

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
Universitätsmedizin Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. habil. Wolfram Mittelmeier

**Optimierung eines ossären Infektmodells zur tierexperimentellen
Untersuchung antimikrobieller Oberflächen in der Prophylaxe
Implantat-assoziiertes Infektionen**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät, Universitätsmedizin Rostock
vorgelegt von

Anika Vetter
geboren in Groß-Gerau

Rostock 2013

Dekan:

Prof. Dr.med. Emil Christian Reisinger

Gutachter:

1. Gutachter: *Prof. Dr. med. habil. Dipl.-Ing. Rainer Bader*
Forschungslabor für Biomechanik und Implantattechnologie,
Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: *Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski*
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene,
Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: *PD Dr. med. Hans Gollwitzer, CCRP*
Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie
Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

Datum der Einreichung: 27.08.2012

Datum der Verteidigung: 26.06.2013

Meinen Eltern

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Implantat-assoziierte Infektionen	7
1.1.1 Epidemiologische und gesundheitsökonomische Daten	7
1.1.2 Prädisponierende Faktoren und Klassifikation	8
1.1.3 Pathophysiologie	9
1.1.4 Klinik, Diagnostik und Therapie	13
1.2 Maßnahmen zur Vorbeugung Implantat-assoziiierter Infektionen	16
1.2.1 Allgemeine Prophylaxemaßnahmen	16
1.2.2 Oberflächenmodifikation	17
1.3 Überblick über Tiermodelle zur experimentellen Untersuchung der Implantat-assoziierten Infektion	23
1.4 Aufgabenstellung	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Intramedulläres Infektionsmodell zur Untersuchung einer antimikrobiellen Oberflächenbeschichtung	30
2.1.1 Material	30
2.1.2 Methoden	31
2.2 Entwicklung eines metaphysären Infektionsmodells	40
2.2.1 Material	40
2.2.2 Methoden	42
2.3 Statistische Analysen	48
3 Ergebnisse	49
3.1 Intramedulläres Infektionsmodell	49
3.1.1 Ergebnisse der Versuchsgruppen I – V	49
3.1.2 Ergebnisse der Versuchsgruppen VI – IX	59
3.2 Metaphysäres Infektionsmodell	61
4 Diskussion	75
4.1 Intramedulläres Infektionsmodell	75
4.1.1 Diskussion der Methodik	75
4.1.2 Diskussion der Ergebnisse	78
4.2 Metaphysäres Infektionsmodell	83
4.2.1 Diskussion der Methodik	83
4.2.2 Diskussion der Ergebnisse	85

4.3	Ausblick	88
5	Zusammenfassung	92
6	Literaturverzeichnis	94
7	Abbildungsverzeichnis	94
8	Tabellenverzeichnis	106
	Lebenslauf	107
	Selbstständigkeitserklärung	108
	Danksagung	109
	Thesen	110

Abkürzungsverzeichnis

Ag ⁺	-	Silber
BHI	-	<i>engl.</i> : Brain Heart Infusion: Herz-Hirn-Bouillon
BSG	-	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	-	beziehungsweise
CO ₂	-	Kohlendioxid
CRP	-	C-reaktives Protein
CSB	-	Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon
CT	-	Computertomographie
Cu ²⁺	-	Kupfer
Cu-TiO ₂	-	Kupfer-Titanoxid
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
et al.	-	<i>lat.</i> : et alii / et aliae / et alia: und andere (in den verwendeten Zusammenhängen: und Mitautoren)
FDG-PET	-	Fluor-18-Desoxyglucose-Positronenemissionstomographie
FFA	-	Film-Fokus-Abstand
FISH	-	Fluoreszenz – In Situ – Hybridisierung
Hg ⁺	-	Quecksilber
HIV-1	-	Humanes Immundefizienz Virus 1
H ₂ O ₂	-	Wasserstoffperoxid
KBE	-	Kolonie-bildende Einheiten
KG	-	Körpergewicht
MIC	-	<i>engl.</i> : minimal inhibitory concentration: minimalen Hemmkonzentration
MMA	-	Methylmethacrylat
MRSA	-	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i> – Stamm
MRSE	-	Methicillin-resistenter <i>S. epidermidis</i> – Stamm
MRT	-	Magnetresonanztomographie
OD	-	optische Dichte
PBS	-	<i>engl.</i> : phosphate buffered saline: phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	-	<i>engl.</i> : polymerase chain reaction: Polymerasekettenreaktion
PMMA	-	Polymethylmethacrylat
REM	-	Rasterelektronenmikroskopie
S.	-	Staphylococcus
spp.	-	Subspecies
TiAl6V4	-	Titan-Aluminium-6-Vanadium-4-Legierung
u.a.	-	unter anderem
U/min	-	Umdrehungen pro Minute
vgl.	-	vergleiche
VRE	-	Vancomycin-resistente Enterokokken

1 Einleitung

1.1 Implantat-assoziierte Infektionen

Künstliche Materialien wie Katheter, Koronarstents, Gefäß- oder Endoprothesen werden heute routinemäßig in der modernen Medizin eingesetzt und sind ein wichtiger und fester Bestandteil im Berufsleben eines Arztes geworden. Die Implantation von künstlichen Gelenken und Osteosynthesematerialien hat die Behandlung orthopädischer und traumatologischer Krankheitsbilder revolutioniert und trägt weltweit einen großen Teil zur Schmerzreduktion und Wiedererlangung der Lebensqualität vieler Patienten bei (Zucker et al. 2008).

Trotz des routinemäßigen Einsatzes von Gelenkendoprothesen und anderer Biomaterialien gibt es noch zahlreiche ungelöste Probleme. Eine mangelhafte Verankerung des Implantates in den Organismus und die Implantat-assoziierte Infektion stellen bis heute klinisch relevante Komplikationen dar, die den uneingeschränkten Einsatz körperfremder Materialien limitieren (Gristina et al. 1991). Zwar ist die aseptische Implantat-Lockerung als Hauptindikation für einen Revisionseingriff anzusehen (Bader et al. 2006; Zucker et al. 2008; Bozic et al. 2009; Militz et al. 2010), jedoch ist auch die Implantat-assoziierte Infektion aufgrund der diagnostischen und therapeutischen Komplexität, der partiellen Resistenz gegenüber antimikrobiellen Therapien (Gristina et al. 1985, 1991), der starken Belastung für den Patienten und einer erhöhten Sterblichkeit von entscheidender Bedeutung (Gollwitzer et al. 2006a; Laffer et al. 2006).

1.1.1 Epidemiologische und gesundheitsökonomische Daten

In Deutschland wurden im Jahr 2010 etwa 220.000 primäre Hüftendoprothesen-, circa 160.000 primäre Knieendoprothesen-Implantationen sowie rund 62.000 Revisionsoperationen von Hüft- oder Knie-Totalendoprothesen durchgeführt. Des Weiteren wurden etwa 20.000 endoprothetische Operationen an der oberen Extremität dokumentiert, in denen sowohl primäre Endoprothesen-Implantationen, als auch Revisionsoperationen sowie Endoprothesen-Entfernungen inbegriffen sind (Statistisches Bundesamt 2011).

Angaben zu Fallzahlen, Risikostruktur und Raten an postoperativen Wund- und/oder Gelenkinfektionen nach endoprothetischem Ersatz sind abhängig von den jeweiligen Beurteilungskriterien, postoperativen Beobachtungszeiträumen und unterschiedlichen Patientenkollektiven. In der internationalen Literatur existieren unterschiedliche Angaben über Inzidenzen Implantat-assoziiertes Infektionen, generell wird von einer Infektionshäufigkeit von 0,5-2 % nach primärer Hüft- oder Knieendoprothesen-Implantation ausgegangen (Lidgren 2001; Geipel et al. 2004; Militz et al. 2010). In Risikokollektiven oder nach Revisionseingriffen können diese Raten jedoch deutlich höher liegen (Geipel et al. 2004; Gollwitzer et al. 2006a; Militz et al. 2010). Bei der Reimplantation nach periprothetischer Osteitis werden Infektionsraten von 15-20% beschrieben (Militz et al. 2010).

In den vergangenen Jahren konnten die Infektionsraten, welche in den späten sechziger Jahren noch bei 5-10% lagen, durch die Einführung prophylaktischer Maßnahmen deutlich gesenkt werden (Lidgren 2001). Aufgrund der steten Zunahme an primären Endoprothesenimplantationen und

Revisionsoperationen stellt die Infektion dennoch ein bedeutsames Problem in der Endoprothetik dar (Kurtz et al. 2007). Hochrechnungen zufolge erhöhen sich die Zahlen für primäre Hüft-Endoprothesenimplantationen in den USA bis 2030 um 174 %, die für primäre Knie-Endoprothesenimplantationen sogar um 673 %. Die Anzahl der jährlich anfallenden Hüft-Revisionsoperationen wird sich voraussichtlich bis 2026 verdoppelt haben; für Revisionsoperationen am Knie schätzt man diesen Zeitpunkt bereits auf das Jahr 2015 (Kurtz et al. 2007). Bedeutsam in diesem Zusammenhang ist ebenfalls das erhöhte Mortalitätsrisiko. Im Jahr 2008 verstarben 1,3 % der Patienten im Rahmen einer Hüftendoprothesen-Wechseloperation (Boy et al. 2008a), für Knie-endoprothesen-Wechsel wurde eine Letalität von 0,2 % verzeichnet (Boy et al. 2008b).

Für das Gesundheitssystem stellt die Implantat-assoziierte Infektion ebenfalls eine große Belastung dar. In den USA schätzt man die Kosten für die medizinische und chirurgische Therapie einer Implantat-assoziierten Infektion auf 30.000 US-Dollar für Endoprothesen, bzw. auf 15.000 US-Dollar für Osteosynthesematerialien (Darouiche 2004). Somit entstehen hochgerechnet auf ein Jahr 1,8 Mrd. US-Dollar Kosten durch Implantat-assoziierte Infektionen. Hierbei sind zusätzlich entstehende Belastungen durch Arbeitsausfall und Rentenversicherung noch nicht berücksichtigt (Darouiche 2004). In Deutschland kommt es für die Krankenhäuser zusätzlich zu finanziellen Defiziten, da die Kosten für eine Behandlung periprothetischer Infektionen nicht ausreichend vergütet werden (Militz et al. 2010). Durch die Therapie septischer Hüftendoprothesen entstehen Defizite von bis zu 11.000 €, bei Revisionsoperationen am Knie liegen die Ausfälle bei 4.000 €. Gründe hierfür werden sowohl in den teureren Revisionsimplantaten, als auch in kostenintensiven Antibiotikatherapien, insbesondere für resistente Keime, gesehen (Militz et al. 2010).

Ein nicht weniger bedeutsamer Aspekt der Implantat-assoziierten Infektion ist die psychosoziale Belastung des Patienten durch dauerhafte Schmerzen, Funktionseinschränkungen im betroffenen Gelenk und eine langwierige Therapie, die mit wiederholten Krankenhausaufenthalten und mehrmaligen operativen Eingriffen verbunden ist. Weitere Probleme durch Invalidität, Verlust des Arbeitsplatzes und Desintegration im sozialen Umfeld der Familie, Freunde und Kollegen können den Patienten zusätzlich belasten (Arens et al. 2001).

1.1.2 Prädisponierende Faktoren und Klassifikation

Der Allgemeinzustand des Patienten hat entscheidenden Einfluss sowohl auf den Verlauf der Erkrankung, als auch auf den Umfang des therapeutischen Procedere und das spätere klinische Outcome. Es konnte gezeigt werden, dass Multimorbidität und lokale Komplikationen sowohl mit dem funktionellen Ergebnis nach Therapie, als auch mit dem Risiko für Blutungen, Sepsis und Tod korrelieren (Cierny et al. 2002; McPherson et al. 2002). Als Risikofaktoren konnten neben Immunsuppression, Diabetes mellitus, rheumatoider Arthritis und malignen Erkrankungen, auch ein Alter über 80 Jahren sowie chronischer Alkohol- und Nikotinabusus ermittelt werden. Den lokalen Befund betreffend gelten ausgedehnte, präoperative Gewebeschäden, Weichteilverletzungen und Erkrankungen des Lymph- und Gefäßsystems (McPherson et al. 2002) sowie postoperative Wundinfektionen als prognostisch ungünstig (Berbari et al. 1998).

Um im Vorfeld bereits Einschätzungen über Erregerspektrum und Prognose treffen zu können, werden die Implantat-assoziierten Infektionen in drei Untergruppen eingeteilt. In der Literatur

existieren unterschiedliche Klassifikationssysteme, die sich im Wesentlichen durch die genaue Definition der jeweiligen Zeitintervalle nach der Operation unterscheiden (Zimmerli et al. 2003; Geipel et al. 2004; Laffer et al. 2006; Anagnostakos et al. 2009; Del Pozo et al. 2009; Militz et al. 2010).

Zusammenfassend können die periprothetischen Infektionen in „Frühinfektionen“, „Verzögerte Infektionen“ und „Spätinfektionen“ eingeteilt werden:

Frühinfektionen manifestieren sich in einem postoperativen Zeitintervall von maximal drei Monaten (Zimmerli et al. 2003; Laffer et al. 2006; Anagnostakos et al. 2009; Del Pozo et al. 2009). Von einigen Autoren werden auch kürzere Intervalle von 3 bis 6 Wochen angegeben (Geipel et al. 2004; Anagnostakos et al. 2009; Militz et al. 2010). Dieser Infektionstyp ist in der Regel durch eine intraoperative Kontamination des Operationssitus oder des Implantates mit virulenten Keimen gekennzeichnet (Zimmerli et al. 2003; Geipel et al. 2004; Laffer et al. 2006; Anagnostakos et al. 2009; Del Pozo et al. 2009). Eine Infektion durch tiefe Wundheilungsstörungen oder kontaminierte Hämatome ist ebenfalls möglich. Des Weiteren kann eine hämatogene Einschwemmung von Bakterien als Auslöser einer frühen Implantat-assoziierten Infektion angesehen werden. Hierbei spielen vor allem perioperative Harnwegsinfekte als Fokus eine Rolle (Zimmerli et al. 2003).

Verzögerte Infektionen manifestieren sich in einem Zeitraum von bis zu zwei Jahren nach der Operation (Zimmerli et al. 2003; Anagnostakos et al. 2009). Auch hier beschreiben einige Autoren kürzere Zeitintervalle von bis zu einem Jahr (Geipel et al. 2004). Es wird davon ausgegangen, dass dieser Infektionstyp durch weniger virulente Keime verursacht wird, welche während der Implantation an die Endoprothese oder in das umliegende Gewebe gelangen (Zimmerli et al. 2003; Geipel et al. 2004; Laffer et al. 2006; Lohmann et al. 2008; Anagnostakos et al. 2009; Del Pozo et al. 2009). Diese Infektionen werden im Allgemeinen als low-grade-Infektionen bezeichnet und können klinisch inapparent erscheinen (Lohmann et al. 2008; Del Pozo et al. 2009). Meist ist eine frühzeitige Implantatlockerung ein erstes Hinweiszeichen (Zimmerli et al. 2003; Del Pozo et al. 2009).

Dem Spättyp werden alle Infektionen zugeordnet, welche nach einem (Geipel et al. 2004), bzw. zwei Jahren postoperativ auftreten (Zimmerli et al. 2003; Laffer et al. 2006; Anagnostakos et al. 2009). Diese Infektionen sind vor allem durch eine hämatogene Aussaat des Erregers bedingt, wobei diverse Keime der Hautflora, des Oropharynx oder des Urogenital- und Intestinaltraktes als Infektionsquelle in Frage kommen (Zimmerli et al. 2003; Geipel et al. 2004). Klinisch manifestieren sich Spätinfektionen entweder im Rahmen einer Septikämie oder eher subakut ohne Zeichen einer Sepsis infolge einer asymptomatischen Bakteriämie (Zimmerli et al. 2003; Laffer et al. 2006).

1.1.3 Pathophysiologie

Wie bereits in den epidemiologischen Daten dargestellt, wird man zukünftig nicht nur mit steigenden Implantations- und auch Infektionszahlen, sondern aufgrund des demographischen Wandels auch mit immer komplexeren Ausgangssituationen, bedingt durch ein steigendes Patientenalter und die damit verbundene Zunahme an Multimorbidität, konfrontiert werden (Zucker et al. 2008). Somit gewinnen effektive Behandlungsmöglichkeiten und mehr noch der gezielte Versuch, die Infektionen im Vorfeld bereits zu verhindern, zunehmend an Bedeutung. Um adäquate Therapie- und Prophylaxestrategien zu entwickeln, ist ein fundiertes Wissen über die pathophysiologischen Zusammenhänge unerlässlich.

Elek et al. konnten bereits 1957 die große Bedeutung im Gewebe belassener Fremdkörper im Zusammenhang mit Staphylokokken-Infektionen zeigen (Elek et al. 1957). So verringerte sich die Erregerzahl, die erforderlich war, um eine Hautinfektion auszulösen (minimum pus-forming dose), um den Faktor 10.000, sofern ein einziger Seidenfaden als Hautnaht im Gewebe belassen wurde.

Über Integration in den Organismus oder Infektion eines Implantates entscheiden komplexe Wechselbeziehungen zwischen Fremdkörper, lebendem Organismus und bakteriellen Infektionserregern an den jeweiligen Grenzflächen – dem sogenannten „Interface“ (Gristina 1987; Geipel et al. 2004), wobei die Fähigkeit der Gewebezellen und Bakterien zur Adhärenz an der Implantatoberfläche von entscheidender Bedeutung ist (Geipel et al. 2004).

Unmittelbar nach Kontakt mit lebendem Gewebe, Blut oder anderen Körperflüssigkeiten wird die Implantatoberfläche netzartig von einem Film aus Proteinen und Glykoproteinen überzogen – dem sogenannten „conditioning film“ (Gristina 1987; Habash et al. 1999; Geipel et al. 2004). Dieser besteht zunächst vorwiegend aus Albumin, an welches sich im Verlauf weitere Moleküle wie Fibronectin, Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor, aber auch zelluläre Elemente wie Thrombozyten und Fibroblasten anlagern (Geipel et al. 2004), so dass eine proadhäsive Oberfläche entsteht (Gristina 1987; Geipel et al. 2004).

Zwischen Gewebezellen und Mikroorganismen entsteht eine Art Wettlauf um die Besiedelung der Oberfläche, sobald ein Fremdkörper mit lebendem Gewebe in Kontakt kommt. Gristina et al. (1987, 1991) prägten hierfür den Begriff des „race for the surface“. Gelingt es körpereigenen Zellen, primär die Oberflächen zu besiedeln, scheint eine bakterielle Besiedelung weniger wahrscheinlich zu sein (Gristina et al. 1987, 1991), da eine Schicht aus lebenden Gewebezellen mit intakten Zellmembranen und funktionierenden Abwehrmechanismen eine Kolonisierung erschwert (Gristina et al. 1991, 1994). Natürlichen Selektionsmechanismen unterliegend haben jedoch einige Bakterien spezifische Rezeptoren (Adhäsine) entwickelt, um an den Bestandteilen des conditioning films anzulagern, zu kolonisieren und so zu überleben (Gristina et al. 1991). *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) zum Beispiel, ein häufig bei Implantat-assoziierten Infektionen vorkommender Keim, zeichnet sich durch den sogenannten „clumping factor“ aus, einem spezifischen Rezeptor, welcher die Bindung an Fibrinogen ermöglicht. Generell weisen Bakterien ein wesentlich höheres „Kolonisierungspotenzial“ auf als Gewebezellen (Gristina et al. 1991).

Lassen sich Bakterien primär auf dem Implantat nieder, können sie dort persistieren, indem sie zu einem mehrschichtigen Zelllayer proliferieren und eine Art Schutzmantel über sich ausbilden (Gristina 1987; Geipel et al. 2004). In dieser als „Biofilm“ bezeichneten Schleimschicht, die vornehmlich aus polymerisierten Exopolysacchariden (Geipel et al. 2004), Proteinen und Glykoproteinen besteht (Gristina 1987), sind die Bakterien in kleinen Kolonien stabil eingebettet (Geipel et al. 2004). Der Biofilm bietet ihnen Überlebensvorteile im nährstoffarmen Milieu, da er für stabile Umgebungs- und Ernährungsbedingungen sorgt, und so geringere Stressadaptationen notwendig sind. Durch die Filterfunktion des Biofilms wird ein zusätzlicher Schutz beispielsweise vor Spitzenkonzentrationen potenziell toxischer Substanzen, pH-Schwankungen, sowie vor Antibiotika und der körpereigenen Abwehr geboten (Gristina et al. 1991).

