um zusätzlich die Unterschiede von alleiniger lokaler und kombinierter lokaler und systemischer Antibiose darstellen zu können. Weitere Studien, in denen die systemische in Kombination mit der hier getesteten lokalen Antibiotikagabe verabreicht wird, müssen zukünftig noch durchgeführt werden.

Abschließend kann gesagt werden, dass das hier verwendete Kaninchenmodell zur Testung der antimikrobiellen Wirksamkeit beschichteter Implantate als erfolgreich angesehen werden kann.

#### **4.4 Ergebnisse der antimikrobiellen Beschichtung der vorgestellten Arbeit**

In der hier vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die zwei verwendeten Gentamicinbeschichtungen im Vergleich zu reinen HA-Beschichtungen zu einer signifikanten Reduktion der Infektrate im Tiermodell geführt haben. Somit kann von einer guten Wirksamkeit sowohl der Gentamicin-HA- als auch der Gentamicin-HA-RGD-Beschichtungen zur Verbesserung der Infektionsprophylaxe ausgegangen werden.

Alle Tiere der Pilot- und Hauptstudie, bei denen ein Gentamicin-beschichteter Draht implantiert wurde, blieben infektfrei. Dieses schließt die zwei Tiere der Pilotstudie, denen eine maximale Keimdosis von  $10^8$  KBE inokuliert wurde mit ein.

Bei einer gezielten lokalen antibiotischen Therapie mittels Implantation eines wirkstoffhaltigen Trägermaterials am Infektionsort müssen sowohl Antibiotikum als auch Trägersubstanz besondere bakteriologische, pharmakologische und physikalisch-chemische Anforderungen erfüllen. Neben einer guten Verträglichkeit

und einer zuvor schon erwähnten, dem Erregerspektrum entsprechenden bakteriziden Wirkung spielt die Freisetzungskinetik des Antibiotikums aus der Trägermatrix und das pharmakokinetische Geschehen des Wirkstoffs im Organismus eine bedeutende Rolle (Wahlig, 1983, Wahlig und Dingeldein, 1987). Verschiedene experimentelle Tierstudien belegen, dass ein Unterschied zwischen der *in vivo* und *in vitro* Freisetzung von Gentamicin besteht. Im Allgemeinen verlässt das Antibiotikum die Trägermatrix, indem es durch die Poren und den Beschichtungsfilm diffundiert und somit unmittelbar in das umliegende Gewebe abgegeben wird. *In vivo* Studien zeigen eine signifikant schnellere Freisetzung verglichen mit den *in vitro* Freisetzungsgeschwindigkeiten. Dieses Phänomen wird in erster Linie dem zeitlich erhöhten *in vivo* Abbau der polymeren Implantatbeschichtung und der verstärkten Ausbildung von Gefäßnetzen in der Umgebung des Implantates zugeschrieben. Eine untergeordnete Rolle spielen zusätzlich endogene Zellprodukte wie freie Radikale oder Enzyme, die von den am Knochenregenerationsprozess beteiligten Zellen produziert werden (Baro et al., 2002, Lucke et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich interessante Aspekte im Hinblick auf die Freisetzungskinetik von Gentamicin. *In vitro* Studien ergaben, dass bereits 95% des Wirkstoffs aus der Gentamicin-HA-Beschichtung in den ersten 12 Stunden freigesetzt werden. Die hier verwendete Beschichtung bestand zu 50% aus dem schlecht wasserlöslichen Gentamicincrobofat und zu 50% aus dem gut wasserlöslichen Gentamicinsulfat, die, wie zuvor schon beschrieben, in einem zweizeitigen Prozess auf das Implantat aufgebracht wurden. Aus den schon bekannten *in vitro* und den in unserer Studie erbrachten *in vivo* Ergebnissen kann gefolgert werden, dass direkt perioperativ und in den ersten Stunden der postoperativen Phase eine hohe Antibiotikakonzentration am Wirkort zur Vermeidung von Infektionen vonnöten ist. Bei der getesteten Beschichtung wird das wasserlösliche Gentamicinsulfat sofort bei bzw. nach Implantation freigesetzt, wohingegen das schwer wasserlösliche Gentamicincrobofat für eine weitere konstante Wirkstofffreisetzung über die folgenden 24 Stunden sorgt.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten der bereits zuvor erwähnten Studie des Norwegischen Hüftprothesenregisters überein, bei dem durch viermalige Verabreichung eines Antibiotikums direkt am Operationstag die beste Infektionsprophylaxe erzielt werden konnte (Engesaeter et al., 2003). Eine

weiterführende systemische Antibiose über den ersten postoperativen Tag hinaus ergab in dieser Untersuchung keinerlei weitere Verbesserung der Infektionsraten.

Die hier vorliegende Arbeit war zum Zeitpunkt der Durchführung die erste Studie zur Testung der antimikrobiellen Wirksamkeit beschichteter Implantate für die zementfreie Endoprothetik, die am Tiermodell durchgeführt wurde und eine signifikante Infektionsreduktion erzielen konnte. Zwischenzeitlich wurde eine weitere Studie, in der eine Rifampicin-Monocyclin-Beschichtung ebenfalls am Kaninchenmodell getestet wurde, veröffentlicht (Darouiche et al., 2007).

In der Studie von Darouiche et al. (2007) wurden die Versuchstiere zunächst in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe erhielt unbeschichtete Titanimplantate und stellte somit die Negativkontrollgruppe dar, der anderen Gruppe wurden Rifampicin-Monocyclin-beschichtete Titanstifte mit einer jeweiligen Beschichtungskonzentration der Antibiotika von  $35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  implantiert. Es erfolgte die anschließende Inokulation ebenfalls mit einem *Staphylococcus aureus*-Stamm. Jedoch wurde die inokulierte Keimmenge mit 500 KBE deutlich niedriger gewählt als die von uns verwendete Bakteriensuspension mit  $10^7$  KBE.