Mikroorganismen der kommensalen Hautflora sind die häufigsten Erreger der Implantat-assoziierten Infektion (Geipel et al. 2004). Vor allem Staphylokokken, besonders *S. aureus* und koagulase-negative

Staphylokokken wie *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), sind zur Biofilmbildung fähig und für mehr als die Hälfte der periprothetischen Infektionen verantwortlich (Geipel et al. 2004; Del Pozo et al. 2009). Es scheint eine gewisse Präferenz der einzelnen Bakterien für bestimmte Materialien zu geben; so siedelt sich *S. epidermidis* eher an Polymeren, besonders an intravenösen Kathetern an, wohingegen *S. aureus* eher an Metallen und in geschädigten Weichteilen zu finden ist (Gristina 1994). Jedoch können auch andere Erreger wie Streptokokken, Pilze oder Mykobakterien Implantat-assoziierte Infektionen auslösen (Geipel et al. 2004; Kirschner 2008). Des Weiteren werden immer mehr polymikrobiell bedingte Infektionen beobachtet, welche nicht selten antibiotikaresistente Erreger beinhalten und somit eine Behandlung erschweren (Geipel et al. 2004; Marculescu et al. 2008; Del Pozo et al. 2009). Hierbei spielen vor allem *Methicillin-resistente S. aureus*- (MRSA) und *S. epidermidis*-Stämme (MRSE) sowie Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) eine wichtige Rolle (Garvin et al. 1999; Jiranek et al. 2006; AlBuhairan et al. 2008; Marculescu et al. 2008; Del Pozo et al. 2009). Als Risikofaktoren für eine polymikrobielle Infektion gelten das Auftreten von Wunddehiscenzen, Vorhandensein von Drainagen sowie ein Alter über 65 Jahren (Marculescu et al. 2008). Einen Überblick über die Infektionserreger der Implantat-assoziierten Infektion zeigt Tabelle 1 nach einer Veröffentlichung von Geipel et al. (2004).

Tabelle 1: Erregerspektrum bei Gelenkinfektionen (Geipel et al. 2004)

Anteil verschiedener Infektionserreger bei Gelenkprotheseninfektionen	
Erreger	Häufigkeit (%)
Staphylokokken, davon	50-60
- Koagulasenegative Staphylokokken	25-30
- <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Gramnegative, aerobe Stäbchenbakterien	20
(u.a. <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Morganella morganii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.)	
Streptokokken	10-15
(<i>Streptococcus agalactiae</i> , "Viridans-Streptokokken")	
Polymikrobiell	10-15
Anaerobier	7-10
(u.a. <i>Propionibacterium</i> spp., <i>Bacterioides</i> spp.)	
Ohne Erregernachweis	10
Andere Erreger	2
(wie <i>Haemophilus</i> spp., <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Candida</i> spp. u.a.)	

In Anwesenheit von Biomaterialien treten vielfach Antibiotikaresistenzen auf. Frühere Hypothesen sind davon ausgegangen, dass dieses auf eine verminderte Diffusion der Therapeutika durch den Biofilm und damit auf geringere Wirkspiegel am Wirkungsort zurück zu führen sind (Gristina et al. 1991). Neuere Studien haben allerdings gezeigt, dass an Oberflächen adhärente, sessile Bakterien im Vergleich zu planktonischen Bakterien Unterschiede im Stoffwechsel aufweisen, welche insbesondere für Resistenz und Virulenz verantwortlich sein können (Gristina et al. 1991). Eine Form der veränderten, sessilen Bakterien stellen die „small colony variants“ dar, eine Subpopulation von

S. aureus und *S. epidermidis*. Diese Mikroorganismen, die gehäuft bei persistierenden Infektionen und Antibiotikaresistenzen gefunden werden, sind durch atypische Zellmorphologien, verändertes Pigmentverhalten sowie durch verminderte Stoffwechselleistungen und Teilungsraten charakterisiert (Geipel et al. 2004).

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Pathophysiologie der Implantat-assoziierten Infektion ist die Reaktion phagozytierender Zellen auf Fremdkörper und Biofilm-bildende Bakterien. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bakteriell besiedelte und mit einem Biofilm überzogene (Wagner et al. 2006), als auch sterile Oberflächen eines Fremdkörpers (Zimmerli et al. 1984; Gristina et al. 1991, 1994) zu einer lokalen Funktionsminderung des Immunsystems führen (Zimmerli et al. 1984). Phagozytierende Zellen, vor allem Makrophagen und polymorphkernige neutrophile Granulozyten, werden durch Fremdkörperoberflächen aktiviert, so dass sie vermehrt in das periimplantäre Gewebe einwandern, um die Fremdkörperoberflächen zu phagozytieren. Da diese, genauso wie ein Biofilm (aufgrund seiner Größe und Konfiguration) nicht phagozytierbar sind, kommt es zu einer „frustranten Phagozytose“ (Wagner et al. 2006). Dies bedeutet, dass die Abwehrzellen ihre potentiell zytotoxischen und proteolytischen Mediatoren und Enzyme unkontrolliert in das umgebende Gewebe freisetzen (Zimmerli et al. 1984; Gristina 1994). Dadurch entsteht ein Gewebeschaden, welcher wiederum weitere Abwehrzellen aktiviert und in das Entzündungsgebiet lockt, so dass letztendlich eine chronische Entzündung in Form eines Kreislaufs unterhalten wird (Zimmerli et al. 1984; Gristina 1994). Zusätzlich kommt es zu einer Erschöpfung der Produktion von Sauerstoffradikalen sowie lytischen und bakteriziden Enzymen, so dass bei Kontakt mit einwandernden Bakterien diese nicht mehr effektiv abgetötet werden können (Gristina 1994). Dieses Phänomen bietet eine mögliche Erklärung für das Auffinden von lebenden Bakterien in Makrophagen am Rand chronischer Entzündungen (Gristina 1994).

Ein weiterer, die Funktion des Abwehrsystems beeinflussender Faktor ist die Perfusion des entsprechenden Gewebes, welche bei der periprothetischen Infektion unter anderem durch mechanische und physikalische Gefäßschädigungen herabgesetzt wird. Bei einer Entzündung im Knochengewebe kommt es durch Einschwemmen von Zellen zu einer lokalen Druckerhöhung, da sich das mineralische Knochenlager nicht ausdehnen kann. Die so entstehende Gefäßkompression führt zu einer funktionellen Gefäßinsuffizienz mit Minderversorgung des Entzündungsgebietes (Frommelt 2004). Eine physikalische Perfusionsbeeinträchtigung wiederum kann sowohl durch die Schädigung des Gewebes während der Implantation, als auch aufgrund lokaler Wärmeentstehung, beispielsweise durch Aushärten des Knochenzementes, entstehen (Geipel et al. 2004). Die Minderperfusion führt neben der Beeinträchtigung des Abwehrsystems auch dazu, dass Pharmaka schlechter an den Ort der Entzündung gelangen können und ihre Wirkung somit per se eingeschränkt wird (Frommelt 2004).

Insgesamt zeichnet sich die Implantat-assoziierte Infektion durch drei Hauptcharakteristika aus (Geipel et al. 2004):

- Es bedarf eines niedrigen bakteriellen Inokulums; das heißt, dass nur wenige Keime nötig sind, um eine periprothetische Infektion zu generieren.
- In der Regel handelt es sich um niedrig virulente Bakterien der kommensalen Hautflora.
- Die Infektion ist im Allgemeinen nicht zu beherrschen, ohne das Implantat zu entfernen.

1.1.4 Klinik, Diagnostik und Therapie

Besteht der Verdacht auf eine Implantat-assoziierte Infektion, ist ein zeitnahes diagnostisches und therapeutisches Handeln unerlässlich. In der Anamnese finden sich häufig Revisionsoperationen, bereits genannte prädisponierende Faktoren oder Wundheilungsstörungen nach vorausgegangenem Eingriff (Wodtke et al. 2008; Militz et al. 2010). Hauptsymptom ist ein lokaler Belastungs- oder Ruheschmerz im Bereich des künstlichen Gelenkes (Militz et al. 2010), wobei die Beschwerden entweder seit der Operation bestehen oder nach einem initial symptomfreien Intervall neu aufgetreten sein können. Die weiteren Kardinalsymptome einer Entzündung wie *rubor* (Rötung des entsprechenden Gebietes), *calor* (Überwärmung), *tumor* (Schwellung) und *functio laesa* (Funktions- bzw. Bewegungseinschränkungen) begleitet von unklarem Fieber sind ebenfalls häufig bei akuten Infektionen zu finden und können diagnostisch wegweisend sein (Zimmerli et al. 2003; Wodtke et al. 2008). Chronische Infektionen im Bereich der Gelenkendoprothese sind hingegen schwieriger zu diagnostizieren, da Schmerzen häufig das einzige Symptom darstellen (Laffer et al. 2006).

Die Labordiagnostik kann weitere Hinweise auf ein Infektionsgeschehen geben. Auffällige Entzündungswerte wie erhöhte Leukozytenzahlen, ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) und eine beschleunigte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) sind Anzeichen einer Infektion, allerdings wenig spezifisch. Zudem steigen diese Parameter üblicherweise ebenfalls nach unkomplizierten Endoprothesenoperationen primär an und normalisieren sich im Regelfall innerhalb von 10 Tagen (Gollwitzer et al. 2006a) bis zu zwei Monaten (Del Pozo et al. 2009), die BSG kann sogar über mehrere Monate erhöht bleiben (Zimmerli et al. 2003; Gollwitzer et al. 2006a; Del Pozo et al. 2009; Militz et al. 2010). Durch die relativ hohe Sensitivität bei geringer Spezifität werden die Entzündungsparameter vor allem als Ausschlussdiagnostik verwendet (Gollwitzer et al. 2006a), wobei beachtet werden muss, dass bei asymptomatischen, chronischen Verläufen die Werte auch im Normalbereich liegen können (Zimmerli et al. 2003; Militz et al. 2010).

Bildgebende Verfahren sind in der Diagnostik der Implantat-assoziierten Infektion ebenfalls wenig spezifisch. Typische Anzeichen im konventionellen Röntgenbild sind periprothetische Aufhellungen, rasch zunehmende Osteolysen, Implantatwanderung und periostale Reaktionen (Zimmerli et al. 2003; Kirschner 2008; Del Pozo et al. 2009; Militz et al. 2010). Diese Anzeichen erlauben allerdings keine Aussage in der meist schwierigen Differenzierung zu einer aseptischen Lockerung (Kirschner 2008; Del Pozo et al. 2009). Moderne Schnittbilddiagnostik wie die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) sind aufgrund der Artefaktbildung durch die Implantate wenig aussagekräftig und werden daher in der Routinediagnostik bei Verdacht auf eine periprothetische Infektion nicht empfohlen (Zimmerli et al. 2003; Laffer et al. 2006; Del Pozo et al. 2009).

Auch die Knochenszintigraphie, welche einen erhöhten Knochenstoffwechsel detektiert, ist aufgrund eines physiologisch erhöhten Stoffwechsels im ersten Jahr nach Endoprothesen-Implantation ebenfalls relativ unspezifisch (Gollwitzer et al. 2006a; Laffer et al. 2006; Lohmann et al. 2008; Del Pozo et al. 2009). Ein neues Verfahren, welches in der Literatur noch kontrovers diskutiert wird, ist die Fluor-18-Desoxyglucose-Positronenemissionstomographie (FDG-PET), die gegebenenfalls auch in Kombination mit einer CT als PET-CT angewandt werden kann. Diese Methodik, bei der durch radioaktiv markierte ^{18}F -Desoxyglucose ein gesteigerter Stoffwechsel dargestellt wird, zeichnet sich durch gute Werte für Sensitivität und Spezifität, sowie eine präzise Darstellung von Strukturen in

dreidimensionaler Qualität aus (Gollwitzer et al. 2006a; Wodtke et al. 2008; Militz et al. 2010). Negativaspekte der PET (-CT) sind allerdings ein unspezifisches Signal in den ersten drei postoperativen Jahren, welches die Aussagekraft einschränkt (Lohmann et al. 2008), relativ hohe Kosten (Gollwitzer et al. 2006a; Wodtke et al. 2008) und eine limitierte Verfügbarkeit (Gollwitzer et al. 2006a; Del Pozo et al. 2009).

Das einzig beweisende, diagnostische Kriterium für eine periprothetische Infektion ist der Nachweis von Fremdkeimen in Untersuchungsmaterialien mit Gelenkkontakt (Wodtke et al. 2008; Militz et al. 2010), welche entweder durch eine Gelenkpunktion oder eine operative Probenentnahme gewonnen und zytologisch, histologisch und bakteriologisch analysiert werden (Geipel et al. 2004; Gollwitzer et al. 2006a; Del Pozo et al. 2009; Militz et al. 2010). Als positives Ergebnis der Biopsie wird das Auffinden von mindestens zwei positiven bakteriologischen Ergebnissen in unterschiedlichen Proben (Lohmann et al. 2008; Del Pozo et al. 2009) oder einer positiven histologischen in Kombination mit einer positiven bakteriologischen Probe definiert (Lohmann et al. 2008).

Die histopathologische Begutachtung gilt aufgrund ihrer Genauigkeit immer noch als Goldstandard (Militz et al. 2010), da sich sowohl Minimalausprägungen, als auch phlegmonöse und abszedierende Infektionen nachweisen lassen (Gollwitzer et al. 2006a; Militz et al. 2010). Als Standarddiagnostikum für den mikrobiologischen Nachweis gilt die kulturelle Anzucht des Erregers aus periprothetischem Probenmaterial (Trampuz et al. 2007). Bei einer Implantatentfernung im Rahmen einer Revisionsoperation können Bakterien und Biofilm mittels Sonikation (Ultraschall) von der Implantatoberfläche gelöst und ein kultureller Nachweis aus der Sonikationslösung durchgeführt werden, wodurch eine bessere Sensitivität als durch einfachen Erregernachweis aus Gewebeproben erzielt wird (Trampuz et al. 2007). Besonders nach vorangegangener antimikrobieller Therapie bietet diese Nachweismethodik in der Diagnostik der periprothetischen Infektion deutliche Vorteile (Trampuz et al. 2007).

Eine Alternative zur kulturellen Anzucht der Erreger bietet der Nachweis bakterieller DNA mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR, *engl.*: polymerase chain reaction) (Zimmerli et al. 2003; Laffer et al. 2006). Da die PCR ein sehr sensitives Verfahren ist, werden bereits geringste bakterielle DNA-Mengen in kurzer Zeit nachgewiesen. Dieses birgt allerdings die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse durch Kontamination oder durch zurück gebliebene DNA-Fragmente abgetöteter Bakterien nach erfolgreicher Antibiotikatherapie (Gollwitzer et al. 2006a; Militz et al. 2010). Aufgrund der noch fehlenden Validierung dieses Verfahrens in der Diagnostik der Implantat-assoziierten Infektion wird die PCR bisher noch nicht in der Routine-Diagnostik eingesetzt (Gollwitzer et al. 2006a).

Obwohl es keine einheitliche Definition der Implantat-assoziierten Infektion gibt, gelten folgende Diagnosekriterien als allgemein akzeptiert (Trampuz et al. 2007; Del Pozo et al. 2009):

- Nachweis einer akuten Entzündung im histopathologischen Präparat des periprothetischen Gewebes
- Fistelbildung mit offenem Kontakt zwischen Haut und Endoprothese
- Eiteransammlung in der Gelenkhöhle
- Isolation identischer Keime in mindestens zwei Kulturen eines Gelenkpunktates oder in intraoperativ gewonnenen periprothetischen Gewebeproben

Therapeutisch erfordert die Implantat-assoziierte Infektion eine komplexe, interdisziplinäre Behandlung, die in der Regel mit der Entfernung des Implantates einhergeht. Art und Umfang des jeweiligen Therapieschemas richten sich im Wesentlichen nach dem Infektionstypus (Früh-, verzögerte oder Spätinfektion) und damit nach dem Zeitintervall zwischen der Operation und dem Manifestationszeitpunkt der ersten klinischen Symptome. Des Weiteren sind die Virulenz und das Resistenzmuster der jeweiligen Keime und nicht zuletzt der Allgemeinzustand des Patienten von großer Bedeutung.

Grundsätzlich besteht die Therapie der Implantat-assoziierten Infektion aus einer medikamentösen und einer operativen Komponente, bei der je nach Situation zwischen Erhalt oder Wechsel der Endoprothese abgewogen werden muss.

Ein Prothesen-Erhalt ist nur dann möglich, wenn es sich um eine Frühinfektion nach Primäreingriff (Zimmerli et al. 2003; Laffer et al. 2006; Wodtke et al. 2008) oder um eine Spätinfektion handelt, deren Symptombdauer einen Zeitraum von drei Wochen nicht überschreitet (Zimmerli et al. 2003; Laffer et al. 2006). In der Literatur zeichnet sich der Trend ab, das postoperative Zeitintervall, in dem der Erhalt der Endoprothese noch möglich und gerechtfertigt erscheint, immer weiter zu verkürzen (Militz et al. 2010). Zusätzlich müssen Erreger und Resistenzlage bekannt und das Implantat noch fest im Lager verankert sein (Wodtke et al. 2008). Therapie der Wahl ist in diesem Fall ein ausgedehntes Débridement des Infektionssitus unter Schonung der umgebenen Weichteile und ein Wechsel aller modularen und mobilen Endoprothesenkomponenten (Wodtke et al. 2008; Militz et al. 2010). Unterstützend werden Antibiotika nach Antibiogramm eingesetzt, die sowohl lokal zum Beispiel in Form von antibiotikahaltigen Kollagenschwämmen und -ketten, als auch systemisch gegeben werden (Zimmerli et al. 2003; Militz et al. 2010).

Treffen die oben genannten Kriterien nicht zu, muss die Endoprothese gewechselt werden, da nur so eine Eradikation des Keimes zu erzielen ist (Zimmerli et al. 2003; Wodtke et al. 2008; Militz et al. 2010). Im Zuge der Implantatentfernung erfolgt auch bei dieser Therapiestrategie ein ausgedehntes Débridement in Kombination mit einer lokalen und systemischen Antibiotikagabe (Laffer et al. 2006; Wodtke et al. 2008; Militz et al. 2010). Ein Wechsel der Endoprothese kann einzeitig oder zweizeitig erfolgen, wobei das einzeitige Vorgehen für den Patienten sowohl psychisch als auch physisch weniger belastend und risikoärmer ist. Die Kosten sind geringer und auch die funktionellen Ergebnisse nach Therapie scheinen denen nach zweizeitigem Vorgehen überlegen zu sein (Wodtke et al. 2008). Allerdings ist hierfür die genaue präoperative Kenntnis des Erregers und des Resistenzmusters genauso unerlässlich, wie ein guter Allgemeinzustand des Patienten, ein erfahrenes chirurgisches Team und eine adäquate Zusammenarbeit zwischen Klinikern und Mikrobiologen (Wodtke et al. 2008; Militz et al. 2010).

Konnte im Vorfeld der Operation die Keim- und Resistenzlage nicht ermittelt werden oder handelt es sich um einen (multi-)resistenten Keim, so ist ein zweizeitiges Vorgehen indiziert (Wodtke et al. 2008). Ebenso verhält es sich bei Patienten in schlechtem Allgemeinzustand (Militz et al. 2010) oder beim Vorliegen schwerer bis mittelschwerer Weichteildefekte wie Abszesshöhlen oder Fisteln (Zimmerli et al. 2003; Laffer et al. 2006). Dabei wird in der ersten Operation sowohl das Implantat entfernt und der Situs gereinigt, als auch Material für die mikrobiologische Diagnostik gewonnen (Zimmerli et al. 2003).

Nach einem Therapie-Intervall mit einer lokal und systemisch applizierten Antibiose kann gegebenenfalls eine neue Endoprothese implantiert werden.