Es ergab sich bei *in vitro* Untersuchungen zur Freisetzungskinetik eine 94% bzw. 95%ige Elution des Minocyclins sowie des Rifampicins nach 6 Stunden Lösung in einer physiologischen Kochsalzlösung. Bei der *in vivo* Testung im Tiermodell konnte eine signifikante Infektionsreduktion durch diese Beschichtung gegenüber unbeschichteten Titanimplantaten ( $p=0,02$ ) nachgewiesen werden. Jedoch kam es auch bei 5 von 13 Tieren (38%) der Studiengruppe mit antibiotikabeschichteten Implantaten zu einer Infektionsentstehung. Die Infektionsrate in der Kontrollgruppe betrug 100% (12 von 12 Tieren).

Um die Ergebnisse der Studie von Darouiche et al. (2007) und der vorliegenden Arbeit vergleichen zu können, müssten der gleiche *Staphylococcus aureus*-Stamm in gleicher Konzentration inokuliert werden. Jedoch kann festgehalten werden, dass es bei der Verwendung einer relativ geringen Keimmenge von 500 KBE bei der Rifampicin-Monocyclin-Beschichtung in 83% der Fälle zu einer Infektion und bakteriellen Besiedlung der Implantatoberfläche gekommen ist, wohin gegen in der vorliegenden Studie keinerlei Keim- oder Infektnachweis bei den Gentamicin-Gruppen erbracht werden konnte.

Die Ergebnisse von Darouiche et al. (2007) unterstützen allerdings die zuvor erlangte Erkenntnis, dass hohe lokale Antibiotikakonzentrationen durch eine schnelle Freisetzungskinetik der Wirkstoffe während der ersten Stunden nach Implantation zu einer effektiven Infektionsratenreduktion führen.

Ob die so gewonnenen Erkenntnisse zur antimikrobiellen Wirksamkeit beschichteter Implantate von der *in vivo* Testung am Tiermodell auf den Menschen übertragen werden kann, bleibt Gegenstand weiterer klinischer Untersuchungen und sollte zunächst nicht zu euphorisch interpretiert werden. Jedoch ist die Testung neuer Technologien oder Medikamente am Tiermodell ein wichtiger Schritt zur Umsetzung des jeweiligen Prinzips für den klinischen Einsatz. Dennoch ist mit der vorliegenden Arbeit und dem *in vivo* Nachweis der antimikrobiellen Wirksamkeit von Gentamicin-Beschichtungen am Tiermodell ein weiterer Fortschritt auf dem Wege der klinischen Umsetzung einer effektiven Beschichtungstechnologie für zementfreie Endoprothesen gelungen.

Im Hinblick auf die mikrobiologischen Ergebnisse dieser Studie lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die signifikante Infektionsreduktion durch die getesteten Gentamicinbeschichtungen gegenüber den HA-Beschichtungen der Negativkontrollgruppe eine hohe Potenz hinsichtlich der Verbesserung der Infektionsprophylaxe verspricht.

#### **4.5 Nachteile von Antibiotikabeschichtungen**

Bei den zuvor schon deutlich angeführten Vorteilen von Antibiotikabeschichtungen hinsichtlich einer Verbesserung der Infektionsprophylaxe müssen auch mögliche Nachteile dieser Technologie näher betrachtet werden. Die meisten Studien in der Literatur bezüglich der lokalen Antibiotikaprophylaxe beziehen sich auf antibiotikahaltigen PMMA-Knochenzement.

Bei Verwendung von Antibiotika stellt sich immer die Frage nach allergischen Reaktionen, die durch die Wirkstoffkomponenten ausgelöst werden können. Allergische Reaktionen nach Einsatz von antibiotikahaltigem Knochenzement sind lediglich einmalig in der Literatur in Form einer Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion beschrieben (Richter-Hintz et al., 2004), die sich jedoch weniger gegen das Antibiotikum Gentamicin als vielmehr gegen Bestandteile des Knochenzements

richteten. Somit ist nicht von allergischen Reaktionen bei Verwendung antibiotikahaltigen Knochenzements auszugehen.

Eine lokale Antibiotikaphylaxe wirft die Frage nach Resistenzentwicklungen bezüglich der bei Protheseninfektionen häufig vorkommenden Keime auf. Es konnte gezeigt werden, dass nach Verwendung von antibiotikahaltigem Zement resistente Stämme von *Staphylococcus aureus* und koagulase-negativen Staphylokokken auftreten können (Thomes et al., 2002). Dieses Phänomen wurde zum einen dem verlängerten Freisetzungszeitraum und zum anderen der letztendlich geringen Konzentration des Wirkstoffs im Gewebe zugeschrieben. Studien mit Gentamicin-haltigem Knochenzement zeigten noch 5,5 Jahre nach dem operativen Eingriff eine Anreicherung des Antibiotikums in unmittelbarer Umgebung der Prothese (Neut et al., 2003). Diese niedrigen, über Jahre bestehenden Antibiotikaspiegel fördern die Entstehung resistenter Stämme und begünstigen das Auftreten so genannter „small colony variants“ von *Staphylococcus aureus* (von Eiff et al., 1998), die sich durch eine verminderte Wachstumsrate, eine verringerte Exoproteinproduktion sowie eine verstärkte Resistenz gegenüber Aminoglykosiden auszeichnen (Krimmer et al., 1999). Da die Antibiotikafreisetzung bei Verwendung beschichteter Implantate, wie sie auch in dieser Studie benutzt wurden, zeitlich limitiert ist, kann vermutet werden, dass dies ein Vorteil gegenüber dem langen Freisetzungszeitraum des Antibiotikums aus Knochenzement darstellt.

Weiterhin stellt die Oberfläche von PMMA-Knochenzement trotz Antibiotikabeimengung zur lokalen Wirkstofffreisetzung eine ideale Oberfläche zur Anhaftung von Mikroorganismen dar, die sich durch Bildung eines Biofilms gegen die körpereigene Immunabwehr sowie eine antibiotische Therapie zu schützen vermögen und ebenfalls zur Entwicklung von Resistenzen beitragen können (Neut et al., 2001).

In einer Studie von Thomes et al. (2002) wurden die Infektions- und Resistenzentwicklungsraten bei Verwendung von Gentamicin-haltigem Knochenzement am Rattenmodell getestet. Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe erhielt Gentamicin-haltigen Knochenzement während in der anderen Gruppe Knochenzement ohne Antibiotikagehalt als Negativkontrolle verwendet wurde. Nach Implantation erfolgte die Kontamination des Wundbereiches mit einem Gentamicin sensiblen *Staphylococcus epidermidis*-

Stamm. Nach zwei Wochen wurde der Zement wieder entfernt und mikrobiologischen Tests unterzogen. Dabei kam es bei der Versuchsgruppe mit Gentamicin-haltigem Zement zu einer deutlich niedrigeren Infektionsrate (41% vs. 73%) jedoch zu einer signifikant höheren Rate an Infektionen mit Gentamicin resistenten Stämmen (78% vs. 19%;  $p < 0,01$ ).

Obwohl die klinischen Ergebnisse in diesem Zusammenhang nicht eindeutig sind, werden sie in der Literatur im Sinne einer erhöhten Gefahr der Resistenzentwicklung bei Verwendung von antibiotikahaltigen Knochenzement gedeutet (Jiranek et al., 2006). In einer Studie von Hope et al. (1989) wurde bereits sehr früh die Resistenzentwicklung bei Protheseninfektionen mit *Staphylococcus epidermidis* nach Implantation mit Gentamicin-haltigem PMMA-Knochenzement beschrieben. Bei Auftreten einer Infektion fand sich bei 88% der Bakterien nach Gebrauch von Gentamicin-Knochenzement eine Gentamicinresistenz, wohin gegen lediglich 16% der Keime nach Implantation des wirkstofffreien Zementes eine derartige Resistenz aufwies.

Auch in anderen Studien konnte eine Resistenzentwicklung nach Verwendung des Gentamicin-haltigen Zementes nachgewiesen werden. So bei einer Studie von Sanzen und Walder (1988), die vor und nach Implantation einer zementierten Prothese mit und ohne Antibiotikagehalt Hautabstriche entnahmen und somit feststellten, dass in der Patientengruppe, in der Gentamicin-Knochenzement verwendet wurde nachher Resistenzen auftraten. Dabei kam es in 20% der Fälle zu einem Neuauftreten der Staphylokokkenunempfindlichkeit gegenüber Gentamicin.

In einer neueren Studie von Anguita-Alonso et al. (2004) wurde an 93 Patienten das Auftreten von Resistenzen bei Verwendung von Gentamicin- bzw. Tobramycin-haltigem Knochenzement untersucht. Bei prinzipiell hoher Rate an Resistenzen gegenüber Gentamicin und Tobramycin bei den Protheseninfektionen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsgruppe mit Antibiotikazement und der Kontrollgruppe ohne Antibiotikazusatz zum Knochenzement gefunden werden. Daraus kann geschlossen werden, dass es in dieser Studie zu keiner deutlichen Erhöhung der Resistenzentwicklung gegenüber den verwendeten Wirkstoffen bei der Primärimplantation der Prothesen kam.

Wie bereits zuvor beschrieben wird die prolongierte Freisetzung des jeweiligen Antibiotikums aus dem Knochenzement für die Entstehung von Resistenzen

verantwortlich gemacht (Kendall et al., 1995, Kendall et al., 1996, van de Belt et al., 2001, Thomes et al., 2002, Neut et al., 2003, Ramage et al., 2003). In dieser Arbeit zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede bezüglich der Freisetzungskinetik aus der Beschichtung der K-Drähte gegenüber der aus Knochenzement. Da in der vorliegenden Studie bereits 95 bzw. 99% des Gentamicins innerhalb der ersten 12 bis 24 Stunden freigesetzt wird, kann vermutet werden, dass durch diesen initialen „Stoss“ an Antibiotikaabgabe spätere prolongierte Freisetzungen mit subinhibitorischen Spiegeln, die hauptsächlich die Ursache für Resistenzentwicklungen darstellen, hierbei nicht auftreten. Jedoch liegen zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei nähere Informationen diesbezüglich vor. Diese Thematik sollte in Zukunft Gegenstand weiterführender experimenteller Studien sein.

Eine weitere Tatsache, die es zu erwähnen gilt ist die Toxizität des Antibiotikums bei der Durchführung einer Antibiotikaprophylaxe zur Infektionsvermeidung in der Endoprothetik. Bei der lokalen Antibiotikaprophylaxe gelangt der Wirkstoff direkt vom Implantationsort in das umliegende Gewebe, wo es seine volle Wirkung entfalten kann. Nur geringe Mengen gelangen in die Körperflüssigkeiten und von dort in andere Gewebe oder Organe, so dass bei dieser Applikationsart sehr geringe Serumspiegel des Antibiotikums zu finden sind, welches die Auswirkungen zumindest der systemischen Toxizität deutlich beeinflusst (Strauß, 1999). Die Toxizitätsgefahr beschränkt sich somit auf die unmittelbare Umgebung des Implantates. Wahlig und Dingeldein (1980) sowie Jiranek et al. (2006) konnten in ihren Untersuchungen ein geringes Risiko für die Entstehung systemischer Komplikationen bei der lokalen Antibiotikaprophylaxe nachweisen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Testung der antimikrobiellen Wirksamkeit von HA-Gentamicin- und HA-RGD-Gentamicin-beschichteten Implantaten im Vergleich zu einer reinen HA-Beschichtung an einem Kanincheninfektionsprophylaxemodell. Der intramedulläre Tibiamarkkanal der Tiere wurde während der K-Draht-Implantation mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Dabei wurde im Rahmen einer Pilotstudie eine Keimmenge von  $10^7$  KBE des *Staphylococcus aureus*-Stammes EDCC 5055 als Inokulationsdosis für die Hauptstudie gewählt.