Die dauerhafte Resektion eines Gelenkes oder Amputation einer Extremität stellen ultima ratio-Therapieoptionen dar, allerdings sind sie unter Umständen lebensrettende Maßnahmen bei nicht zu beherrschenden septischen Zuständen (Wodtke et al. 2008; Militz et al. 2010).

Bei nicht-operablen Patienten (zum Beispiel bedingt durch Multimorbidität) kann versucht werden, mit einer konservativ-medikamentösen Therapie die klinische Symptomatik einzudämmen (Wodtke et al. 2008; Militz et al. 2010). Durch eine alleinige Antibiotikagabe wird allerdings keine Eradikation des Keimes und somit keine Ausheilung der Infektion erreicht, zudem bilden die Nebenwirkungen der Langzeit-Antibiotikaeinnahme den limitierenden Faktor dieser Therapiestrategie (Wodtke et al. 2008).

1.2 Maßnahmen zur Vorbeugung Implantat-assoziiertes Infektionen

1.2.1 Allgemeine Prophylaxemaßnahmen

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass ein überwiegender Anteil der Implantat-assoziierten Infektionen im ersten postoperativen Jahr auftritt und daher per definitionem von einer intra- oder unmittelbar postoperativen bakteriellen Kontamination ausgegangen werden muss. Demnach sind prophylaktische Maßnahmen in der perioperativen Phase besonders sinnvoll und effektiv (Gollwitzer et al. 2006b).

Neben modernsten Operationssälen in Reinraumtechnik (laminar air flow) und mitunter spezieller Ventilationskleidung (helmet aspirator suits) ist die perioperative intravenöse Antibiotikaphylaxe ein fester Bestandteil der prophylaktischen Maßnahmen zur Vorbeugung Implantat-assoziiertes Infektionen. In einem systematischen Review über die Effektivität der perioperativen Antibiotikagabe konnte eine relative Risikoreduktion von 81% ermittelt werden, eine Überlegenheit eines Antibiotikums zeichnete sich jedoch nicht ab (AlBuhairan et al. 2008). Analysen des Norwegischen Endoprothesen Registers (1987 – 2001) zeigten, dass eine zusätzliche Senkung des relativen Risikos für Revisionsoperationen aufgrund von Infektionen durch die Kombination aus systemischer (perioperative Antibiotikagabe) und lokaler antimikrobieller Prophylaxe (antibiotikahaltiger Knochenzement) erzielt werden konnte (Engesæter et al. 2003). Jedoch wird der prophylaktische Einsatz antibiotikahaltigen Knochenzementes aufgrund der fraglichen Effektivität (Jiranek et al. 2006; Gandhi et al. 2009; Namba et al. 2009), der erhöhten Kosten, welche nur durch eine Senkung der Infektionsrate von geschätzten 1,5 % auf 0,3 % ausgeglichen werden könnten, und der Gefahr der Generierung antibiotikaresistenter Erreger (Jiranek et al. 2006) kontrovers diskutiert. Ein therapeutischer Einsatz antimikrobieller Pharmaka im Allgemeinen und antibiotikahaltigen Zementes im Speziellen wird gravierend erschwert, wenn dieser bereits prophylaktisch in der Primärimplantation eingesetzt wurde (Jiranek et al. 2006).

All diese Maßnahmen sind in der Prophylaxe der frühen Implantat-assoziiertes Infektion effektiv, welche durch eine intra- oder perioperative bakterielle Kontamination verursacht wird.

Doch auch im Hinblick auf die Verhinderung später Implantat-assoziiertes Infektionen, die durch hämatogene Aussaat von Bakterien bedingt sind, sollte auf eine sorgfältige Bakteriämie-Prophylaxe bei Endoprothesenträgern geachtet werden. Hierbei liegt das Augenmerk (nicht zuletzt wegen der wichtigen Bedeutung in der Endokarditisprophylaxe bei Trägern künstlicher Herzklappen) vor allem auf einer vorbeugenden Antibiotikagabe im Rahmen zahnärztlicher Eingriffe. In einem Diskussionsbeitrag zu diesem Thema plädierten Podbielski et al. (2009) für eine perimanipulative Antibiotikaprophylaxe bei Risikopatienten und zahnärztlichen Eingriffen, welche die Integrität der Mundschleimhaut, des Parodontiums oder des periapikalen Gewebes verletzen.

1.2.2 Oberflächenmodifikation

Ein wesentlicher Nachteil aller bereits vorgestellten Prophylaxemaßnahmen ist die Tatsache, dass sie nur „von außen“, also von Seiten des Organismus, greifen können. Dieses bedeutet, dass implantatseitig die Oberfläche weitestgehend ungeschützt ist und somit allgemeine Prophylaxemaßnahmen an Effektivität verlieren, sobald sich Bakterien ansiedeln und einen Biofilm ausbilden. Eine Modifikation der Implantatoberfläche, welche eine verminderte bakterielle Kolonisation zum Ziel hat, greift demnach den körpereigenen Organismus unterstützend direkt in das „race for the surface“ ein und stellt daher eine sinnvolle Ergänzung der prophylaktischen Maßnahmen dar (Gollwitzer et al. 2006b). Eine bakterielle Besiedelung kann hierbei entweder durch eine fördernde Beeinflussung der Gewebeintegration oder durch hemmende Einflüsse auf die Bakterien erschwert werden.

Infektionsprophylaxe durch Verbesserung der Gewebeintegration

Gut in den Organismus integrierte Endoprothesen sind wesentlich infektresistenter als schlecht integrierte (Gollwitzer et al. 2006b), wobei nicht zuletzt die bereits beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Implantatoberflächen und dem körpereigenen Immunsystem von entscheidender Bedeutung sind. Durch eine feste Gewebeintegration wird der Teufelskreis der „frustranten Phagozytose“ mit konsekutiver Gewebeerstörung unterbrochen und die beschriebene lokale Funktionsminderung des Immunsystems verhindert (Gollwitzer et al. 2006b); dies führt wiederum zu einer verbesserten Infektionsresistenz.

Eine verbesserte Gewebeintegration kann beispielsweise durch sogenannte „biokompatible Oberflächenmodifikationen“ erzielt werden, welche sich unter anderem dadurch auszeichnen, dass sie aufgrund physikalischer und chemischer Eigenschaften gezielte Interaktionen zwischen Implantat und Organismus ermöglichen, welche eine knöcherne Heilung und eine feste, dauerhafte Integration fördern (Ascherl et al. 2006). Eine Möglichkeit, Oberflächen biokompatibel zu gestalten, ist die Nachahmung knöcherner Strukturen, die „Biomimetik“, so dass Oberflächen den Gewebezellen als Leitstrukturen zur Adhäsion und letztendlich zur Knochenapposition dienen (Schmidmaier et al. 2006a).

Die extrazelluläre Matrix von Knochengewebe setzt sich zu 65% aus nichtorganischen Bestandteilen zusammen, welche überwiegend aus Hydroxylapatit (hydroxyliertes Calciumphosphat) bestehen (Schmidmaier et al. 2006a). In klinischen Studien zeigte die Beschichtung von metallischen Implantaten mit Hydroxylapatit sowohl eine verbesserte Osteointegration, als auch eine signifikant

verminderte Infektionsrate (Pommer et al. 2002). Ähnliche positive Effekte auf die Osteointegration konnten ebenfalls durch Oberflächenbeschichtungen mit Typ I – Kollagen erzielt werden (Rammelt et al. 2004, 2007), welches den Hauptbestandteil der organischen Komponenten der extrazellulären Knochenmatrix darstellt (Schmidmaier et al. 2006a).

Infektionsprophylaxe durch antiinfektiöse Oberflächen

Eine antiinfektiöse Oberflächenmodifikation ist ein weiterer Ansatz, um die Infektionsresistenz von Implantatoberflächen zu fördern. Generell unterscheidet man hierbei zwischen *antiadhäsiven* Oberflächen, welche die Anhaftung von Bakterien verhindern, und *antibakteriellen* Oberflächen, die bakterizid oder bakteriostatisch ein Bakterienwachstum hemmen.

Antiadhäsive Oberflächenmodifikation

Antiadhäsive Oberflächen zeichnen sich dadurch aus, dass sie die initiale Adhärenz (Anlagerung) von Mikroorganismen verhindern. Dies kann durch Veränderung der Topographie oder der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Oberflächen geschehen.

Je größer die dreidimensionale Oberfläche eines Implantates ist, desto mehr Anhaftungsmöglichkeiten bietet sie. Daher kann durch spezielle Verfahren wie das Elektropolieren eine möglichst glatte und dreidimensional kleine Oberfläche geschaffen werden, um die Bakterienadhärenz zu reduzieren. Auch durch eine spezielle Gestaltung der Oberflächen mit extrem hydrophoben oder extrem hydrophilen Eigenschaften (Veränderung der freien Oberflächenenergie, „surface free energy“) kann hemmend in die Interaktion zwischen Implantatoberfläche und Mikroorganismus eingegriffen und so eine bakterielle Adhärenz verhindert werden (Gollwitzer et al. 2006b).

Jedoch wirken sich beide Modifikationen eher ungünstig auf die Gewebeintegration aus, da die zelluläre Adhärenz und eine stabile ossäre Integration ebenfalls durch eine möglichst große dreidimensionale Fläche gefördert werden und eine Veränderung der freien Oberflächenenergie gleichzeitig die Adhärenz körpereigener Zellen und Proteine negativ beeinflusst. Eine Gewebeintegration wird somit durch diese Maßnahmen behindert (Gollwitzer et al. 2006b). Limitierend ist zudem die Tatsache, dass durch den „conditioning film“ die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Oberfläche unmittelbar nach Implantation verändert und somit artifizielle Beschichtungen gegebenenfalls ineffektiv werden (Habash et al. 1999; Gollwitzer et al. 2006b).

Bei dem Einsatz von Kathetern oder Stents ist eine gleichzeitige antiadhäsive Wirkung auf Mikroorganismen und körpereigene Zellen durchaus vorteilhaft und erwünscht, jedoch stellt die verminderte Gewebeintegration in der Endoprothetik einen entscheidenden Nachteil dar und limitiert so den Einsatz antiadhäsiver Oberflächenmodifikationen bei dauerhaft in den Körper eingebrachten Implantaten (Gollwitzer et al. 2006b).

Antibakterielle Oberflächenmodifikation

Antibakterielle Oberflächen scheinen den antiadhäsiven aufgrund der Interferenzen zwischen Bakterienabwehr und Gewebeintegration in der Orthopädie und Endoprothetik überlegen zu sein, allerdings muss auch hierbei eine ossäre Integration ermöglicht werden.

Eine antibakterielle Oberflächenmodifikation besteht in der Regel aus einer speziellen, resorbierbaren Beschichtung der Implantatoberfläche. Dies bietet den Vorteil, dass weder die mechanischen Eigenschaften der Endoprothese an sich, noch die Operationstechnik verändert werden müssen (Gollwitzer et al. 2006b; Montali 2006). Zusätzlich bietet eine resorbierbare Beschichtung die Möglichkeit, sie als Wirkstoffträger zu nutzen, wodurch lokal hohe Wirkspiegel bei geringer systemischer Toxizität erzielt werden können (Price et al. 1996; Gollwitzer et al. 2006b; Montali 2006). Zusätzlich ist die Wirkstoff-Freisetzung im Vergleich zu nicht-resorbierbaren Wirkstoffträgern deutlich erhöht (Price et al. 1996) und durch eine kontinuierliche Freisetzung antiinfektiöser Metabolite kann das Implantat bis zur Integration in den Organismus geschützt werden. Des Weiteren wird durch eine vollständige Resorption der Beschichtung eine Reoperation zur Entfernung „externer“ Wirkstoffträger vermieden (Price et al. 1996; Gollwitzer 2006b).

Als antibakterielle Agenzien können sowohl Antibiotika, als auch Antiseptika und antimikrobiell wirkende Metalle eingesetzt werden.

Antibiotische Beschichtungen

Der Einsatz von Antibiotika ist ein elementarer Bestandteil in der Prophylaxe und Therapie der Implantat-assoziierten Infektion. Besonders Aminoglycoside wie Gentamicin haben sich aufgrund guter Knochengängigkeit, einem breiten antibakteriellen Spektrum und der bakteriziden Wirkung, die auch gegen nicht-proliferierende Keime effektiv ist, in der Orthopädie etabliert (Lucke et al. 2003b). Dosislimitierend bei systemischer Gabe ist allerdings eine Oto- und Nephrotoxizität, so dass zum einen regelmäßige Kontrollen des Serumspiegels erforderlich sind und zum anderen lokal nicht immer ausreichende Wirkspiegel erzielt werden können (Montali 2006).

Durch den Einsatz einer Gentamicin-haltigen Oberflächenbeschichtung konnten sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* am Tiermodell der Ratte signifikant verminderte Bakterienkonzentrationen und Infektionsraten nachgewiesen werden (Lucke et al. 2003b), ohne dass Anhaltspunkte für eine negative Beeinflussung der Gewebeintegration gefunden wurden (Vester et al. 2010). Zudem zeigte sich die lokale Applikation von Gentamicin im Rahmen der Versuche einer systemischen Gabe überlegen (Lucke et al. 2005). Aufgrund der überzeugenden Ergebnisse *in vitro* und *in vivo* am Tiermodell wurde im Rahmen der klinischen Forschung eine biodegradierbare, Gentamicin-haltige Oberflächenbeschichtung auf Marknägeln bei acht Patienten mit offenen Tibiafrakturen eingesetzt (Raschke et al. 2004; Schmidmaier et al. 2006b). Da die beschichteten Implantate nach einem einjährigen Beobachtungsintervall gute Ergebnisse (Infektionsfreiheit, blande Frakturheilung) zeigten (Schmidmaier et al. 2006b), wurden diese zwischen 2005 und 2007 bei 19 weiteren Patienten in einer prospektiven, nicht-randomisierten Studie weitergehend untersucht. In diese Studie waren Patienten mit offenen und geschlossenen Tibiafrakturen (isolierte Frakturen oder als Teil eines Polytraumas) sowie Revisionsoperationen eingeschlossen; zusätzlich zu den Gentamicin-beschichteten Marknägeln erhielten die Patienten das übliche perioperative Antibiotikaregime. Nach einem sechsmonatigen Beobachtungsintervall zeigten sich klinisch, laborchemisch und radiologisch gute Ergebnisse mit fehlenden Infektionszeichen und guter Frakturheilung (Fuchs et al. 2011).

Auch in anderen Forschungsgruppen wurden antibiotikahaltige Oberflächenbeschichtungen entwickelt und mit guten *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen publiziert (Darouiche et al. 2007; Moskowitz et al. 2010). So konnten beispielsweise Darouiche et al. (2007) in einem Kaninchen-Modell signifikant

verminderte Infektionsraten durch eine Oberflächenbeschichtung mit Rifampicin und Monocyclin erzielen. Weiterhin entwickelten Moskowitz et al. (2010) ein Kaninchenmodell zur Simulation eines einzeitigen Wechsels nach Implantat-assoziiertes Osteomyelitis, mit welchem sie eine signifikante Bakterienreduktion durch den Einsatz einer weiteren Gentamicin-haltigen Beschichtung auf dem Wechselimplantat erzielen konnten.

Trotz dieser guten Studienergebnisse ist - neben der Gefahr der Toxizität und allergischen Reaktion - ein erhöhtes Risiko der Resistenzentwicklung der limitierende Faktor für den Einsatz von Antibiotika als antibakterielle Agenzien in der Primärprophylaxe (Darouiche 2003; Lucke et al. 2003b; Jiranek et al. 2006; Montali 2006). Eine Langzeitfreisetzung von Antibiotika unterhalb der minimalen Hemmkonzentration (MIC, *engl.*: minimal inhibitory concentration) bietet ein optimales Milieu, um resistente Keime zu generieren (Lucke et al. 2003b, Jiranek et al. 2006; Montali 2006). Antibiotikhaltiger Knochenzement zum Beispiel stellt als avitales Gewebe eine optimale Oberfläche und Besiedelungsgrundlage für eine bakterielle Kolonisation dar. Durch Risse im Zementmantel können geringe Mengen des Antibiotikums (unterhalb der MIC) über die eigentliche Wirkdauer hinaus für einen langen Zeitraum freigesetzt und so Resistenzen gefördert werden (Jiranek et al. 2006).

Insbesondere bei Revisionsoperationen sind in den letzten Jahren vermehrt (multi-)resistente Keime beobachtet worden (Garvin et al. 1999; Campoccia et al. 2006; Jiranek et al. 2006). Vor allem *Methicillin-resistenter S. aureus* (MRSA) und *S. epidermidis* (MRSE), sowie Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) spielen hierbei eine besondere Rolle (Jiranek et al. 2006). Deutschlandweit ist ungefähr jeder fünfte isolierte *S. aureus* – Keim ein MRSA (ECDC 2010c; Robert Koch-Institut 2012), auf Intensivstationen sind sogar annähernd ein Drittel aller *S. aureus* – Stämme Methicillin-resistent (SARI 2011; Robert Koch-Institut 2012). Bei den koagulasenegativen Staphylokokken wurde in den operativen Disziplinen bei 61 % aller Befunde eine Oxacillin-Resistenz ermittelt; zu dieser Gruppe wird unter anderem der MRSE gezählt. Werden die chirurgischen Intensivstationen isoliert betrachtet, handelt es sich um eine Resistenzrate von 81 % (Robert Koch-Institut 2012). Unter den Enterokokken-Stämmen erweisen sich ungefähr 10 – 20 % als Vancomycin-resistent (ECDC 2010b; SARI 2011; Robert Koch-Institut 2012). Rund die Hälfte aller *Enterococcus faecium* – Stämme weisen Resistenzen gegenüber dem bei der Therapie der Implantat-assoziierten Infektion gängigen Antibiotikum Gentamicin auf (ECDC 2010a; Robert Koch-Institut 2012). Bedenklich ist auch eine steigende Rate an multiresistenten *S. epidermidis*-Stämmen (von der Primärprävention unabhängig), die neben Resistenzen gegenüber β -Lactam-Antibiotika auch Resistenzen gegenüber Aminoglycosiden und Macroliden aufweisen (Campoccia et al. 2009). Es wird davon ausgegangen, dass diese Zahlen zukünftig, nicht zuletzt aufgrund des prophylaktischen Einsatzes von Antibiotika in der Primärimplantation, noch weiter ansteigen werden (Jiranek et al. 2006).

Antiseptische Beschichtungen

Chlorhexidin und Octenidin sind gängige Antiseptika, bei denen bisher keine therapierelevanten Resistenzentwicklungen bekannt sind. Im klinischen Alltag finden sie bei der Haut- und Schleimhaut-Desinfektion breite Anwendung (Harris et al. 2006; Montali 2006). Chlorhexidin wird vor allem in der Zahnheilkunde (Chlorhexidindigluconat-Lösung) oder als Wunddesinfektion angewendet (beispielsweise als Wunddesinfektions-Spray von Hansaplast MED® / Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) und zeichnet sich durch eine breite antibakterielle Wirkung gegen gram-positive und

gram-negative Bakterien, sowie eine vereinzelte Wirkung auf anaerobe Keime aus (Fachinformation Clorhexamed alkoholfrei, Glaxo Smith Kline, Stand 08/2007; Scharnweber et al. 2007). Der bakterizide Wirkmechanismus beruht auf einer Störung des osmotischen Gleichgewichts durch Interferenzen von Chlorhexidin mit lipophilen Strukturen der zytoplasmatischen Membran der Erregerzelle (Fachinformation Chlorhexidindugluconat-Lösung 2%; Engelhard Arzneimittel, Stand 11/2007). Durch verschiedene Beschichtungen von Implantaten mit Chlorhexidin konnten *in vitro* und *in vivo* im Tiermodell signifikante Reduktionen der Infektionsraten erzielt werden (Darouiche et al. 1998; DeJong et al. 2001; Harris et al. 2006). Für den Einsatz in der Endoprothetik ist eine mangelnde Biokompatibilität limitierend (Harris et al. 2006). Eine *in vitro* – Untersuchung unterschiedlich beschichteter Oberflächen zeigte eine vollständige Hemmung der Fibroblastenadhäsion, sobald Chlorhexidin den Beschichtungen zugefügt wurde (Harris et al. 2006).

Ähnliche antibakterielle Effekte konnten durch eine Beschichtung von Osteosynthesematerialien mit Octenidin (Octenisept[®], Firma Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland) erzielt werden (Kälücke et al. 2006). Octenidin reagiert als kationaktive Verbindung ebenfalls mit Bestandteilen der Zellwand gram-positiver und -negativer Bakterien, wodurch deren Funktion gestört wird (Fachinformation Octenisept[®], Schülke & Mayr, Stand 11/2008). Studien zu antibakteriellen Effekten von Oberflächenmodifikationen ergaben vergleichbare Ergebnisse für antibiotikahaltige (Rifampicin und Fusidinsäure) oder antiseptikahaltige Beschichtungen. Auch wenn in histologischen Untersuchungen bislang keine Anzeichen für eine zytotoxische Beeinträchtigung des umgebenden Gewebes durch Octenidin gefunden werden konnten (Kälücke et al. 2006), so stehen weitere Untersuchungen bezüglich der Biokompatibilität und Zytotoxizität noch aus.

Beschichtungen mit antimikrobiell wirkenden Metallen

Eine weitere Möglichkeit, Bakterien zu bekämpfen und somit Infektionen vorbeugen zu können, ist der Einsatz antimikrobiell wirkender Metalle. Seit Jahrtausenden wurden Metalle, vor allem Kupfer und Silber, zur Desinfektion von Wunden oder Trinkwasser eingesetzt (Dollwett 1985; Gabbay 2006). Anfang des 20. Jahrhunderts hat Paul Ehrlich Arsenverbindungen als Salvarsan[®] zur antibakteriellen Therapie der Syphilis angewendet (Weber et al. 2001; Dekant et al. 2005) und damit einen Meilenstein in der gezielten Bekämpfung von Infektionskrankheiten gesetzt (Dekant et al. 2005). Doch bald danach löste die Ära der Antibiotika durch die Entdeckung des Penicillins vorerst die antimikrobiell wirkenden Metalle ab (Dekant et al. 2005), bis sie fast ein Jahrhundert später, nicht zuletzt wegen ihres breiten Einsatzes in der Industrie, wieder Gegenstand der aktuellen medizinischen Forschung geworden sind (Dekant et al. 2005).

So wurde lange Zeit beispielsweise Silber in Form einer 1 %igen Silbernitratlösung Neugeborenen in den Bindehautsack geträufelt (*Credé*-Prophylaxe), um einer Gonoblenorrhoe (Neugeborenen-Konjunktivitis durch *Neisseria gonorrhoeae* oder *Chlamydia trachomatis*) vorzubeugen (Weber et al. 2001). In der modernen Medizin findet man Silber und Silberverbindungen in der Wundversorgung wieder, beispielsweise als silberbeschichtetes Hautpflaster (Universal MED[®]) oder silberhaltige Hautsprays (Silver activ Fußspray[®], jeweils Firma Hansaplast / Beiersdorf, Hamburg, Deutschland).

Mit Silberionen beschichtete Implantatoberflächen zeigten *in vitro* und *in vivo* im Tierversuch vielversprechende Ergebnisse. In Münster wurden seit 2003 mit Silber beschichtete Tumorendoprothesen bei Patienten mit Knochenmetastasen implantiert. Bisherige Untersuchungen

ergaben eine über Jahre kontinuierliche Silberabgabe in das umgebende Gewebe, ohne dass relevante Nebenwirkungen zu beobachten waren (Ahrens et al. 2006).

Allerdings geben besonders die Ergebnisse der AVERT-Studie (Artificial Valve Endocarditis Reduction Trial) Anlass, Silberbeschichtungen noch weiter auf Toxizität und Zytokompatibilität zu untersuchen. Diese klinische Studie, in der silberbeschichtete künstliche Herzklappen (Silizone[®], Firma St. Jude Medical, St. Paul, Minnesota, USA) implantiert wurden, musste aufgrund nicht vertretbarer Nebenwirkungen, insbesondere Leakagebildungen am Klappenrand durch ein gehemmtes Einwachsen in das umgebende Gewebe und ein erhöhtes Thromboembolierisiko, abgebrochen werden (Schaff et al. 2002; Ionescu et al. 2003). Die im Vorfeld durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Versuche hatten keinerlei Hinweise auf derartige Nebenwirkungen und zytotoxische Erscheinungen gezeigt (Illingworth et al. 1998; Schaff et al. 2002). Eine weitere klinische Studie über die antibakterielle Wirksamkeit von silberbeschichteten Fixateur-externe-Pins, welche im Vorversuch am Schafmodell noch gute Ergebnisse zeigte (Collinge et al. 1994), wurde wegen fehlender signifikanter Überlegenheit der Beschichtung bei deutlich erhöhten Silberserumspiegeln abgebrochen (Massè et al. 2000).

Aufgrund der Erkenntnisse über die Zytotoxizität von Silber wird derzeit anderen antimikrobiell wirkenden Metallen, wie beispielsweise Kupfer, in der aktuellen Forschung besondere Beachtung geschenkt. Kupfer wird in der Industrie aufgrund der antibakteriellen und antifungalen Wirkung unter anderem als sicheres und relativ preiswertes Pestizid in der Landwirtschaft (Epstein et al. 2001) und wegen der algaeziden und bakteriziden Wirkung als Antifoulingfarbe auf Schiffsrümpfen verwendet (Cooney 1995). Durch Kupferzugabe zu Textilien können effektiv Bakterien (gram-positive und gram-negative Erreger, einschließlich MRSA und VRE), Pilze (*Tinea pedis*, *Candidia albicans*), einige Viren (hierbei HIV-1) und Hausstaubmilben abgetötet werden (Borkow et al. 2004; Gabbay et al. 2006). Auch nach längerem Hautkontakt mit dem Kupfer-imprägnierten Gewebe zeigten sich weder im Tierversuch noch in der humanen Anwendung Hautirritationen oder sonstige Hypersensibilitätserscheinungen (Borkow et al. 2004; Gabbay et al. 2006). Durch Zugabe von Kupferionen in das Wasserleitungssystem von Krankenhäusern können Legionellen effektiv bekämpft und so einer Legionellenpneumonie vorgebeugt werden (Weber et al. 2001).

Alle Metallionen wirken ab einer gewissen Konzentration sowohl auf Mikroorganismen, als auch auf menschliche Zellen toxisch. Die Beachtung und Vermeidung einer zu starken Zytotoxizität ist daher von entscheidender Bedeutung in der Entwicklung antimikrobiell wirkender Oberflächenbeschichtungen, da diese ein Einwachsen in das umgebende Gewebe verhindern würde. In einer *in vitro* Studie wurden sowohl Gewebezellen (Fibroblasten und embryonale Osteoblastenvorläuferzellen) als auch Bakterien (*S. epidermidis* und *S. aureus*) unter gleichen Bedingungen verschiedenen Metallionen in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt, um sowohl die zytotoxischen, als auch die antimikrobiellen Eigenschaften der einzelnen Metalle in Relation untersuchen zu können (Heidenau et al. 2005; Haenle 2008). Quecksilber- (Hg^+) und Silberionen (Ag^+) zeigten die höchste bakterizide Wirkung, jedoch waren sie gleichzeitig stark zytotoxisch, weshalb sie sich nicht zur Beschichtung von Implantaten eignen (Heidenau et al. 2005; Haenle 2008). Für Kupferionen (Cu^{2+}) resultierten die besten Ergebnisse, da in diesen Untersuchungen Gewebezellen gegenüber Kupferionen resistenter zu sein schienen als Bakterien, so dass Kupfer in gewissen

Konzentrationsgrenzen bakterizid, jedoch noch nicht zytotoxisch wirkte (Heidenau et al. 2005; Haenle 2008). Dieses veranlasste zu der Schlussfolgerung, dass in gewissen Konzentrationsgrenzen mit Kupferionen ein antibakterielles Milieu erzeugt werden könnte, ohne dabei in gleicher Weise toxisch auf Gewebezellen zu wirken (Haenle 2008). In weiteren *in vitro* Versuchen haben Heidenau et al. (2005) eine spezielle Titanoxid-Schicht, welcher Kupferionen in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt waren, auf ihre antibakterielle und zytotoxische Potenz getestet (Heidenau et al. 2005; Haenle 2008). An humanen Osteoblastenzellen konnte gezeigt werden, dass sowohl die reine Titanoxidschicht (Heidenau et al. 2001), als auch eine kupferhaltige Titanschicht in einfacher Kupferkonzentration keine Hinweise auf eine zytotoxische Effektivität boten. Eine vierfache Kupfer-Beschichtung ergab jedoch eine deutliche Reduktion der Zellzahl (Heidenau et al. 2005; Haenle 2008).

Shirai et al. (2009) konnten durch Kupfer-Titan-Legierungen auf Fixateur-externe-Pins eine signifikante Reduktion des Bakterienwachstums (*S. aureus*, *Escherichia coli* (*E. coli*)) im Vergleich zu reinen Titan- oder Edeltahloberflächen nachweisen. Eine 1%ige Kupfer-Titan-Legierung zeigte *in vivo* zudem ein normales, der Titanoberfläche vergleichbares Einwachsverhalten, wohingegen 5%ige Kupfer-Titan-Verbindungen bereits zytotoxische Effekte aufwiesen. Insgesamt ist bisher allerdings nur wenig über kupferhaltige Oberflächenbeschichtungen in der Orthopädie oder Traumatologie berichtet worden.

1.3 Überblick über Tiermodelle zur experimentellen Untersuchung der Implantat-assoziierten Infektion

Für die Erforschung neuer therapeutischer und prophylaktischer Maßnahmen zur Bekämpfung der Implantat-assoziierten Infektion sind – wie für jede Erkrankung – standardisierte und reproduzierbare Untersuchungsmodelle unabdingbar. Klinisch orientierte Studien sind jedoch aufgrund des vielseitigen Erscheinungsbildes dieser Erkrankung, dem uneinheitlichen Patientenkollektiv und den damit verbundenen diversen Komorbiditäten schwierig, wenn nicht gar unmöglich durchzuführen. Zusätzliche, eine klinische Untersuchung erschwerende Faktoren sind die verschiedenen Mechanismen der Infektionsentstehung, ein heterogenes Keimspektrum mit unbekannter inokulierter Erregermenge, die variable Virulenz der einzelnen Bakterien und – im Hinblick auf klinische Studien – relativ geringe Fallzahlen (Källicke et al. 2004; Patel et al. 2009).

Aufgrund dieser Gegebenheiten kommen vermehrt *in vitro* – Untersuchungen sowie *in vivo* – Modelle am Tier zur Anwendung. Grundlagenkenntnisse über die selektive Wirkung und Verträglichkeit einzelner Substanzen gegenüber bestimmten Bakterien oder Gewebezellen können in *in vitro* – Versuchen erforscht werden, jedoch ist für die Untersuchung der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit neuer Prophylaxe- oder Therapiemaßnahmen *in toto* ein entzündungsfähiges, biologisches System mit lebendem Knochengewebe und einem funktionierendem Immunsystem erforderlich. Statische *in vitro* – Modelle, in denen Effekte unterschiedlicher Substanzen an Bakterien oder Gewebezellen in standardisierten Nährlösungen untersucht werden, sind nicht ausreichend repräsentativ für ein biologisches System, so dass Grenzwerte für Wirksamkeit und Toxizität nur bedingt auf die *in vivo* – Situation übertragen werden können. Da derzeit noch kein adäquates Durchflussmodell existiert,

welches die Einflüsse der Blutzirkulation und des Immunsystems widerspiegelt, müssen Untersuchungen zu Osteomyelitiden am Tiermodell durchgeführt werden.

In der Literatur existieren zahlreiche Modellvorschläge, da diverse Faktoren die Pathogenese und den Verlauf der Implantat-assoziierten Infektion beeinflussen und eine hohe Aussagekraft insbesondere durch die alleinige Variation *eines* Parameters erzielt werden kann (Kälicke et al. 2004). Zusätzlich unterscheiden sich die Tiermodelle im Allgemeinen durch die Art der Pathogenese: Hämatogene Osteitismodelle sind dadurch gekennzeichnet, dass die Erregerinokulation über das Gefäßsystem erfolgt und die Infektionsherde vorwiegend in den Metaphysen langer Röhrenknochen lokalisiert sind. Davon abzugrenzen sind jene Modelle, bei denen die Keime (ohne oder mit zusätzlich eingebrachtem Fremdkörper im Sinne einer Implantat-assoziierten Infektion) direkt in das Knochengewebe appliziert werden; sie imitieren traumatologische oder orthopädische Situationen. Bei den traumatologischen Tiermodellen spielen neben der Implantation von Osteosynthesematerialien auch Frakturen des Knochens, sowie Weichteiltraumen insofern eine Rolle, als dass sie die Blutversorgung des betroffenen Areals beeinträchtigen.

Das älteste publizierte Tiermodell zur Erzeugung einer Osteomyelitis stammt aus dem Jahre 1884. Rodet et al. gelang es, beim Kaninchen durch die intravenöse Injektion einer „Kokkensuspension“ typische Infektionsherde hervorzurufen, welche vorwiegend in der Tibia- und Femurmetaphyse lokalisiert waren. Im Hinblick auf Pathogenese und Morphologie war dieses Modell eng an die akute hämatogene Osteomyelitis angelehnt, welche vor allem bei Kindern zu beobachten ist (Crémieux et al. 1997).

Ein Modell zur zuverlässigen Erzeugung chronisch progressiver Knocheninfektionen, welches in teilweise abgewandelter Form auch heute noch Anwendung findet, wurde rund sechzig Jahre später von Scheman et al. (1941) entwickelt und von Norden et al. (1970) verfeinert. Bei diesem Versuchsaufbau werden geringe Mengen einer sklerosierenden Substanz (Natrium-Morrhuate) intramedullär in den Knochen injiziert und anschließend Bakterien entweder systemisch (intravenös) oder durch lokale Applikation in das Knochenlager dem Tier zugeführt (Crémieux et al. 1997; Kälicke et al. 2004). Natrium-Morrhuate ist ein Fischölprodukt, welches zahlreiche Fettsäuren enthält und aseptische Knochennekrosen hervorruft. Diese bilden einen optimalen Nährboden für pathogene Keime, sodass sich bakterielle Knocheninfektionen mit großer Wahrscheinlichkeit erzeugen lassen (Crémieux et al. 1997). Daher bieten sich Modelle, in denen sklerosierende Substanzen verwendet werden, insbesondere zur Untersuchung therapeutischer Ansätze an, wie beispielsweise den Vergleich unterschiedlicher systemischer Antibiotika-Regime (Rissing et al. 1985; Kälicke et al. 2004). Andriole et al. (1973, 1974) gelang es, durch die Kombination von Infektion, Fraktur und Osteosynthese, ohne die Verwendung sklerosierender Substanzen, zuverlässig chronische Osteomyelitiden am Kaninchen hervorzurufen. Eine Bakteriensuspension (*S. aureus*) wurde durch ein Bohrloch in die proximale Tibiametaphyse injiziert, die Tibia frakturiert und anschließend durch einen intramedullären Pin stabilisiert. Einige Untersuchungstiere erhielten nur die Infektion und den Pin, andere Tiere nur die Tibiafraktur mit nachfolgender Osteosynthese. Durch die Kombination von Fraktur, Infektion und Osteosynthese konnte in 88 % der Fälle mikrobiologisch oder röntgenologisch eine chronische Knocheninfektion über 18 Monate hinweg nachgewiesen werden.

Dieses Modell ist eng an die reelle Situation traumatologisch bedingter, Implantat-assoziiertes Knocheninfektionen angelehnt, allerdings ist durch die Kombination mehrerer Faktoren der Einfluss

jedes einzelnen nicht klar abzuleiten und die Erzeugung identischer Frakturen kann zusätzliche Schwierigkeiten bereiten (Kälicke et al. 2004). Andere Tiermodelle zur Untersuchung traumatologisch bedingter Knocheninfektionen oder des Einflusses verschiedener Osteosynthesematerialien auf die Infektionswahrscheinlichkeit verzichten daher auf die artifizielle Fraktur, um nur den Einfluss *einer* Variablen evaluieren zu können.

So untersuchten Melcher et al. (1994) den Effekt verschiedenartiger Marknägel (hohl oder solide) auf die Inzidenz von Knocheninfektion, indem sie Edelstahlmarknägel in aufgebohrte (nicht frakturierte) Kaninchentibiae einbrachten. Die Markräume wurden zuvor mit einer Bakteriensuspension (*S. aureus*) kontaminiert und abschließend mit sterilem Knochenwachs verschlossen. Nach einem vierwöchigen Untersuchungszeitraum konnte eine signifikant häufigere Infektion bei hohlen im Vergleich zu soliden Marknägeln beobachtet werden.

Arens et al. (1996) untersuchten den Einfluss verschiedener Materialien extramedullär aufgebrachter Osteosynthesematerialien in ähnlicher Weise. Auf die unbeschädigte (nicht frakturierte) Kaninchentibia brachten sie Osteosynthese-Platten wahlweise aus Edelstahl oder aus Titan auf. Nach Verschluss der Weichteile und der Haut wurde durch einen zuvor entlang der Platte belassenen Katheter eine Bakteriensuspension (*S. aureus*) an den Knochen injiziert. Nach einer vierwöchigen Beobachtungsphase konnte nachgewiesen werden, dass in der Titan-Gruppe die Infektionsrate signifikant geringer als in der Edelstahlgruppe war.

Vor dem Hintergrund, bessere Bedingungen zu schaffen, um lokal-konservative sowie operative Therapiestrategien untersuchen zu können, entwickelten Schulz et al. (2001) ein Infektionsmodell am Kaninchenfemur. Mit einer Biopsienadel wurde der Markraum von der Fossa intertrochanterica ausgehend nach distal aufgebohrt und eine geringe Menge Knochenmark aspiriert, um sowohl die intramedulläre Gefäßversorgung zu unterbrechen, als auch um Raum für die anschließende Injektion von Natrium-Morrhuate und einer *S. aureus* – Suspension zu schaffen. Die Biopsienadel wurde verschlossen und in situ belassen. Durch die Kombination dieser manipulierenden Maßnahmen konnte in 100% der Fälle eine chronische Implantat-assoziierte Infektion hervorgerufen werden.

In einem Rattenmodell, mit dem Lucke et al. (2003a) ohne die Verwendung von sklerosierenden Substanzen oder Knochenwachs zuverlässig eine chronische Knocheninfektion hervorrufen konnten, wurde die Effektivität antibiotikahaltiger Oberflächenbeschichtungen getestet. Analog der internen Fraktur-Stabilisierungen durch Marknägel wurden Kirschner-Drähte intramedullär in die Tibia eingebracht, welche wahlweise mit einer speziellen antibiotikahaltigen Oberflächenbeschichtung versehen waren. Vor Implantation wurde eine Bakteriensuspension in den aufgebohrten Markraum appliziert. Mit diesem Modell konnte eine Osteitis sicher und reproduzierbar erzeugt werden, welche der humanen Pathophysiologie und Morphologie histologisch und radiologisch entsprach. Zudem wurde die prophylaktische Effektivität der Beschichtung nachgewiesen.

Eine andere Art von Tiermodell, in dem „prä-kolonisierte“ Implantate verwendet werden, soll insbesondere die Einflüsse des Biofilms, wie beispielsweise veränderte Antibiotikaresistenzen adhärenter Bakterien, aufzeigen. Gracia et al. (1998) entwickelten zu diesem Zweck ein Rattenmodell, mit dem sie die Antibiotikasensitivität der im Biofilm enthaltenen Bakterien *in vivo* untersuchten und die Effektivität unterschiedlicher Antibiotikaregime miteinander vergleichen konnten. Sie inkubierten kleine Metallimplantate (1,5 cm lange Nadelfragmente) über zwölf Stunden in einer Staphylokokkenhaltigen Nährlösung, was zu einer präoperativen Biofilmbildung auf der Oberfläche der Implantate

führte. Diese wurden anschließend zusätzlich zu einer Bakteriensuspension in den aufgebohrten Markraum der Tibiadiaphyse eingebracht, wodurch reproduzierbar Osteomyelitiden erzeugt werden konnten. Im Folgenden erhielten die Ratten unterschiedliche Antibiotikatherapien, deren Wirkung am Implantat und im Knochengewebe nach einer dreiwöchigen Beobachtungs- und Therapiephase verglichen wurde.