In der Hauptstudie zeigten sich nach einer Beobachtungsdauer von 4 Wochen keinerlei Zeichen einer Infektion bei insgesamt 19 getesteten Tieren mit Gentamicin-HA- bzw. Gentamicin-HA-RGD-Implantat, während sich in der Kontrollgruppe mit Gentamicin-freien HA-beschichteten K-Drähten in 88% der Fälle (7 von 8 Tieren) eine Implantat-assoziierte Infektion entwickelte.

Somit zeigte sich eine signifikante Reduktion der Infektionsrate bei allen Tieren der Versuchsgruppen mit Gentamicin-beschichteten K-Drähten ( $p < 0,001$ ).

Es fand sich eine ausgezeichnete Korrelation der Ergebnisse der klinischen, radiologischen und histologischen Untersuchungen verglichen mit den mikrobiologischen Resultaten. Mittels Durchführung einer Pulsfeld-Gel-Elektrophorese konnte in allen Fällen bei Infektion der inokulierte *Staphylococcus aureus* EDCC 5055 als Infekt-auslösender Keim nachgewiesen und somit eine Kontamination ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend wurde für beide Gentamicinbeschichtungen eine hervorragende antimikrobielle Wirksamkeit in dem vorgestellten Infektionsprophylaxemodell nachgewiesen.

## 6 SUMMARY

The purpose of this study was to test the antimicrobial activity of gentamicin-HA and gentamicin-HA-RGD-coatings compared to HA-coated implants in a rabbit model.

The intramedullary tibia canal was contaminated with *Staphylococcus aureus*. The pilot study determined an inoculation dose of  $10^7$  CFUs of the used *Staphylococcus aureus* EDCC 5055 for the main study.

None of the 19 animals that received a gentamicin-HA- or a gentamicin-HA-RGD-K-wire showed any signs of infection whereas infection occurred in 88% (7 of 8) of the rabbits with pure HA-implants after an observation period of 4 weeks in the main study.

This was related to a highly statistically significant difference between both gentamicin coatings and the HA-group ( $p < 0,001$ ).

There was a very good correlation of the clinical, radiological and histological findings compared with the microbiological results.

With use of pulse-field gel electrophoresis the previously inoculated *Staphylococcus aureus* EDCC 5055 could be identified in all cases of infection so that potential contamination issues could be excluded.

In summary, a very good antimicrobial activity of the two gentamicin coatings implants could be demonstrated in the used rabbit infection prophylaxis model.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Adler CP. Knochenkrankheiten. Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts. Thieme, Stuttgart. S.106-108, 1983.

Alt V, Schnettler R. Infektionen. In: Wirth C, Mutschler W, Hrsg. Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie. Thieme, Stuttgart. S.170-182, 2007.

Anguita-Alonso P, Hanssen AD, Osmon DR, Trampuz A, Steckelberg JM, Patel R. High rate of aminoglycoside resistance among staphylococci causing prosthetic joint infection. *Clinical Orthopaedic and Related Research* 2005; 439: 43-47.

Atkins B, Athanasou N, Deeks J, Crook D, Simpson H, Peto T, McLardySmith P, Berendt A, the Osiris Collaborative Study Group. Prospective Evaluation of Criteria for Microbiological Diagnosis of Prosthetic-Joint Infection at Revision Arthroplasty. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36: 2932-2939.

Auclair-Daigle C, Bureau MN, Legoux JG, Yahia LH. Bioactive hydroxyapatite coatings on polymer composites for orthopedic implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2005; 73: 398-408.

Bannister G. Prevention of infection in joint replacement. *Current Orthopaedics* 2002; 16: 426-433.

Becker K. Diagnostik von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämmen Teil 1. *Mikrobiologie* 2004; 14: 7-18.

Bloebaum RD, Beeks D, Dorr LD, Savory CG, DuPont JA, Hofmann AA. Complications with hydroxyapatite particulate separation. In: total hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1994; 298: 19-26.

Bratzler DW, Houck PM. Antimicrobial prophylaxis for surgery. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 38: 1706-1715.

Breusch SJ, Aldinger PR, Thomsen M, Ewerbeck V, Lukoschek M. Verankerungsprinzipien in der Hüftendoprothetik-Teil I: Prothesenstiel. *Der Unfallchirurg* 2000; 103: 918-931.

Buchholz HW, Engelbrecht H. Über die Depotwirkung einiger Antibiotika bei Vermischung mit dem Kunstharz Palacos. *Der Chirurg* 1970; 40: 511-515.

Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung: [www.bib-demographie.de/index2.html](http://www.bib-demographie.de/index2.html). vom 25.10.2008.

Campbell AA, Song L, Li XS, Nelson BJ, Bottoni C, Brooks DE et al.. Development, characterization and anti-microbial efficacy of hydroxyapatite-chlorhexidine coatings produced by surface-induced mineralization. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000; 53: 400-407.

Chiu FY, Lin CF, Chen CM, Lo WH, Chaung TY. Cefuroxime-impregnated cement at primary total knee arthroplasty in diabetes mellitus. A prospective, randomised study. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 2001; 83: 691-695.

Chiu FY, Chen CM, Lin CFJ, Lo WH . Cefuroxime-Impregnated Cement in Primary Total Knee Arthroplasty – A Prospective, Randomized Study of Three Hundred and Forty Knees. *Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 2002; 84: 759-761.

Classen DC, Evans RS, Pestotnik SL, Horn SD, Menlove RL, Burke JP. The timing of prophylactic administration of antibiotics and the risk of surgical-wound infection. *The New England Journal of Medicine* 1992; 326: 281-286.

Claus H, Cuny C, Pasemann B, Witte W. Ein Datenbanksystem für Fragmentmuster der genomischen DNS von *Staphylococcus aureus*. *Bundesgesundheitsblatt* 1996; 39: 68-74.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.

Costerton JW. Biofilm Theory Can Guide the Treatment of Device-Related Orthopaedic Infections. *Clinical Orthopaedic and Related Research* 2005; 437: 7-11.

Daschner F. *Antibiotika am Krankenbett*. 11. Auflage, Springer, Berlin. S.87-88, 2002.

Darouiche RO, Mansouri MD, Zakarevicz D, Alsharif A, Landon GC. In Vivo Efficacy of Antimicrobial-Coated Devices. *Journal of Bone Joint Surgery. American Volume* 2007; 89: 792-797.

Domann E, Hong G, Imirzalioglu C, Turschner S, Kühle J, Watzel C, Hain T, Hossain H, Chakraborty T. Culture-Independent Identification of Pathogenic Bacteria and Polymicrobial Infections in the Genitourinary Tract of Renal Transplant Recipients. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 5500-10.

Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology* 1982; 11: 318-326.

Effenberger H. Zementfreie Standard-Schaftimplantate. In: Jerosch J, Effenberger H, Fuchs S Hrsg. *Hüftendoprothetik*. Thieme, Stuttgart. S.32-36, 1996.

Ellington JK, Harris M, Webb L, Smith B, Smith T, Tan K, Hudson M. Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. *Journal of Bone Joint Surgery. British Volume* 2003; 85: 918-921.

Elmengaard B, Bechtold JE, Søballe K. In vivo effects of RGD-coated titanium implants inserted in two bone-gap models. *Journal of Biomedical Materials Research A* 2005; 75: 249-255.

Engesæter LB, Stein AL, Espehaug B, Furnes O, Vollset SE, Havelin LI. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. *Acta Orthopaedia Scandinavica* 2003; 74: 644-651.

Engeseater LB, Espehaug B, Lie SA, Furnes O, Havelin LI. Does cement increase the risk of infection in primary total hip arthroplasty? Revision rates in 56.275 cemented and uncemented primary THAs followed for 0–16 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 2006; 77: 351-358.

Espehaug B, Engesaeter LB, Vollset SE, Havelin LI, Langeland N. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Review of 10905 primary cemented total hip replacements reported to the Norwegian Arthroplasty Register, 1987-1995. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume* 1997; 79: 590-595.

Ewing JW. Arthroscopic treatment of degenerative meniscal lesions and early degenerative arthritis of the knee. In: Ewing JW Hrsg, *Articular Cartilage and Knee Joint Function. Basic Science and Arthroscopy*, Raven Press, New York. S.137-145, 1990.

Fisman DN, Reilly DT, Karchmer AW, Goldie SJ. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 32: 419-430.

Fishman NO, Brennan PJ. Optimizing use of antimicrobial agents: pitfalls and consequences of inappropriate therapy. *Journal of Clinical Outcome Management* 1997; 4: 25-33.

Georgiade NG, Hanker J, Ruff G, Levin S. The use of particulate Hydroxyapatite and plaster of Paris in aesthetic and reconstructive surgery. *Aesthetic Plastic Surgery* 1993; 17: 85-92.

Gradinger R, Hecht H, Gollwitzer H. Degenerative Erkrankungen. Koxarthrose. In: Wirt CJ und Mutschler W. *Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie*. Thieme, Stuttgart. S.601-606, 2007.

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

Gristina AG, Naylor PT, Webb LX. Molecular mechanisms in musculoskeletal sepsis: The race for the surface. In: Greene, W.B. Hrsg: AAOS Instructional Course Lecture XXXIX. Park Ridge, IL, USA. S.471-482, 1990.

Grundeis H. Geschichtliche Entwicklung der Endoprothetik und der Fixation durch Spongiosa-Metal. In: Gradinger R, Gollwitzer H. Ossäre Integration. Springer, Berlin. S.2-13, 2006.

Hansis M, Arens S. Pathophysiologie der postoperativen Infektentstehung an Knochen und Weichteilen. *Aktuelle Traumatologie*. S.183-191, 1996.

Hanssen AD, Osmon DR, Nelson CL. Prevention of deep periprosthetic joint infection. *Instructional Course Lectures* 1997; 46: 555-567.

Hanssen AD, Rand JA. Evaluation and treatment of infection at a site of a total hip or knee arthroplasty. *Instructional Course Lectures* 1999; 48: 111-122.

Heck D, Rosenberg A, Schink-Ascani M, Garbus S, Kiewitt T. Use of antibiotic-impregnated cement during hip and knee arthroplasty in the United States. *Journal of Arthroplasty* 1995; 10: 470-475.

Hirner A, Weise K. *Chirurgie-Schnitt für Schnitt*. Thieme, Stuttgart. S.356-365, 2004.

Jiranek WA, Hanssen AD, Greenwald AS. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *Journal of Bone Joint Surgery. American Volume* 2006; 88: 2487-2500.

Josefsson G, Kolmert L. Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamicin-loaded bone cement in total hip arthroplasty : a ten-year survey of 1.668 hips. *Clinical Orthopaedic and Related Research* 1993; 292: 210-214.

Kantlehner M, Finsinger D, Meyer J, Schaffner P, Jonczyk A, Diefenbach B, Nies B, Kessler H. Selective RGD-Mediated Adhesion of Osteoblasts at Surfaces of Implants. *Angewandte Chemie International Edition* 1999; 38: 560.

Kantlehner M, Schaffner P, Finsinger D, Meyer J, Jonczyk A, Diefenbach D, et al.. Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chemistry Biochemistry* 2000; 18: 107-114.

Karow T, Lang-Roth R. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 15.Auflage. S.721 ff., 2006.

Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. *Medizinische Mikrobiologie Verstehen-Lernen-Nachschlagen*. 10. komplett überarbeitete Auflage, Thieme, Stuttgart. S. 239-244, S.427-428, 2001.