In einem sehr ähnlichen Versuchsaufbau gelang es Monzón et al. (2001) nur durch prä-kolonisierte Metallimplantate (ohne die zusätzliche Applikation von Bakteriensuspensionen) zuverlässig chronische Knocheninfektionen der Tibia auszulösen und den Effekt unterschiedlicher systemischer Antibiotikatherapien auf Knochen und Implantat zu vergleichen. Mit diesem Modell wird die konservative Therapie chronischer Infektionen imitiert (Monzón et al. 2001), wohingegen das Modell von Gracia et al. (1998) eher die Situation der operativ sanierten Implantat-assoziierten Infektionen widerspiegelt, in der sich bereits Biofilme auf den Implantatoberflächen ausgebildet haben und zusätzlich Bakterien im umgebenden Weichteilgewebe oder beispielsweise in Spülflüssigkeiten zu finden sind (Gracia et al. 1998).

Aktuellere, traumatologisch orientierte Studien untersuchen die Begleitumstände der Knocheninfektionen, so dass Tiermodelle entwickelt wurden, welche – im Gegensatz zu den oben beschriebenen Modellen – ein Trauma oder Unfallgeschehen so reell wie möglich abbilden und somit eine Fraktur beinhalten. Um eine peritraumatische Immunsuppression (im Sinne einer Interleukin-12 – Depression) nachzuweisen, entwickelten Lindsey et al. (2010) beispielsweise ein Frakturmodell, mit dem sie zu 90-100 % Osteomyelitiden nach stumpfem Trauma erzeugen konnten. Um dieses zu erreichen, wurde Ratten (mit Hilfe eines fallenden Gewichtes aus festgelegter Höhe mit einer standardisierten Kraft) eine stumpfe Femurfraktur mit begleitendem Weichteiltrauma zugefügt und nach operativer Freilegung des Knochens eine Bakteriensuspension (*S. aureus*) in den Frakturspalt appliziert. Anschließend erfolgte die intramedulläre Stabilisierung des Knochens durch einen Kirschner-Draht. Anders als in anderen Fraktur-Modellen wurde in diesem Versuchsaufbau zwischen Injektion der Bakteriensuspension und Stabilisierung der Fraktur eine Wartezeit von einer Stunde eingehalten, in der die infizierte Wunde unbehandelt offen blieb. Somit sollte eine reelle Situation nachempfunden werden, da es regelhaft zu einer Zeitverzögerung zwischen Trauma – Ereignis und Trauma – Versorgung kommt.

Ein weiteres, neues Infektionsmodell wurde von Alt et al. (2011) publiziert, in dem die Frakturheilung und Bildung von infizierten Pseudogelenken nach Tibiaschaftfrakturen untersucht wurden. Das Modell von Lucke et al. (2003a) wurde um den Faktor der Fraktur erweitert, indem Ratten primär eine Tibiaschaftfraktur zugefügt wurde, welche in einem zweiten Schritt intramedullär stabilisiert wurde. Ein Teil der Versuchstiere erhielt eine *S. aureus* – Lösung in den Frakturspalt injiziert, um die Entwicklung von infizierten Frakturen untersuchen zu können. In einer weiteren Neuerung wurde gezeigt, dass Bakterienkolonien mit der Fluoreszenz – In Situ – Hybridisierung (FISH) *in vivo* sichtbar gemacht werden können.

Eher orthopädisch orientierte Studien zur Implantat-assoziierten Infektion befassen sich unter anderem mit der Verträglichkeit und antiinfektiösen Effektivität von Knochenzement, unterschiedlichen Endoprothesenmaterialien oder antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen; des Weiteren sind die Implantate und Infektionsmanifestationen eher metaphysär oder gelenkbeteiligend lokalisiert.

Darouiche et al. (2007) entwickelten ein Tiermodell, mit dem die prophylaktische Effektivität Antibiotika-haltiger Oberflächenbeschichtungen auf orthopädischen Implantaten *in vitro* und *in vivo* untersucht werden konnte. Für die *in vivo* – Untersuchungen am Kaninchen wurde nach operativer Freilegung der Kniegelenkflächen vom Tibiaplateau ausgehend ein Kanal in die Metaphyse gebohrt, in dessen Tiefe die Keimapplikation (*S. aureus*) erfolgte. Im Anschluss wurde der Kanal mit Titanschrauben verschlossen, welche wahlweise mit einer Antibiotikakombination aus Rifampicin und Monocyclin beschichtet waren. Mit diesem Verfahren konnte in der Kontrollgruppe, in der unbeschichtete Schrauben verwendet wurden, eine mikrobiologisch nachweisbare Infektion sicher erzeugt werden. Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Reduktion der Infektionsraten in der Antibiotika-Gruppe.

In einem Hundemodell von Petty et al. (1985) konnten die Einflüsse unterschiedlicher Endoprothesenmaterialien (Edelstahl, Kobalt-Chrom-Legierungen, Polyethylen und Knochenzement (Polymethylmethacrylat, PMMA)) auf die Entwicklung von Implantat-assoziierten Infektionen untersucht werden. Vom Trochanter major ausgehend wurde der Markraum des Femurs eröffnet, Spongiosa entfernt und Bakterien (*S. aureus*, *S. epidermidis* oder *E. coli*) in die Tiefe des Bohrlochs appliziert. Anschließend wurde dieses durch einen Zylinder unterschiedlichen Materials verschlossen. In diesem Experiment konnte insbesondere für Knochenzement eine signifikant geringere Keimdosis zur Erzeugung einer Infektion ermittelt werden. Ähnliche Ergebnisse für die Infektionsförderung von Knochenzement zeigten sich in einem Hundemodell von Fitzgerald et al. (1983). Auf Höhe der proximalen Tibiametaphyse wurde ein Knochenfenster (1 cm²) aus der Kortikalis herausgetrennt, die darunter liegende Spongiosa entfernt und eine Bakteriensuspension (*S. aureus*) appliziert. Anschließend wurde der Defekt mit Knochenzement (PMMA) verschlossen. Mit dieser Methode konnte bei allen Versuchstieren klinisch, radiologisch, mikrobiologisch und histologisch eine subakute Knocheninfektion erzeugt und nachgewiesen werden. Die prophylaktische Verwendung von Gentamicin-impregniertem Knochenzement verhinderte in 9 von 10 Fällen eine Infektion, jedoch zeigte sich kein Einfluss auf bereits etablierte Knocheninfektionen.

Die Wirksamkeit von antibiotikahaltigem Knochenzement auf die Ausbildung von Implantat-assoziierten *Gelenk*infektionen wurde im Wesentlichen in drei sich ähnelnden Tiermodellen untersucht (Schurman et al. 1978; Blomgren et al. 1981; Belmatoug et al. 1996). Kaninchen wurden ein- oder beidseitig Kniegelenk-Endoprothesen implantiert, welche entweder aus Knochenzement geformt waren, in welchen Edelstahlzylinder eingelassen wurden (Schurman et al. 1978), oder aus humanen Fingermittelgelenk- (Blomgren et al. 1981) oder Mittelfußgelenk-Endoprothesen bestanden (Belmatoug et al. 1996). Die Verankerung der Implantate im Knochenlager erfolgte wahlweise mit purem oder gentamicinhaltigem Zement. Den Tieren wurden unmittelbar nach Wundverschluss intraartikulär (Schurman et al. 1978; Belmatoug et al. 1996) oder mit einer Latenz von 6-8 Wochen intravenös (Blomgren et al. 1981) eine Bakteriensuspensionen appliziert. In den Versuchen konnten zuverlässig Kniegelenksinfektionen nachgewiesen werden, welche zu Knochendestruktion und Implantatlockerungen führten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass gentamicinhaltiger Knochenzement bei unmittelbar postoperativer Bakterienapplikation zuverlässig vor Gelenkinfektionen schützt (Schurman et al. 1978), jedoch bei späten Kontaminationen dadurch eine Infektion nicht mehr zu verhindern ist (Blomgren et al. 1981).

Kürzlich publizierten Bernthal et al. (2010) ein Mausmodell, mit dem im Sinne eines präklinischen Screenings neue Therapie- und Prophylaxemethoden, wie etwa spezielle Oberflächenbeschichtungen, auf ihre Wirksamkeit *in vivo* untersucht werden können, bevor Untersuchungen an größeren Tieren oder am Menschen erfolgen. Nach Eröffnung des Kniegelenkes wurde der Markraum des Mäusefemurs retrograd aufgebohrt und ein Kirschner-Draht so im Kanal platziert, dass das distale Ende 1 mm in das Kniegelenk hinein ragte. Anschließend wurde eine Bakteriensuspension in das Kniegelenk appliziert und die Wunde verschlossen. Durch Verwendung eines fluoreszierenden *S. aureus* – Stammes konnte *in vivo* das Ausmaß der Entzündung in Abhängigkeit der applizierten Keimmenge und daraus resultierenden akuten oder eher chronisch – persistierenden Verläufen beobachtet werden. Des Weiteren wurde im Rahmen des Versuches die prophylaktische Effektivität einer antibiotikahaltigen Oberflächenbeschichtung gezeigt.

Es ist allgemein gültig, dass neue Technologien, neue Therapie- und Prophylaxestrategien nach *in vitro* – Untersuchung ausgiebig am Tier getestet werden müssen, bevor sie am Menschen zur Anwendung kommen. Die vielen unterschiedlichen ätiologischen und pathophysiologischen Aspekte, welche die Entstehung, sowie die Behandlung einer Implantat-assoziierten Infektion beeinflussen, lassen verstehen, warum in der Literatur eine große Anzahl unterschiedlicher Tiermodelle zur Erzeugung dieses Infektionstypus existieren (Alt et al. 2011).

Und dennoch werden Tiermodelle die komplexe Situation im menschlichen Organismus nie in Gänze repräsentieren können.

1.4 Aufgabenstellung

Im vorangegangenen Teil dieser Arbeit wurden die Problematik der Implantat-assoziierten Infektion sowie die daraus resultierende Notwendigkeit zu vorbeugendem Handeln ausführlich beleuchtet.

Vor allem die Komplikationen einer prophylaktischen Antibiotikagabe veranlassten Heidenau et al. 2005 dazu, eine spezielle Oberflächenbeschichtung zu entwickeln, welche als antimikrobiellen Wirkstoff Kupfer anstelle eines Antibiotikums enthält (Heidenau et al. 2005; Haenle et al. 2008, 2011). In *in vitro* – Versuchen gelang es bereits, die antibakterielle Potenz und geringe Zytotoxizität dieser kupferhaltigen Titanoxid – Oberflächenbeschichtung nachzuweisen (Heidenau et al. 2005; Haenle et al. 2008, 2011), so dass im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchung *in vivo* durchgeführt werden soll. Wie bereits dargestellt, publizierten Lucke et al. (2003a) einen neuen Versuchsaufbau, mit dem Implantat-assoziierte Infektionen im Tiermodell erzeugt werden können, welche der humanen Pathophysiologie weitestgehend entsprechen.

Die überzeugenden Ergebnisse legten eine Anwendung des Modells zur Überprüfung des prophylaktischen Nutzens sowie möglicher Toxizitäten der kupferhaltigen Oberflächenbeschichtungen nahe.

Aufgrund der Versuchsentwicklung wurde die Aufgabenstellung im Verlauf ausgeweitet, so dass in einem zweiten Schritt eine Optimierung des ursprünglichen Infektionsmodells erarbeitet und vorgestellt werden soll. Wesentliche Aufgaben waren hierbei die Entwicklung eines orthopädisch orientierten Infektionsmodells, die Optimierung möglicher Schwachstellen des primären Versuchsaufbaus im Rahmen des örtlichen Settings, sowie die Ermittlung der optimal in den Knochen einzubringenden Bakterienmenge, um eine Infektion sicher auslösen zu können.

Die konkrete Aufgabenstellung lautete somit:

- Anwendung des publizierten Infektionsmodells nach Lucke et al. (2003a) zur Erzeugung Implantat-assoziierten Infektionen
- Sichere und reproduzierbare Erzeugung einer Implantat-assoziierten Infektion
- Vergleich unterschiedlicher Oberflächenbeschichtungen hinsichtlich der antimikrobiellen Potenz sowie Toxizität *in vivo*

Des Weiteren sollten folgende Aspekte erarbeitet werden:

- Weiterentwicklung des Infektionsmodells zu einem orthopädischen, Endoprothesen-orientierten Modell
- Optimierung des primären Modells
- Ermittlung der optimalen inokulierten Bakterienmenge

2 Material und Methoden

2.1 Intramedulläres Infektionsmodell zur Untersuchung einer antimikrobiellen Oberflächenbeschichtung

2.1.1 Material

Pin

Es wurden Kirschner-Drähte aus TiAl6V4 von der Firma Synthes GmbH & Co.KG (Tuttlingen, Deutschland) verwendet. Die Länge betrug 20 mm, der Durchmesser 0,8 mm.

Diese Drähte werden im Folgenden als 'Pin' bezeichnet (Abbildung 1).

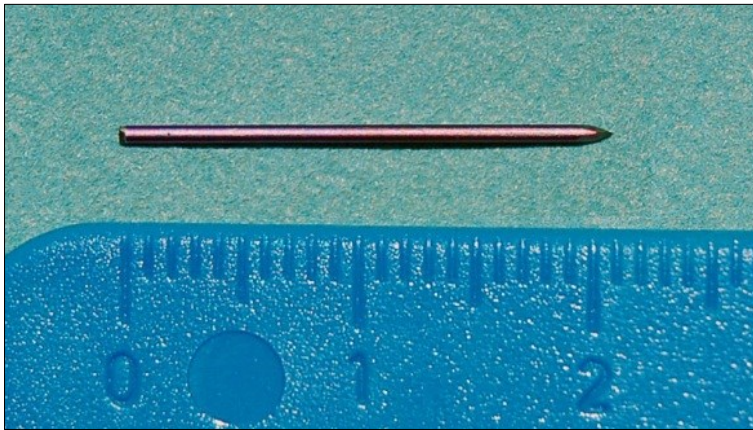


Abbildung 1: Pin aus TiAl6V4 zur intramedullären Implantation in die Tibia nach Inokulation einer Bakteriensuspension in den Markraum. Die Pinoberfläche kann mit unterschiedlichen Beschichtungen versehen werden.

Die Pins wurden vom Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien (Bayreuth, Deutschland) durch Tauchbeschichtung mit einer (Sol-Gel-abgeleiteten) Titanoxid-Schicht (TiO_2) versehen, die flächendeckende Schichtdicke betrug circa 140 nm. Neben unbeschichteten TiAl6V4-Pins, wurden reine TiO_2 -Beschichtungen, sowie kupferhaltige Schichten in einfacher (0,1 mmol/l) und dreifacher Kupfer-Konzentration (0,3 mmol/l) verwendet.

Biologische Materialien

Bakterien

- *Staphylococcus aureus* (Stamm ATCC 25923, Subspecies *Staphylococcus aureus* Rosenbach) – biofilmbildend; (im Folgenden als *S. aureus* bezeichnet)
- *Staphylococcus epidermidis* (Stamm ATCC 35984, RP 62A; im Folgenden als *S. epidermidis* bezeichnet)

Beide Stämme wurden als eingefrorene Bakteriensuspensionen mit 1×10^8 KBE/ml (Kolonie-bildende Einheiten pro Milliliter) vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt.

Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche Ratten der Rasse *Sprague Dawley* (CRL:CD (SD), Firma *Charles River Laboratories*, Sulzfeld, Deutschland), im Alter von durchschnittlich 10 Wochen, mit einem Körpergewicht von 200 – 300 g.

2.1.2 Methoden

Herstellung der Keimsuspension

Die Herstellung der Keimsuspension erfolgte durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock.

Mit Bakterienkolonien aus Stammkulturen der Referenzstämmen *Staphylococcus aureus* subspecies *aureus* Rosenbach ATCC 25923 und *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 wurden Blutagar- / Columbia-Platten (Firma Becton & Dickons, Heidelberg, Deutschland) beimpft und für 24 Stunden bei 36 ± 1 °C kultiviert. Kolonien von diesen Platten dienten als Inokulum für eine Übernachtskultur in Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CSB aus hauseigener Herstellung - Kulturbedingungen 36 ± 1 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre), welche als Impfmateriale für die Hauptkultur unter gleichen Wuchsbedingungen diente. Der Wuchs wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) verfolgt. Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen sedimentiert (4 °C, 4000 U/m für 5 min) und zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS *engl.*: phosphate buffered saline; pH 7,4) gewaschen.

Anschließend wurde die Bakteriensuspension in PBS mit dem Gefrierschutz Dimethylsulfoxid (DMSO, 10 %ig) resuspendiert und auf eine optische Dichte von OD₆₀₀ = 0,5 eingestellt. Dies entsprach einer Keimmenge von 1×10^8 KBE/ml. Die Korrelation der Keimkonzentration mit der OD wurde in Vorversuchen durch Ausplattieren der Keimsuspension ermittelt.

Die Bakteriensuspension wurde in sterilen 1 ml-Eppendorf-Gefäßen bei - 80 °C tiefgefroren.

Die Überlebensrate der Bakterien nach dem Auftauen wurde in Vorversuchen überprüft.

Tierexperimentelle Untersuchungen

Tierhaltung

Die tierexperimentellen Untersuchungen sind durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt worden (Aktenzeichen: LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-032/06).

Eine artgerechte Unterbringung der Versuchstiere erfolgte entsprechend der Richtlinien zur Versuchstierhaltung (EU-Richtlinie 2010/63). Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere für mindestens eine Woche akklimatisiert, jeweils zwei Tiere wurden in einem Käfig gehalten und als Nahrung standen ihnen kommerzielle Pellets (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) sowie

Trinkwasser ad libitum zur Verfügung, welches täglich gewechselt wurde. Ein Tag-Nacht-Rhythmus wurde über Kunstlicht simuliert.

Implantation des Pins und Erzeugen einer Implantat-assoziierten Infektion

Zur Erzeugung einer Knocheninfektion fand das Modell zur Osteomyelitis-Induktion nach Lucke et al. (2003a) Anwendung.

Narkose

Die vorbereitenden Schritte zur Operation sowie die Implantation des Probekörpers erfolgten unter Allgemeinanästhesie. Diese wurde durch eine intramuskuläre Injektion (linkes Hinterbein) einer gewichtsadaptierten Dreifachkombination aus Medetomidin (150 µg/kg KG), Midazolam (200 µg/kg KG) und Fentanyl (5 µg/kg KG) (KG Körpergewicht) in einer Mischspritze erzielt.

Operatives Vorgehen

Die Implantation des Pins erfolgte unter sterilen Operationsbedingungen.

Als vorbereitende Maßnahme wurde das rechte Hinterbein großzügig im Bereich des Oberschenkels bis zum Sprunggelenk rasiert (Krankenhaus-Fertig-Rasierer, unsteril, Firma Wilkinson sword, Solingen, Deutschland) und inklusive des Fußes gründlich mit Octeniderm® (Firma Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland) gereinigt und desinfiziert. Um einer intraoperativen Auskühlung vorzubeugen wurden die Ratten auf einem Wärmekissen gelagert (Firma Sanitas, Uttenweiler, Deutschland). Die sterile Abdeckung des Tieres erfolgte proximal des Kniegelenkes durch ein selbstklebendes Epidural-Tuch (Firma Barrier, Mölnlycke Health Care, Erkrath, Deutschland). Der rechte Fuß wurde separat mit Foliodrape® (OP-Tape, Firma Hartmann, Heidenheim, Deutschland) abgedeckt (Abbildung 2 a). Im Anschluss erfolgte ein Wechsel der sterilen Handschuhe.