Källicke T, Kutscha-Lissberg F, Frangen TM, Muhr G, Arens S. Pathophysiologie der posttraumatischen Osteitis. *Der Orthopäde* 2004; 33: 405-411.

Kendall RW, Duncan CP, Beauchamp CP. Bacterial growth on antibiotic-loaded acrylic cement. A prospective in vivo retrieval study. *Journal of Arthroplasty* 1995; 10: 817-822.

Kendall RW, Duncan CP, Smith JA, Ngui-Yen JH. Persistence of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots. A reason for caution. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1996; 329: 273-280.

Krimmer V, Merkert H, von Eiff C, Frosch M, Eulert J, Lühr JF, Hacker J, Ziebuhr W. Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in Clinical Samples by 16S rRNA-Directed In Situ Hybridisation. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 2667-2673.

Kühn KD. Bone Cements-up-to-date comparison of physical and chemical properties of commercial materials. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. S.253-258, 2000.

Lazzarini L, Mader JT, Calhoun JH. Osteomyelitis in Long Bones. Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume 2004; 86: 2305-2318.

Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. Lancet 2004; 364: 369-379.

Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP, et al.. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. Bone 2003; 32: 521-531.

Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Schiller R, Stemberger A, et al.. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. Bone 2005; 36: 770-778.

Lutz W, Qiang R. Determinants of human population growth. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences 2002; 357: 1197-1210.

Mäkelä KT, Eskelinen A, Pulkkinen P, Paavolainen P, Remes V. Total hip arthroplasty for primary osteoarthritis in patients fifty-five years of age or older. An analysis of the Finnish arthroplasty registry. Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume 2008; 90: 2160-2170.

Malaisrie SC, Malekzadeh S, Biedlingmaier JF. *In vivo* analysis of bacterial biofilm formation on facial plastic bioimplants. Laryngoscope 1998; 108: 1733-1738.

Malchau H, Herberts P, Ahnfelt L. Prognosis of total hip replacement in Sweden. Follow-up of 92.675 operations performed 1978-1990. Acta Orthopaedica Scandinavica 1993; 64: 497-506.

Marcelscu CE, Osmon DR. Antibiotic prophylaxis in orthopaedic surgery. *Infectious Disease Clinics of North America* 2005; 19: 931-946.

McQueen M, Littlejohn A, Hughes SP. A comparison of systemic cefuroxime and cefuroxime loaded bone cement in the prevention of early infection after total joint replacement. *International Orthopaedics* 1987; 11: 241-243.

Misbah S, Hassan H, Yusof MY, Hanifah YA, AbuBakar S. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. *Singapore Medical Journal* 2005; 46: 461-464.

Mittelmeier H. Report on the first decennium of clinical experience with a cementless ceramic total hip replacement. *Acta Orthopaedica Belgica* 1985; 51: 367.

Müller M und Mitarbeiter. *Chirurgie für Studium und Praxis*. 7.Auflage, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach. S. 328-330, 2004/05.

Neut D, van der Belt H, Stokroos I, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 47: 885-891.

Neut D, van Horn JR, van Kooten TG, van der Mei HC, Busscher HJ. Detection of biomaterial-associated infections in orthopaedic joint implants. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2003; 413: 261-268.

Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1985; 27: 619-624.

Niethard FU, Pfeil J. *Orthopädie*, 4. Auflage, Thieme, Stuttgart. S.184-190, 2003.

Nijhof MW, Dhert WJA, Fler A, Vogely HC, Verbout AJ. Prophylaxis of implant-related staphylococcal infections using tobramycin-containing bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000; 52: 754-761.

Perry CR, Pearson G, Miller A. Accuracy of cultures of material from swabbing of the superficial aspect of the wound and needle biopsy in the preoperative assessment of osteomyelitis. *Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 1991; 73: 745-749.

Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P. The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 6123-6125.

Povacz F. *Die Geschichte der Unfallchirurgie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. S.27 ff., 2000.

Prevost G, Jaulhac B, Piemont Y. DNA Fingerprinting by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Is More Effective than Ribotyping in Distinguishing among Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30: 967-973.

Puhl W, Niethard FU. Die "Bone and Joint" Dekade 2000-2010. *Zeitschrift für Orthopädie* 1999; 137: 1.

Radin S, Campbell JT, Ducheyne P, Cuckler JM. Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials* 1997; 18: 777-782.

Ramage G, Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR. Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. *Biomaterials* 2003; 24: 3221-3227.

Richter-Hintz D, Rieker J, Rauch L, Horney B. Prothesenunverträglichkeit bei Typ-IVSensibilisierung gegen Knochenzement. *Der Hautarzt* 2004; 55: 987-999.

Robson MC. Infection in the surgical patient: An imbalance in the normal equilibrium. *Clinics in Plastic Surgery* 1979; 6: 493-503.

Rodrigues da Silva Elizabete, da Silva Nivaldo. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2005; 69: 260–264.

Römling U, Fislage R, Tümmler B. Theorie und Anwendung der Makrorestriktionsanalyse für die klonale Analyse von Erregern. *Immunität und Infektion* 1995; 23: 4-8.

Rössler S, Sewing A, Stolzel M, Born R, Scharnweber D, Dard M, Worch H. Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coatings at near-physiological pH and temperature. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2003; 4: 655-663.

Ruchholtz S, Träger G, Nast-Kolb D. Die infizierte Hüftgelenksendoprothese. *Der Unfallchirurg* 2004; 107: 307-317.

Sanzen L, Walder M. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci in an orthopaedic department. *Journal of Hospital Infection* 1988; 12: 103-108.

Schmitz FJ, Geisel R, Ring A, Wagner S, Heinz HP. Molekulare Epidemiologie bei nosokomialen Infektionen-Vergleich verschiedener Typisierungsverfahren. *Clinical Laboratory* 1995; 41: 991-1001.

Schneider D, Richling F. FAKTEN. *Arzneimittel* 2005. Thieme, Stuttgart. S.45, S.49, S.51, 2005.

Schnettler R, Lieser H, Klemm K. Chirurgische Behandlung der posttraumatischen und chronischen Osteomyelitis. *Aktuelle Chirurgie* 1997; 32: 18-22.

Schnettler R, Alt V. Pathophysiologie und Klassifikation der Osteitis. In: Schnettler R, Steinau U. *Septische Knochenchirurgie*. Thieme, Stuttgart. S. 5-14, 2005.

Schwarzkopf A, Cuny C, Witte W. Bestimmung der Fragmentmuster der genomischen DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese bei *Staphylococcus aureus*. Bundesgesundheitsblatt 1995; 6: 215-219.

Sears LE, Moran L, Kissinger C, Creasey T, Perry-O`Keefe H, Roskey M, Sutherland E, Slatko E. CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. Biotechniques 1992;13: 626-33.

Shanbhag A, Yang J, Lilien J, Black J. Decreased neutrophil respiratory burst on exposure to cobalt-chrome alloy and polystyrene in vitro. Journal of Biomedical Materials Research 1992; 26: 185-195.

Shepperd J, Apthorp H. A contemporary snapshot of the use of hydroxyapatite coating in orthopaedic surgery. Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume 2005; 87: 1046-1049.

Sinha B, François PP, Nüsse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5\beta 1$ . Cellular Microbiology 1999; 1: 101-117.

Smabrekke A, Espehaug B, Havelin LI, Furnes O. Operating time and survival of primary total hip replacements: an analysis of 31.745 primary cemented and uncemented total hip replacements from local hospitals reported to the Norwegian Arthroplasty Register 1987-2001. Acta Orthopaedica Scandinavica 2004; 75: 524-532.

Spector M. Charakterisierung biokeramischer Kalziumphosphat-Implantate. Heft Unfallheilkunde 1991; 9: 11-22.

Statistisches Bundesamt. Gesundheitsbericht für Deutschland S.194-199, 1998.

Statistisches Bundesamt. Bevölkerung Deutschlands bis 2050. S.30, 2003.

Stigter M, de Groot K, Layrolle P. Incorporation of tobramycin into biomimetic hydroxyapatite coating on titanium. *Biomaterials* 2002; 23: 4143-4153.

Stigter M, Bezemer J, de Groot K, Layrolle P. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. *Journal of Controlled Release* 2004; 99: 127-137.

Strauß A. Lokaler Antibiotikumträger aus Kalziumsulfat-Verträglichkeit im Gewebe und Pharmakokinetik der angewendeten Antibiotika nach Implantation in Kaninchen. Fachverlag Köhler, Gießen. S.22-23, S.90, 1999.

Sun JS, Lin FH, Hung TY, Tsuang YH, Chang WH, Liu HC. The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 45: 311–321.

Swedish Hip Arthroplasty Register. Annual Report 2009. <http://www.jru.orthop.gu.se> vom 23.07.2009.

Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hébert GA, Hill B, Hollis R, Jarvis WR, Kreiwirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal LK, Miller JM, Mulligan M, Pfaller MA. Comparison of Traditional and Molecular Methods of Typing Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32: 407-415.

Tonino AJ, Romanini L, Rossi P, Borroni M, Greco F, Garcia-Araujo C, Garcia-Dihinx L, Murcia-Mazòn A, Hein W, Anderson J. Hydroxyapatite-coated hip prostheses. Early results from an international study. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1995; 312: 211-225.

Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Medical Weekly* 2005; 135: 243-251.

Tsai CL, Liu TK, Hung MH. Glycocalyx production and adherence of *Staphylococcus* to biomaterials. *Acta Medica Okayama* 1992; 46: 11-16.

van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J, Goering R, Tenover F, Steward C, O'Brian F, Grubb W, Tassios P, Legakis N, Morvan A, Solh N, de Ryck R, Struelens M, Salmenlinna S, Vuopio-Vakila J, Kooistra M, Talens A, Witte W, Verbrugh H. Assessment of Resolution and Intercenter Reproducibility of Results of Genotyping *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *SmaI* Macrorestriction Fragments: A Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36: 1653-1659.

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

von Eiff C, Lindner N, Proctor RA, Winkelmann W, Peters G. Development of gentamicin-resistant small colony variants of *S. aureus* after implantation of gentamicin chains in osteomyelitis as a possible cause of recurrence. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 1998; 136: 268-271.

Wagner C, Kondella K, Bernschneider T, Heppert V, Wentzensen A, Hansch GM. Post-traumatic osteomyelitis: analysis of inflammatory cells recruited into the site of infection. *Shock* 2003; 20: 503-510.

Wahlig H. Antibiotic loaded acrylic cements: Elution properties. Elson R.A. (ed) *Revision arthroplasty 2*. Harrogate Franklin Scientific Publications, London. S.56-63, 1983.

Wahlig H, Dingeldein E. Biomaterialien als Wirkstoffträger für die lokale Anwendung in Chirurgie und Orthopädie. Primär- und Revisionsalloarthroplastik Hüft- und Kniegelenk. Symposium der Endo-Klinik, Springer, Hamburg. S.357-367, 1987.

Willert H, Buchhorn G. Osseointegration of cemented and noncemented implants in artificial hip replacement: long-term findings in man. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* 1999; 9: 113-130.

Willert HG, Lintner F. Morphologie des Implantatlagers bei zementierten und nicht zementierten Gelenkimplantaten. *Langenbecks Archiv für Chirurgie* 1987; 372: 447–445.

Witte W, Cuny C, Zimmermann O, Rüchel R, Höpken M, Fischer R, Wagner S. Stability of genomic DNA fragment patterns in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) during the course of intra- and interhospital spread. *European Journal of Epidemiology* 1994; 10: 743-748.