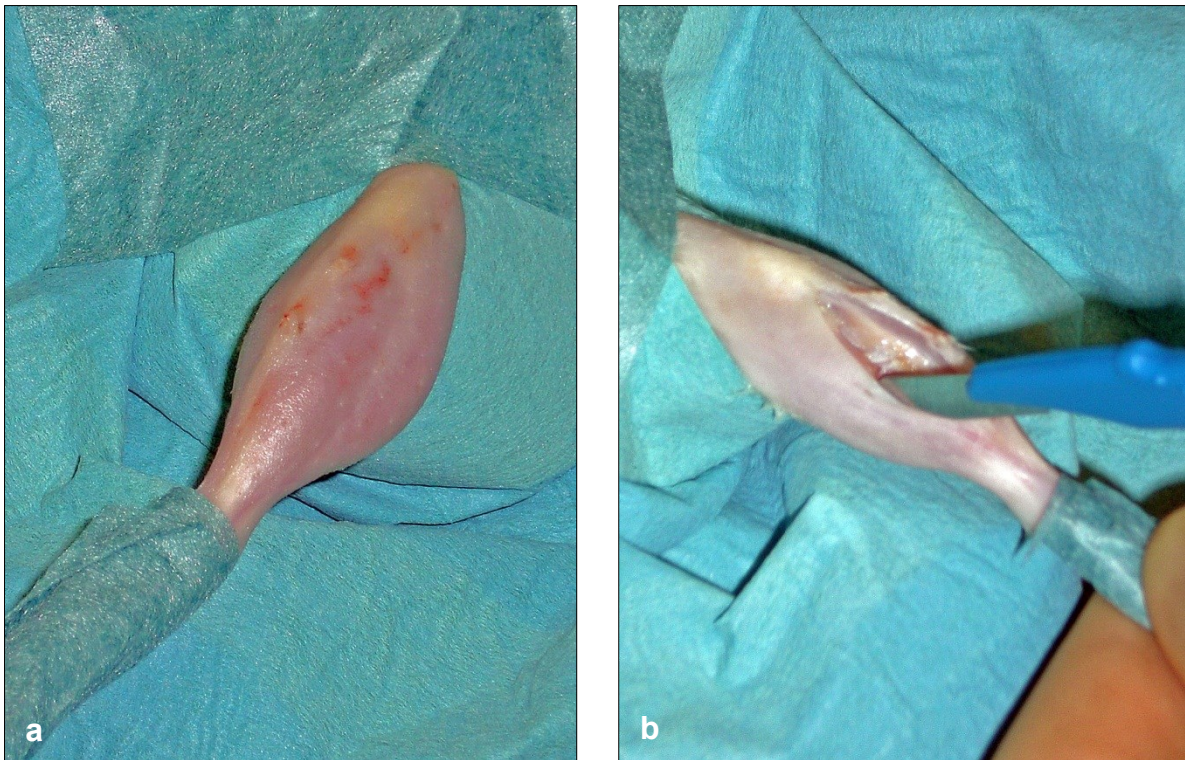


Abbildung 2: a) Sterile Abdeckung des linken Hinterbeines mit selbstklebendem OP-Abdeckmaterial nach Rasur und Desinfektion der Haut. b) Hautschnitt entlang der Tibia mit einem Skalpell; die knöchernen Tibiavorderkante schimmert als weiße, strichförmige Struktur zwischen den umgebenden Muskeln durch.

Haut und Faszie wurden medial über der proximalen Metaphyse der Tibia in einer Länge von circa 1 cm mit dem Skalpell (Präzisa plus, Nr.10; Firma Dahlhausen, Köln, Deutschland) durchtrennt (Abbildung 2 b). Die proximale Tibia wurde vorsichtig freipräpariert und die Kortikalis mit Hilfe einer sterilen Kanüle (BD Microlance™3 18G; 1,2 x 50 mm) durchbrochen (Abbildung 3 a). Der so eröffnete metaphysäre Markraum wurde mit einem Kirschner – Draht (Durchmesser 1,0 mm, Firma Synthes GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) für etwa 20 mm nach distal aufgebohrt (Abbildung 3 b).

Zur Infektion der Markhöhle wurden jeweils 10 µl der Bakteriensuspension (*S. aureus* bzw. *S. epidermidis*, 1×10^8 KBE/ml) mittels einer Hamilton®-Spritze (Microliter™ Syringes, 25µl, Nr. 720 LT, Firma Hamilton®, Bonaduz, Schweiz) in den Bohrkanal appliziert (Abbildung 4 a). Die Kontrollgruppe erhielt als Negativkontrolle anstelle der Bakteriensuspension 10 µl einer sterilen PBS-Puffer-Lösung. Nach Inokulation der Bakterien bzw. der sterilen Lösung wurde ein steriler Pin in die Markhöhle eingesetzt (Abbildung 4 b), welcher jeweils mit einer der Versuchsgruppe entsprechenden Beschichtung versehen war.

Haut und Faszie wurden durch Einzelknopfnahmt mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 5-0, Firma Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland) verschlossen und abschließend mit einem Wundverband aus Sprühpflaster (Opsite®, Firma Smith & Nephew Medical Ltd., Hamburg, Deutschland) versehen. Auf eine erneute Desinfektion der Weichteile nach Setzen der Knocheninfektion (analog Lucke et al. 2003a) wurde aufgrund möglicher Beeinflussung der Bakterien im Markraum verzichtet.

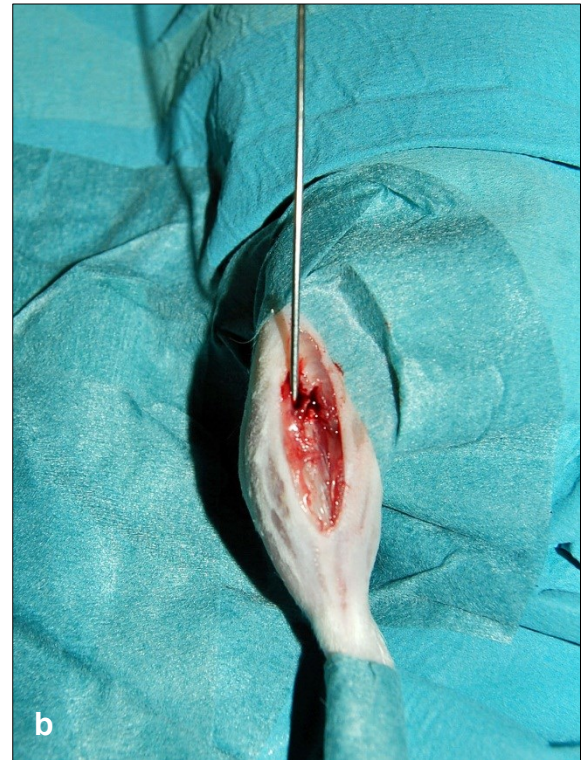
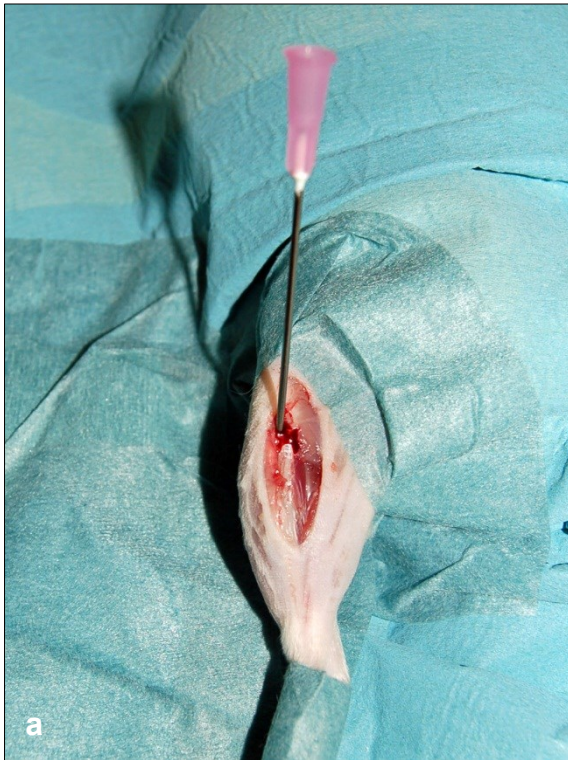


Abbildung 3: a) Aufbohren der Kortikalis mit einer sterilen Kanüle (20G) und b) Eröffnung des Markraums sowie Aufbohrung in antegrader Richtung für etwa 20 mm mit einem Kirschner-Draht (1 mm Durchmesser).

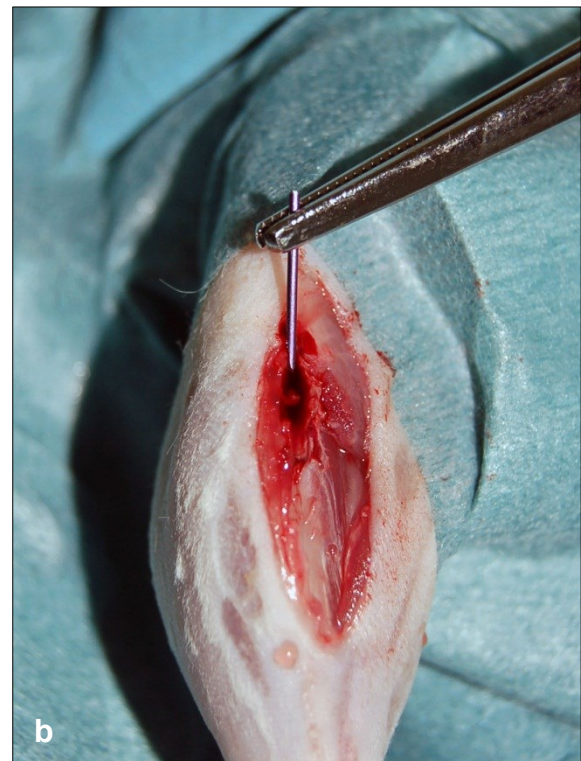
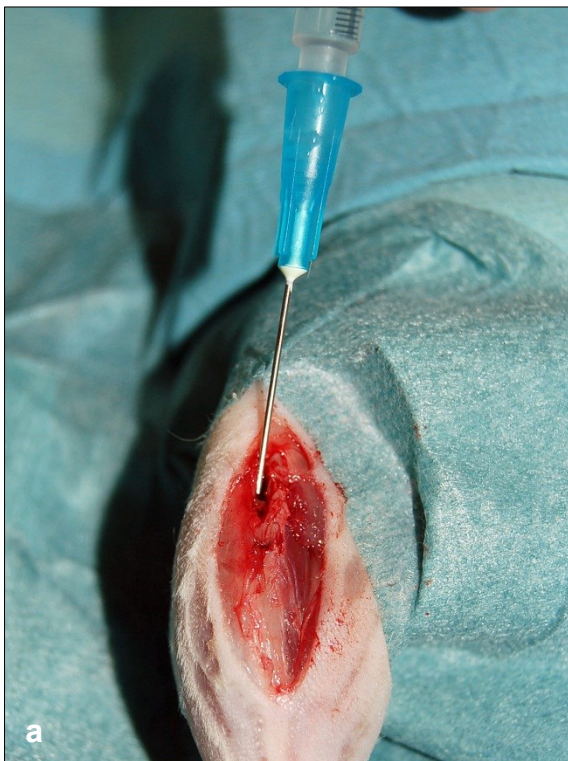


Abbildung 4: a) Injektion von 10 µl der Bakteriensuspension in die Tiefe des aufgebohrten Markraumes mit einer Hamilton®-Spritze. b) Anschließend wird der Pin in die Markhöhle eingebracht und nach distal vorgeschoben.

Postoperative Schmerztherapie und Antagonisierung der Narkose

Nach Operationsende erfolgte eine subkutane Injektion von Buprenorphin (0,05 mg/kg KG) zur Schmerzbekämpfung, sowie die gewichtsadaptierte Antagonisierung der Narkose durch eine subkutane Gabe von Atipamezol (750 µg/kg KG), Flumazenil (200 µg/kg KG) und Naloxon (120 µg/kg KG) in einer Mischspritze.

Des Weiteren wurden während der ersten drei Tage post operationem jeweils 50 Tropfen Metamizol zur Schmerzlinderung dem Trinkwasser (5 %ige Glucoselösung) zugefügt. Von einer darüber hinaus gehenden Analgesie wurde aufgrund möglicher Beeinflussung der Infektionsentstehung abgesehen.

Verlaufskontrollen

Postoperativ wurden die Tiere für circa 7 Tage bis zu einem sicheren Wundverschluss in Einzelkäfigen gehalten. Anschließend befanden sich jeweils zwei Tiere, die mit dem gleichen Keim infiziert waren, in einem Käfig. Die Kennzeichnung der Tiere erfolgte sowohl durch eine Markierung des Schwanzes, welche regelmäßig kontrolliert und gegebenenfalls erneuert wurde, als auch durch genaue Beschriftung der Käfige.

Die Tiere wurden am dritten Tag post operationem und im Verlauf wöchentlich untersucht. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf Aktivität und Wundheilung gelegt. Des Weiteren wurden die Tiere gewogen und die Körpertemperatur bestimmt. Jeweils an Tag 0, 21 und 42 des Beobachtungsintervalls fand zusätzlich eine Röntgen-Kontrolle des infizierten Beines in Allgemeinanästhesie statt.

Euthanasie und Probengewinnung

42 Tage nach Implantation des Pins und Setzen der Knocheninfektion erfolgte die Euthanasie und Probengewinnung. Nach einer abschließenden klinischen Untersuchung, sowie Gewichts- und Körpertemperaturbestimmung wurde bei den Tieren in Allgemeinanästhesie eine Röntgenaufnahme des rechten Hinterbeines im seitlichen Strahlengang angefertigt und eine perkutane, intrakardiale Punktion zur Entnahme von 5 ml Blut für das Ansetzen einer Blutkultur durchgeführt (Blutkulturflaschen: aerob, Firma BioMerieux, Marcy L'Etoile, Frankreich).

Die Euthanasie erfolgte gemäß der EU-Richtlinien unter Narkose durch eine intrakardiale Injektion von Pentobarbital – Natrium in Überdosierung (80 mg/kg KG).

Zur Probengewinnung unter sterilen Kautelen wurde das gesamte rechte Hinterbein rasiert und einschließlich des Fußes mit Octeniderm[®] gereinigt und desinfiziert. Eine sterile Abdeckung des Tieres proximal des Kniegelenkes und distal des Sprunggelenkes fand entsprechend der Abdeckung bei Implantation statt.

Nach Handschuhwechsel wurde die primäre Operationsnarbe wiedereröffnet und ein Abstrich (Stieltupfer, trocken, Firma greiner-bio, Frickenhausen, Deutschland) von der Implantationsstelle genommen. Zur Entnahme der Tibia und des Pins wurde der Knochen durch einen Schnitt medial entlang der Tibia vom Knie- bis zum Sprunggelenk freigelegt, der Fuß im Sprunggelenk exartikuliert und abgesetzt. Nach vorsichtiger Entfernung des Weichteilmantels erfolgte die Exartikulation der Tibia und Fibula im Kniegelenk. Der Pin wurde mit Hilfe einer Pinzette aus dem Knochen entfernt und mit einer Zange halbiert (Abbildung 5 a und b).

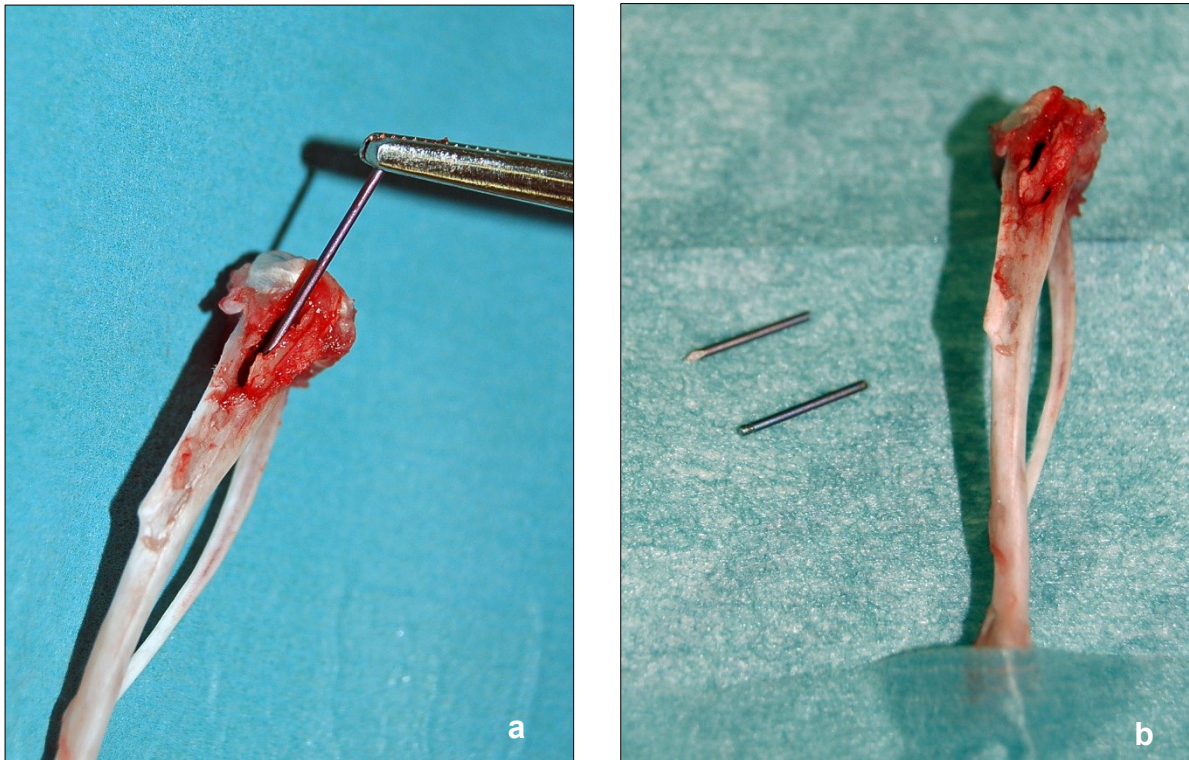


Abbildung 5: a) Zu sehen ist die exartikulierte Tibia, der Weichteilmantel wurde entfernt, der Pin wird mit Hilfe einer Pinzette aus dem Marklager gezogen. Abbildung b) zeigt die Präparate, wie sie weiter untersucht werden: der Pin ist mit einer sterilen Zange halbiert worden, um sowohl mikrobiologisch als auch rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden zu können.

Zur weiteren Verarbeitung und Analyse der Proben wurden diese wie folgt an die jeweiligen Institute weitergeleitet:

Die trocken gelagerte Tibia, die Abstriche und eine Hälfte des Pins (in 2 ml steriler PBS-Lösung) wurden unmittelbar nach Probenentnahme dem mikrobiologischen Labor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock übergeben. Hier wurden die mikrobiologischen Untersuchungen durchgeführt.

Für die histologische Aufarbeitung der Proben wurden die Knochen in Formalin (Formafix 4 %ig; Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow, Deutschland) eingebettet und an das Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Rostock weitergeleitet.

Für eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (REM) wurde die zweite Hälfte des Pins trocken in einem sterilen Eppendorfgefäß gelagert und an das Elektronenmikroskopische Zentrum der Universität Rostock gegeben.

Mikrobiologische Analysen der Proben

Die mikrobiologische Aufarbeitung der Proben erfolgte durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock.

Wundabstrich und Blutkultur

Für den Nachweis von Bakterien im Wundabstrich wurden die Stieltupfer in Herz-Hirn-Bouillon (BHI) 48 Stunden bei 36 ± 1 °C bebrütet.

Getrübte Suspensionen wurden zum Nachweis von *S. aureus* und *S. epidermidis* auf Columbia-Blutagarplatten ausgestrichen. Ein weiterer Ausstrich auf Schaedler-Platten (jeweils Firma Becton & Dickons, Heidelberg, Deutschland) diente dem zusätzlichen Nachweis anaerober Keime. Die Platten wurden unter den jeweils erforderlichen Bedingungen (bei 36 ± 1 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre, bzw. unter anaeroben Bedingungen) 48 Stunden bebrütet.

Die Blutkulturflaschen wurden im *BactAlert*-Automaten (Firma BioMerieux, Marcy L'Etoile, Frankreich) bei 37 °C für sieben Tage bebrütet und etwaiges Keimwachstum anschließend analysiert.