[www.bqs.qualitätsindikatoren.de/2007/](http://www.bqs.qualitätsindikatoren.de/2007/) vom 01.03.2009

[www.topac.com/spiralplater.html](http://www.topac.com/spiralplater.html) vom 09.12.2009.

Zimmerli W, Lew PD, Waldvogel FA. Pathogenesis of foreign body infections: evidence for local granulocyte defect. *Journal of Clinical Investigation* 1984; 73: 1191-1200.

## 8 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

### 8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Erreger von Protheseninfektionen	8
Tabelle 2:	Studiendesign und Anzahl der Tiere für die Pilotstudie	29
Tabelle 3:	Studiendesign und Anzahl der Tiere für die Hauptstudie	30
Tabelle 4:	Farbtabelle zur Identifizierung von Bakterien	44
Tabelle 5:	Entzündungszeichen und Gewichtsentwicklung in der Pilotstudie	56
Tabelle 6:	Klinische Ergebnisse der Pilotstudie	57
Tabelle 7:	Gewichtsabnahme der Tiere in der Pilotstudie	57
Tabelle 8:	Keimnachweis im Knochen in Abhängigkeit der Inokulationsdosis	59
Tabelle 9:	Keimnachweis auf explantierten K-Drähten in Abhängigkeit der Inokulationsdosis	61
Tabelle 10:	Klinische und radiologische Infektzeichen in der Hauptstudie	64
Tabelle 11:	Klinische Ergebnisse der Hauptstudie	65
Tabelle 12:	Gewichtsabnahme der Tiere in der Hauptstudie	65
Tabelle 13:	Röntgenologische Ergebnisse der Hauptstudie	65
Tabelle 14:	Keimnachweis im Knochen und auf K-Drähten in der Hauptstudie	68

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Demographische Entwicklung in Deutschland	2
Abbildung 2: Röntgenbild eines Hüftgelenks, posterior-anterior Strahlengang	3
Abbildung 3: Strukturformel RGD	6
Abbildung 4: Knochen-Implantat-Interface	7
Abbildung 5: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für zementierte Hüftendoprothesen in Norwegen zwischen 1987-2001	12
Abbildung 6: Gesamtrate perioperativer Antibiotikaprophylaxe von 2004-2007	13
Abbildung 7: Überlebensraten von Hüftprothesen aus dem Norwegischen Hüftprothesenregister in Abhängigkeit der Häufigkeit und Länge der systemischen Antibiotikagabe	15
Abbildung 8: Überlebensraten von Hüftprothesen aus dem Norwegischen Hüftprothesenregister ohne Antibiotikaprophylaxe, mit systemischer Antibiose, mit antibiotikabeladenem Knochenzement oder einer Kombination aus systemischer und lokaler Antibiose mit antibiotikabeladenem Knochenzement	18
Abbildung 9: Strukturformel des Antibiotikums Gentamicin	21
Abbildung 10: Hydroxylapatitbeschichtung	24
Abbildung 11: Strukturformel Phosphonatpeptid	25
Abbildung 12: Industrieroboter zum Aufbringen einer Gentamicinbeschichtung	26
Abbildung 13: Freisetzungskinetik der Gentamicinbeschichtung	27
Abbildung 14: K-Drähte mit unterschiedlichen Beschichtungen	28
Abbildung 15: Spiral Bacterial Plater	31
Abbildung 16: OP-Methodik zur Implantation der beschichteten K-Drähte und Inokulation der Bakterien	34
Abbildung 17: Postoperative Röntgenkontrolle nach K-Draht Implantation	35
Abbildung 18: Gespaltene Tibia nach Entfernung des K-Drahts	38
Abbildung 19: Technik zum Bakteriennachweis in den Knochenproben	41
Abbildung 20: Klinische Infektzeichen, HA- vs. HA-Gentamicin-Versuchstier	57
Abbildung 21: Vergleich der Agarplattenbesiedlung, HA- vs. HA-Gentamicin	59
Abbildung 22: Röntgenologische Ergebnisse der Hauptstudie	65
Abbildung 23: Agarplatteninkubation eines Tieres der HA-Gruppe	68
Abbildung 24: Agarplatteninkubation eines Tieres der HA-Gentamicin-Gruppe	68

Abbildung 25: Bandenmuster der Pulsfeldgelelektrophorese	69
Abbildung 26: Vergleich der histologischen Ergebnisse zwischen HA- und HA-Gentamicin-Gruppe	71
Abbildung 27: Knochenmarknekrose bei einem Tier der HA-Gruppe	71
Abbildung 28: Knochenneubildung bei einem Tier der HA-Gentamicin-Gruppe	72

## 9 PUBLIKATION

Alt V, Bitschnau A, Osterling J, Sewing A, Meyer C, Kraus R, Meissner SA, Wenisch S, Domann E, Schnettler R: The effects of combined gentamicin–hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials* 2006; 27: 4627-4634.

**10 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.

*(Ort, Datum)*

*(Unterschrift)*

## 11 DANKSAGUNG

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, bei denen ich mich von ganzem Herzen bedanken möchte.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Dr. Volker Alt bedanken. Durch seine Hilfe und Beratung hat er einen großen Anteil an der vorliegenden Arbeit. Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler für die Überlassung des Themas.

Auch bei dem Team des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie in Gießen möchte ich mich für die nette, hilfreiche Unterstützung und Betreuung bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt auch den Ärzten, Tierpflegern und Helfern der Tierklinik Bad Langensalza, die die Durchführung dieser Studie erst ermöglicht haben.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Ulrich Egert für die umgehende und zuverlässige Lösung meiner Computerprobleme und auch allgemein für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Zum Schluss geht mein größter Dank an meine Familie, die mich mein ganzes Studium lang in jeder Hinsicht unterstützt hat und immer für mich da war.

Meiner Mutter ist diese Arbeit in größter Dankbarkeit gewidmet.