Die Differenzierung in *S. aureus* und *S. epidermidis* erfolgte sowohl mikroskopisch im gram-gefärbten Präparat, als auch aufgrund der Hämolyseeigenschaften auf Blutagar; des Weiteren wurde die Katalase-Aktivität durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (H₂O₂, 3 %) gemessen und die Expression des Clumping-Faktors durch den Latex-Test *BBL-Staphyloside* (Firma Becton & Dickons, Heidelberg, Deutschland) überprüft. Konnten *S. aureus*-Kolonien nachgewiesen werden, wurden die Keime durch vergleichende Stamm-DNA-Bestimmung (Spa-Typisierung) mit dem Ausgangskeim abgeglichen.

Die Ergebnisse der Wundabstriche und Blutkulturen wurden bei Bakteriennachweis als positiv bezeichnet, eine Quantifizierung der Bakterienmenge fand nicht statt.

Quantitativer Bakteriennachweis an der Tibia und am Pin

Ermittlung der Keimzahl im Tibiapräparat

Das Tibiapräparat wurde bei –80 °C für 60 Minuten tiefgekühlt und anschließend unter sterilen Bedingungen mit der Knochenmühle (Kugelmühle bei Stärke 35 über 5 min.; Firma Retsch, Haan, Deutschland) zu einem Pulver zermahlen. Nach Bestimmung des Gewichtes wurde das Knochenpulver in definierte Mengen PBS-Puffer suspendiert. Durch Plattierung der Suspension (1 ml) auf Columbia-Blutagarplatten (Firma Becton & Dickons, Heidelberg, Deutschland – Bebrütung: 24 Stunden, 37 °C, 5 %ige CO₂-Atmosphäre) wurde die Keimzahl ermittelt.

Die Angabe der Keimzahl erfolgte in KBE/ml, genormt auf ein durchschnittliches Knochenpulver-Gewicht von 0,8 g.

Ermittlung der Keimzahl am Pin nach Sonikation und im Sediment

Ein halber Pin wurde unter sterilen Bedingungen gewogen und anschließend in einem Glasröhrchen mit 2 ml PBS-Puffer im Ultraschallwasserbad (Hochleistungs-Ultraschall Reinigungsgerät, Sonorex Digital DK 255P, Firma Bandelin, Berlin, Deutschland) 5 min bei 100 % beschallt, um alle im Biofilm enthaltende Bakterien zu lösen. Aus der so gewonnenen Bakteriensuspension wurde die Keimzahl

durch Ausplattieren (1 ml Suspension) ermittelt (ebenfalls auf Columbia-Blutagarplatten (Firma Becton & Dickons, Heidelberg, Deutschland) Bebrütung: 24 Stunden, 37 °C, 5 %ige CO₂-Atmosphäre).

In einem weiteren Schritt wurde die Bakteriensuspension bei 8000 U/m 10 Minuten zentrifugiert und das Sediment in PBS-Puffer resuspendiert. Aus dieser Bakteriensuspension wurde ebenfalls wie oben beschrieben die Keimzahl ermittelt.

Die Angabe der Keimzahl erfolgte jeweils in KBE/ml, auf ein durchschnittliches Pin-Gewicht von 0,02 g genormt.

Bildgebende und histologische Analysen der Proben

Radiologische Diagnostik

Röntgenkontrollen des operierten Beines in seitlichem Strahlengang (54kV, 0,5mAs, Dosis < 1, 1m FFA; Kodak Insight SC400; Siremobil 2000, Firma Siemens, München, Deutschland) erfolgten zu oben genannten Zeitpunkten unter Allgemeinanästhesie. Die Röntgen-Aufnahmen wurden entsprechend des Osteomyelitis-Modells nach Lucke et al. (2003a) ausgewertet.

Hierbei wurden folgende anatomische Strukturen (Regionen) der Tibia gesondert betrachtet und separat evaluiert (siehe Abbildung 6):

- die proximale Meta- und Epiphyse (R1)
- die Diaphyse (R2)
- die distale Meta- und Epiphyse (R3)

Für jeden Bereich wurden Punktzahlen von 0 – 3 entsprechend der Ausprägung verteilt:

- „fehlend“ (0 P)
- „milde Ausprägung“ (1 P)
- „moderate Ausprägung“ (2 P)
- „starke Ausprägung“ (3 P)

Folgende Parameter wurden evaluiert:

- Periostale Reaktion
- Osteolysen
- Weichteilschwellung
- Deformitäten
- Sequesterbildung



Abbildung 6: Darstellung der Regionen R 1-3

Rasterelektronenmikroskopie

Die Aufarbeitung der Pins für die rasterelektronenmikroskopische Beurteilung erfolgte durch das Elektronenmikroskopische Zentrum der Universität Rostock.

Die zweite Pinhälfte wurde in einer 2,5 %igen Lösung aus Glutardialdehydlösung 25 % (Firma MERCK, Darmstadt, Deutschland) und Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) in einer 24-wellcon-Platte sieben Tage bei 2-8 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine Kritischpunkt-Trocknung in aufsteigender Alkoholreihe (Acetongehalt 30 % - 100 %, bei 40 °C und 85 bar). Mit einer abschließenden Vergoldung (Besputterung; SCD 004 Balzers Sputter Coater; Bal Tec AG, Fürstentum Liechtenstein) wurden die Präparate konserviert und mit Hilfe des Zeiss Elektronen Mikroskops (DSM 960A, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) die Oberflächen der Pins auf eine mögliche Biofilmbildung untersucht.

Histologische Aufarbeitung

Die histologische Aufarbeitung der Knochen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Universitätsmedizin Rostock.

Nach zehntägiger Fixierung in Formalin (Formafix 4 %ig) wurden die Knochen für die Darstellung mineralisierten Gewebes in einem Kunststoff auf Methylmethacrylatbasis (MMA) eingebettet (Technovit® 9100, Firma Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland). Anschließend wurden Longitudinalschnitte in sagittaler Ebene angefertigt (Rotationsmikrotom Leica RM 2065 Supercut, Solms, Deutschland) und nach Masson-Goldner gefärbt.

Die Schnitte wurden in vierfacher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Nikon TS 100, Düsseldorf, Deutschland) evaluiert.

2.2 Entwicklung eines metaphysären Infektionsmodells

Basierend auf dem Verlauf sowie den Erkenntnissen des zuvor dargestellten Tierexperiments wurde ein neues, metaphysäres Tiermodell erarbeitet, welches speziell im Rahmen der orthopädischen Endoprothetik der Testung antimikrobieller Oberflächenbeschichtungen, sowie lokal applizierter Wirkstoffe dienen soll. Zu diesem Zweck wurde die Infektionslokalisierung aus der gut durchbluteten diaphysären Markhöhle in die Metaphyse der Tibia verlagert, wodurch die Verankerung orthopädischer Implantate abgebildet wird. Des Weiteren wurde der Pin durch ein kortikal abschließendes, neu entwickeltes Implantat ersetzt.

Zur Etablierung des Modells wurde eine nahezu 100 %ige, konstante Infektionsauslösung angestrebt.

2.2.1 Material

Implantat

Es wurde ein kegelförmiges Implantat aus TiAl6V4 verwendet, welches durch FORBIOMIT, Forschungslabor der Orthopädischen Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Rostock, entwickelt wurde und einen zentralen Kanal besitzt, über den Lösungen reproduzierbar appliziert werden können (Abbildung 7 a und b; Abbildung 8). Das Implantat weist folgende Maße auf: Durchmesser Oberseite 3 mm, Unterseite 2 mm, Länge 3 mm, Mantelfläche 28 mm².

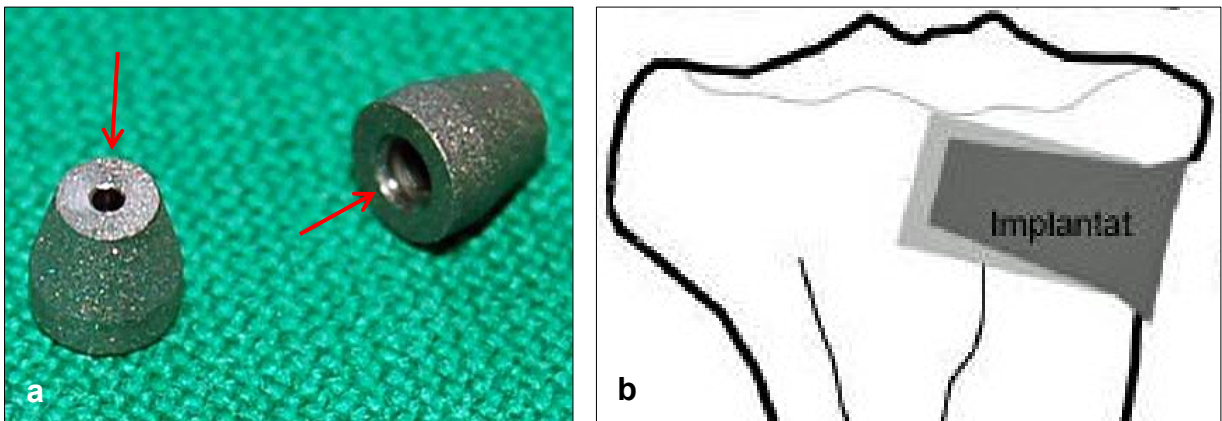
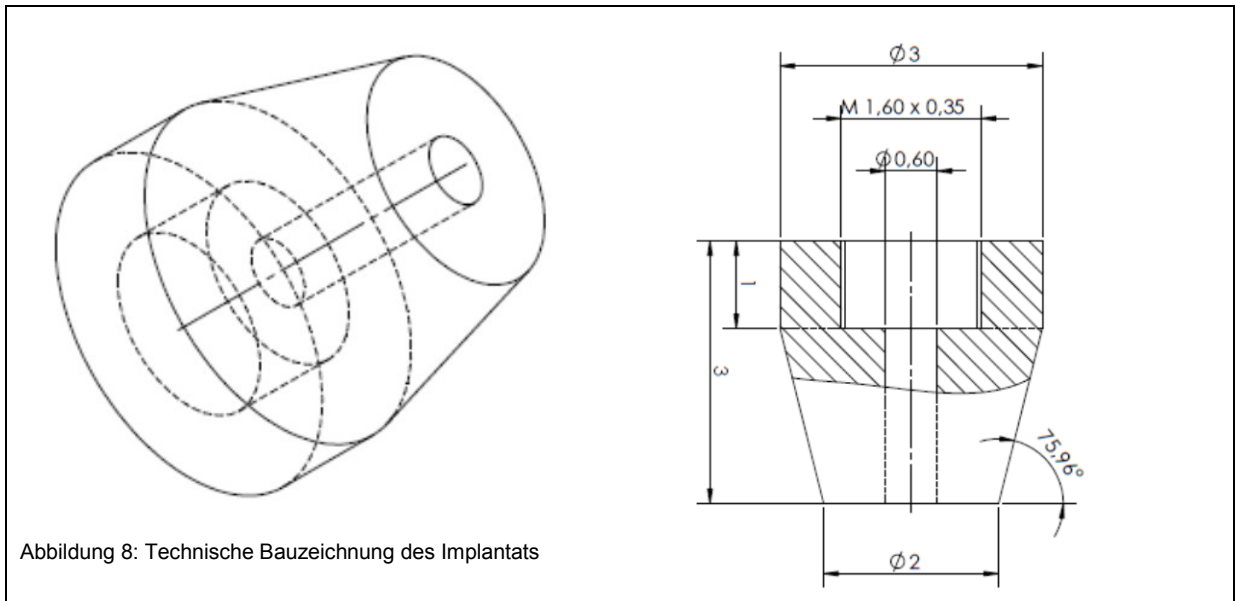


Abbildung 7: a) Neu entwickeltes Implantat aus TiAl6V4 zur metaphysären Verankerung in der proximalen Tibia (gemäß Abbildung b). Der zentrale Kanal (Pfeil) dient der Injektion der Bakteriensuspension in den periimplantären Raum, welcher in Abbildung b in schematischer Weise hellgrau dargestellt ist.



Biologische Materialien

Bakterien

- *Staphylococcus aureus* (Stamm ATCC 25923, Subspecies *Staphylococcus aureus* Rosenbach) biofilmbildend (im Folgenden als *S. aureus* bezeichnet)

Als Ausgangsmaterial dienten tiefgefrorene Bakteriensuspensionen, welche in 1 ml Eppendorf – Gefäßen durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt wurden. Es wurden Keimmengen in Zehnerpotenzen von $6,7 \times 10^3$ KBE/ml bis $6,7 \times 10^8$ KBE/ml verwendet. Bei dem eingebrachten Volumen von 15 μ l entspricht dieses jeweils 10^2 bis 10^7 KBE/15 μ l.

Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche Ratten der Rasse *Sprague Dawley* (CRL:CD (SD), Firma *Charles River Laboratories*, Sulzfeld, Deutschland) in einem Alter von 14 - 15 Wochen und mit einem Körpergewicht von 250 – 300 g verwendet.

2.2.2 Methoden

Herstellung der Keimsuspension

Die Herstellung der Keimsuspension erfolgte durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock.

Aus Stammkulturen des *S. aureus* – Referenzstammes wurden Übernachtkulturen in Caso-Boullion (40 ml; Firma OXOID Ltd, Hampshire, England) angesetzt, aus denen die Hauptkulturen beimpft wurden. Die spät-exponentielle Wachstumsphase wurde nach circa 6,5 Stunden erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein weiteres Wachstum der Hauptkulturen durch sedimentieren (4000 U/m bei 4 °C für 10 min) gestoppt. Das Sediment wurde zweimalig in PBS (20 ml) gewaschen und anschließend in einer 10%igen Glycerin-PBS-Lösung aufgenommen. Über die Messung der Optischen Dichte wurden die entsprechenden Keimkonzentrationen eingestellt. Aliquots von 1 ml wurden in Kryo-Tubes (1,8 ml, Firma NUNC, Roskilde, Dänemark) bei -80 °C tiefgefroren.

Vorversuche mit Ausplattieren von Aliquots auf unterschiedliche OP_{600} eingestellter Keimsuspensionen ergaben, dass eine $OD_{600} = 1,0$ einer Keimmenge von $1,03 \times 10^9$ KBE/ml vor Gefrieren und $8,17 \times 10^8$ KBE/ml nach Auftauen entsprachen.

Tierexperimentelle Untersuchungen

Tierhaltung und Gruppeneinteilung

Die tierexperimentellen Untersuchungen sind durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt worden (Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-031/09). Die Tierhaltung und Tierpflege erfolgte gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes analog des zuvor vorgestellten intramedullären Infektionsmodells (EU-Richtlinie 2010/63). Vor Versuchsbeginn bekam jedes der Tiere mindestens eine Woche Akklimatisierungszeit. Es befanden sich vor und eine Woche nach Setzen der Knocheninfektion stets zwei Tiere in einem Käfig, in der ersten postoperativen Woche, bzw. bis zum definitiven Wundverschluss wurde eine Einzelhaltung bevorzugt. Den Tieren stand Nahrung in Form kommerzieller Pellets (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) sowie Trinkwasser ad libidum zur Verfügung.

Einbringen des Implantats und auslösen einer Implantat-assoziierten Infektion

Narkose

Analog zum intramedullären Infektionsmodell fanden die vorbereitenden Schritte zur Operation, das Einbringen des Implantats und das Setzen der Knocheninfektion unter Allgemeinanästhesie statt. Diese wurde durch eine intramuskuläre Injektion einer gewichtsadaptierten Dreifachkombination aus Medetomidin (150 µg/kg KG), Midazolam (200 µg/kg KG) und Fentanyl (5 µg/kg KG) erzielt.

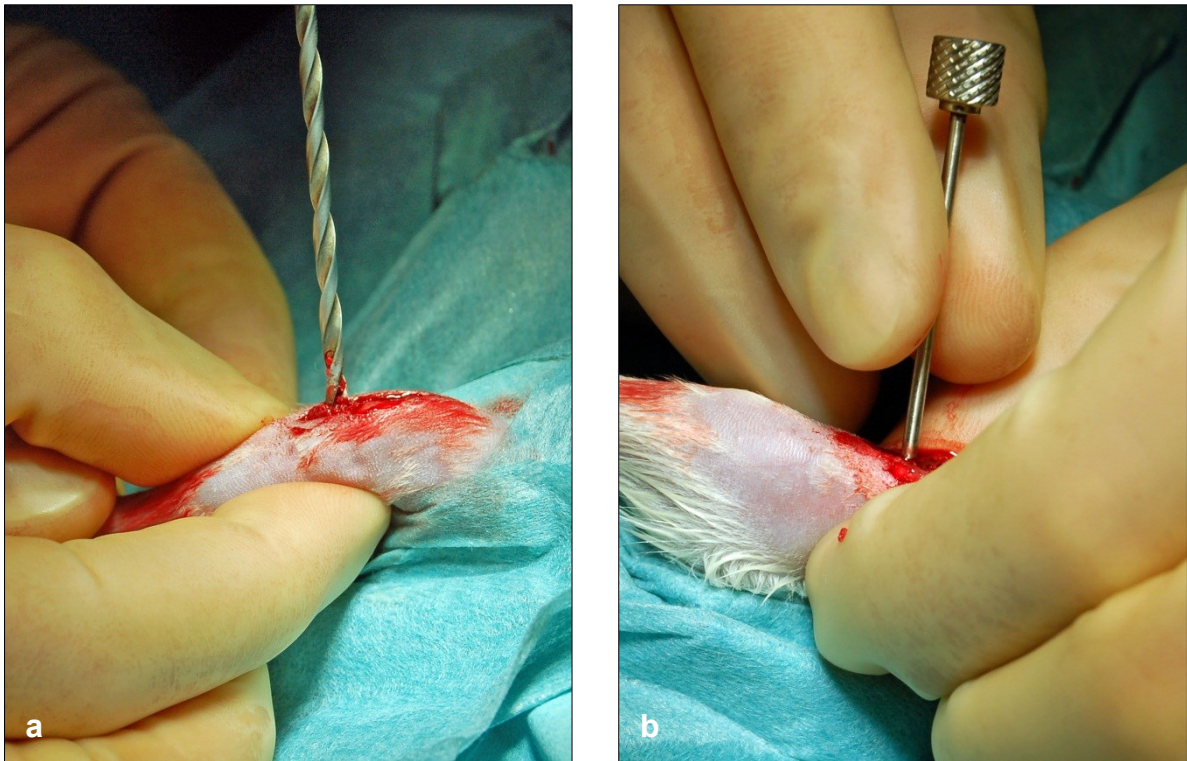


Abbildung 9: a) Aufbohren der Kortikalis der proximalen Metaphyse mit einem elektrischen Handbohrer und b) anschließendem Einbringen des Implantates in den Knochen mittels Press-Fit-Methode mit einem speziell für das Implantat entwickelten Einsatzstab.

Operatives Vorgehen

Das Einbringen der Implantate in den Knochen erfolgte unter sterilen Operationsbedingungen.

Als vorbereitende Schritte wurden die Tiere einer intraoperativen Auskühlung vorbeugend auf einem Wärmekissen (Firma Sanitas, Uttenweiler, Deutschland) gelagert. Beide Hinterbeine wurden rasiert (Krankenhaus-Fertig-Rasierer, unsteril, Firma Wilkinson sword, Solingen, Deutschland) und großzügig mit Octeniderm® (Firma Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland) gereinigt und desinfiziert. Eine sterile Abdeckung der Tiere wurde im Bereich der Pfoten und proximal der Kniegelenke durch selbstklebende Tücher (selbstklebendes Epidural-Tuch, Firma Barrier, Mölnlycke Health Care, Erkrath, Deutschland und Foliodrape®, OP-Tape, Firma Hartmann, Heidenheim, Deutschland) erzielt. Nach einem circa 1 cm langen Haut- und Faszienchnitt medial über der proximalen Tibia wurde der Knochen unterhalb des Kniegelenkes freipräpariert, die Kortikalis mit einem dünnen Bohrer (elektrischer Handbohrer, Größe 2,7 mm, Firma Dremel, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland) aufgebohrt (Abbildung 9 a) und das Implantat durch Press-Sitz in die Bohrhöhle eingebracht (Abbildung 9 b, Abbildung 11 a). Hierzu diente ein speziell für das Implantat entwickelter Einsatzstab, welcher über eine Schraubverbindung mit dem Implantat zu konnektieren ist (siehe Abbildung 10).

Über den zentralen Kanal des Implantates wurden 15 µl der Keimsuspension (*S. aureus* in entsprechender Konzentration) mit Hilfe einer Hamilton®-Spritze (Microliter™ Syringes, 25 µl, Nr. 702, Firma Hamilton, Bonaduz, Schweiz) in das metaphysäre Knochenlager eingebracht (Abbildung 11 b) und anschließend die Öffnung des Kanals mit sterilem Knochenwachs abgedichtet.

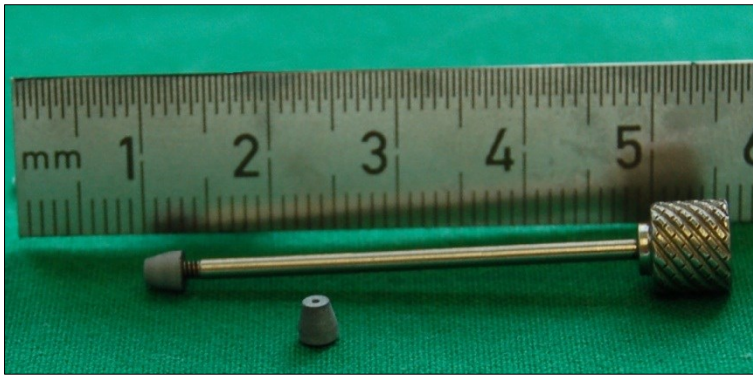


Abbildung 10: Darstellung des Implantats von zwei Seiten; im Hintergrund ist das Implantat mit dem Einsatzstab über eine Schraubverbindung konnektiert.

Je nach Untersuchungsgruppe wurden 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 und 10^7 KBE/15 μ l appliziert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten jeweils 15 μ l einer sterilen PBS-Lösung.

Es erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss durch Einzelknopfnah mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 5-0, Firma Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland), sowie abschließend ein Wundverband aus Sprühpflaster (Opsite[®], Firma Smith& Nephew Medical Ltd., Hamburg, Deutschland). Beide Hinterbeine eines Tieres wurden nacheinander auf identische Weise operiert.

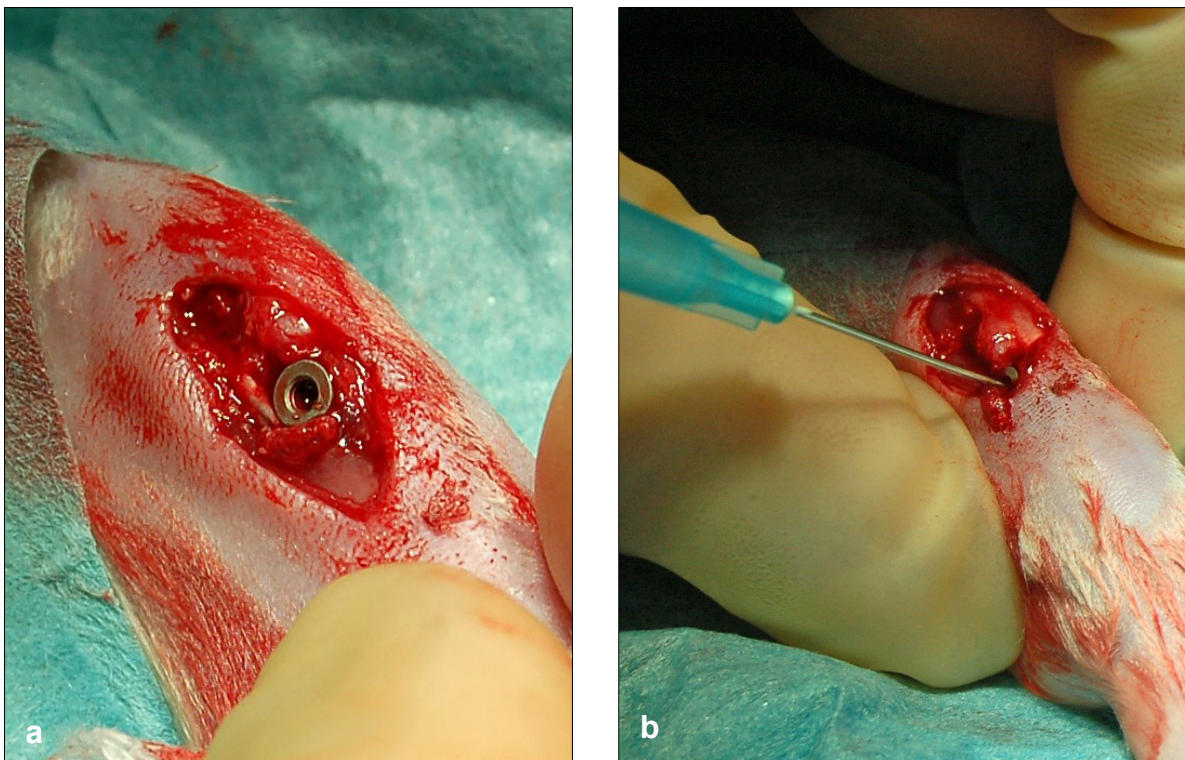


Abbildung 11: a) Das Implantat ist in die proximale Metaphyse eingebracht und schließt mit der Kortikalis ab. b) Über den zentralen Kanal wird die Bakteriensuspension in den periimplantären Raum mit Hilfe einer Hamilton[®]-Spritze injiziert.

Antagonisierung der Narkose und postoperatives Therapiemanagement zur Analgesie

Im Anschluss an die Operation erfolgte eine einmalige intramuskuläre Injektion von Buprenorphin (0,05 mg/kg KG) zur langanhaltenden postoperativen Analgesie, sowie eine gewichtsadaptierte Antagonisierung der Narkose durch subkutane Gabe von Atipamezol (750 µg/kg KG), Flumazenil (200 µg/kg KG) und Naloxon (120 µg/kg KG).

Bei Bedarf wurde eine weiterführende postoperative Analgesie durch eine intramuskuläre Injektion von Buprenorphin (0,05 mg/kg KG) einmal täglich durchgeführt.

Verlaufskontrollen

Die Tierhaltung und -pflege, sowie die wöchentlichen Verlaufskontrollen erfolgten analog des intramedullären Infektionsmodells. Die Tiere wurden bis zu einem definitiven Wundverschluss, in der Regel nach 3 bis 7 Tagen, in Einzelkäfigen und anschließend paarweise in einem Käfig gehalten. Jeweils am 3. postoperativen Tag und anschließend in wöchentlichen Abständen wurden sie mit Fokus auf Mobilität, sowie lokale Haut- und Weichteilbefunde klinisch untersucht, gewogen und die Körpertemperatur bestimmt. An den Tagen 0, 21 und 42 post operationem wurden zur Lokalisationskontrolle der Implantate Röntgenkontrollen beider Hinterbeine angefertigt (mobiler C-Bogen, SIREMOBIL 2000, Siemens, München, Deutschland).

Euthanasie und Probengewinnung

Gemäß den EU-Richtlinien erfolgte nach 42 Tagen die Euthanasie in Vollnarkose durch eine intrakardiale Injektion von Pentobarbital – Natrium in Überdosierung (80 mg/kg KG). Zuvor wurden die Tiere abschließend klinisch untersucht und es wurden das Körpergewicht und die Körpertemperatur bestimmt. Bereits in Allgemeinanästhesie wurden zudem Röntgenaufnahmen beider Hinterbeine angefertigt.

Zur sterilen Probengewinnung wurden die Hinterbeine vollständig rasiert, mit Octeniderm® gereinigt und desinfiziert. Die sterile Abdeckung erfolgte analog der Implantationsvorbereitung. Die primäre Operationsnarbe wurde wiedereröffnet (Abbildung 12 a) und ein Abstrich (dreifach; mit steriler PBS-Lösung befeuchteter Stieltupfer, Firma greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) von der Implantatoberfläche genommen (Abbildung 12 b). Die Tibia wurde mit einem Schnitt medial entlang des Knochens vom Knie- bis zum Sprunggelenk freigelegt und der Fuß im Sprunggelenk abgesetzt. Nach vorsichtiger Entfernung des Weichteilmantels erfolgte die Exartikulation der Tibia und Fibula im Kniegelenk (Abbildung 13 a). Das Implantat wurde mit Hilfe des Einsatzstabes vorsichtig aus dem Knochenbett entfernt (Abbildung 13 b) und die Tibia unmittelbar unterhalb der Implantationsstelle zerteilt. Nur der proximale Anteil der Tibia, welcher das Implantatlager enthielt, wurde für die weiteren Analysen verwendet. Beide Hinterbeine wurden nacheinander in identischer Vorgehensweise operiert. Für die mikrobiologische Aufarbeitung wurden das Implantat (in einem sterilen Glasröhrchen mit 1 ml PBS-Puffer) und der proximale Tibiaanteil (in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml PBS-Puffer) unmittelbar nach Probenentnahme an das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock weitergeleitet.

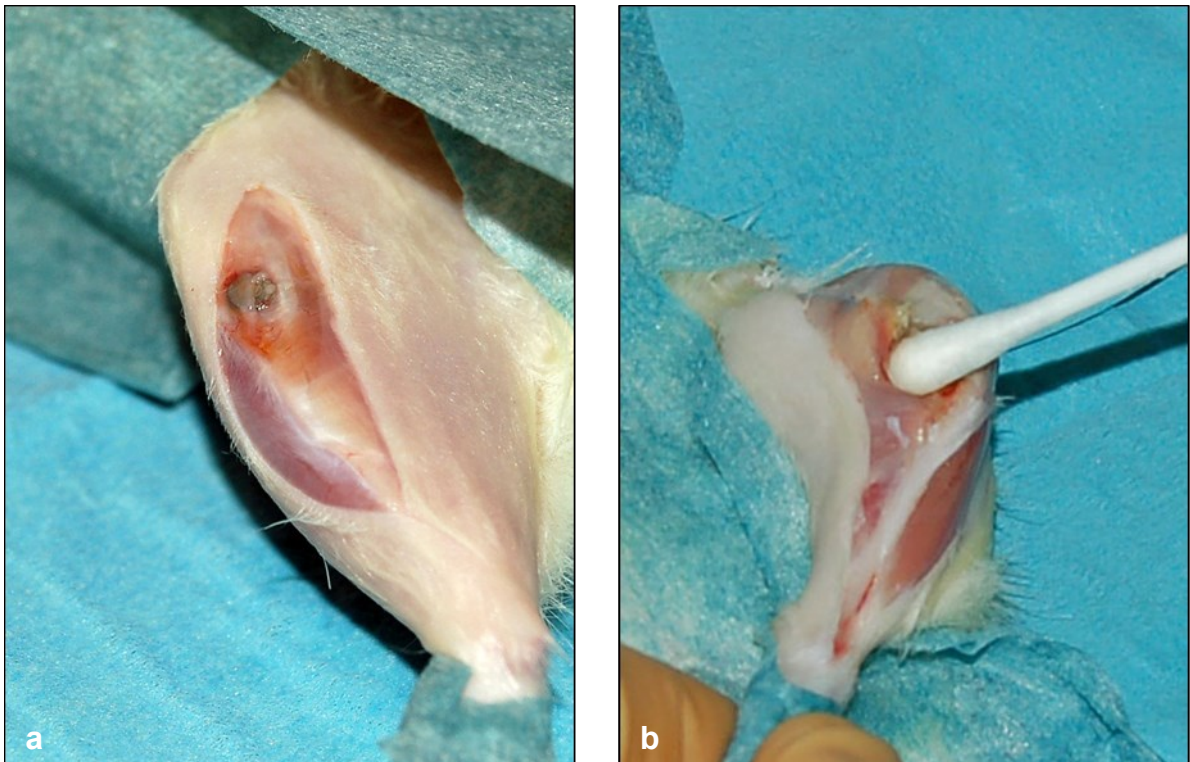


Abbildung 12: a) Großzügiger Hautschnitt entlang der Tibiavorderkante, die Oberseite des Implantates schimmert bereits als runde, gräuliche Struktur durch dünne Weichteilstrukturen hindurch. b) Von der Implantatoberseite werden Abstriche mit befeuchteten Wattetupfern entnommen.

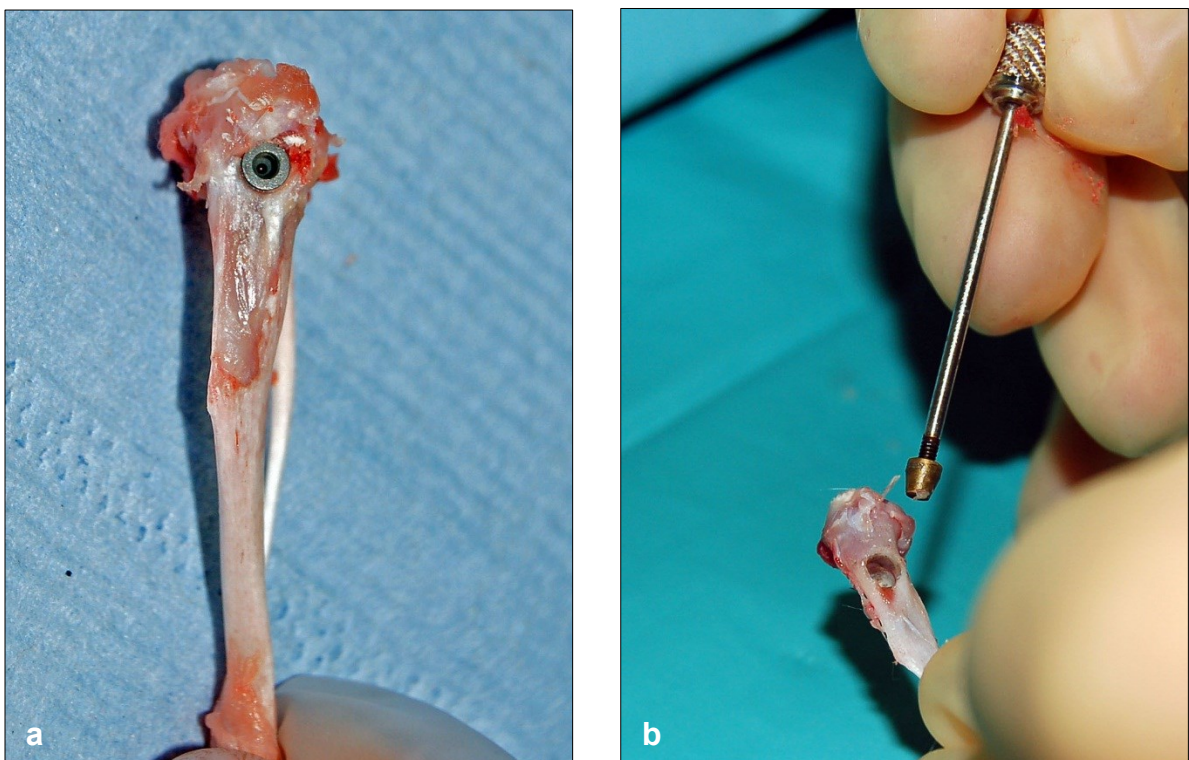


Abbildung 13: a) Exartikulierter Knochen, die Weichteilstrukturen sind entfernt, das Implantat befindet sich im Knochenbett
b) Entfernung des Implantates aus dem Knochenlager mit Hilfe des Einsatzstabes

Mikrobiologische Analysen der Proben

Die mikrobiologische Diagnostik und Aufarbeitung der Proben übernahm das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock.

Keimkonzentration und Lebensfähigkeit

Zur Bestimmung und Überprüfung der Keimmenge der lebensfähigen Bakterien wurde aus jedem verwendeten Bakteriensuspension–Aliquot unmittelbar nach Inokulation in den Knochen eine Probe ausplattiert.

Wundabstrich

Entsprechend der klinischen Routinediagnostik des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock, für Abstrich-Untersuchungen wurden jeweils drei Abstriche mit feuchten Wattetupfern (Firma greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland; mit steriler PBS-Lösung befeuchtet) von der Implantatoberfläche entnommen. Mit diesen wurden Columbia-Blutagarplatten, Schaedler-Agarplatten und MacConkey II – Platten (jeweils Firma Becton & Dickons, Heidelberg, Deutschland), sowie Nährlösungen auf Caseinpepton-Basis (7 g Caseinpepton, 5 g Fleischpepton, 5 g Gelatinepepton, 3 g Hefeextrakt, 5 g Natriumchlorid / Liter; Firma SIFIN GmbH, Berlin, Deutschland) und BHI-Medium (Firma OXOID, Hampshire, England) beimpft. Durch diese Diagnostik werden aerobe, anaerobe und gram-negative Keime erfasst.

Die Proben wurden unter den jeweils erforderlichen Bedingungen mindestens 48 Stunden bebrütet und anschließend, entsprechend der Routine-Diagnostik von Patientenproben im akkreditierten Labor, analysiert. Aus dem Material isolierte *S. aureus* – Stämme wurden mittels Spa-Typisierung mit dem ursprünglich eingesetzten Stamm abgeglichen; bei Übereinstimmung wurde die Probe als „positiv“ bewertet, eine Quantifizierung der Bakterienkolonien fand nicht statt.

Ermittlung der Lebendkeimzahl im Knochenpräparat

Um die Bakterien aus dem Knochengewebe zu lösen, wurden die Tibiapräparate in 10 ml PBS-Lösung für circa 10 sec bei maximaler Leistung geschüttelt (Vortex[®]-Schüttler). Der Knochen wurde der Flüssigkeit entnommen, die Bakteriensuspension zentrifugiert (10 min bei 4000 U/min), der Überstand verworfen und das Sediment in 3 ml sterilem PBS-Puffer resuspendiert. In drei parallelen Ansätzen wurden jeweils 1 ml der Resuspension in einer seriellen Verdünnungsreihe auf Columbia-Blutagarplatten ausplattiert und für 24 h bei 36 ± 1 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden anhand der Gram-Färbung, Hämolyseeigenschaften, Katalaseaktivität und der Expression des Clumping-Faktors differenziert. *S. aureus* – Kolonien wurden zusätzlich durch Spa-Typisierung mit dem Ursprungskeim abgeglichen.

Die Angabe der Keimkonzentration erfolgte in KBE/ml.

Ermittlung der Lebendkeimzahl am Implantat

Für die Quantifizierung der auf der Implantatoberfläche haftenden Bakterien wurden die Implantate in einem Glasröhrchen mit 1 ml PBS-Puffer im Ultraschall-Wasserbad für 5 min bei 100 % beschallt (Hochleistungs-Ultraschall Reinigungsgerät, Sonorex Digital DK 255P, Firma Bandelin, Berlin,

Deutschland), so dass sich die Bakterien von der Implantatoberfläche lösten. Die Lösung wurde zentrifugiert (10 min bei 4000 U/m), der Überstand verworfen und das Sediment erneut in 300 µl PBS aufgenommen. Dreimal 100 µl der Bakterienlösung wurden auf Caso-Bouillon-Agar ausplattiert, für 24 h bei 36 ± 1 °C in 5 % CO₂ bebrütet und anschließend die Keimzahl analog der Bestimmung für die Knochenpräparate ermittelt.

Die Angabe der Keimzahl erfolgte in KBE/ml.

2.3 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde IBM SPSS Statistics 20 (IBM, Ehningen, Deutschland) verwendet. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie die Mediane bei nicht-normalverteilten Stichproben angegeben. Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte durch den Kolmogorov-Smirnov-Test; bei einem p – Wert > 0,05 liegt eine Normalverteilung vor. Des Weiteren wurde der Kruskal-Wallis-Test für die Analyse des Signifikanzniveaus mehrerer, unabhängiger Stichproben herangezogen. Für den speziellen Vergleich zweier Untersuchungsgruppen wurde der U-Test nach Mann und Whitney angewandt. In beiden Untersuchungsmethoden bezeichnet ein p – Wert < 0,05 einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Stichproben (Krentz 2005).

3 Ergebnisse

3.1 Intramedulläres Infektionsmodell

3.1.1 Ergebnisse der Versuchsgruppen I – V Inokulation von *S. aureus* (10^6 KBE/10 μ l)

Antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen zur Prophylaxe Implantat-assoziiertes Infektionen gewinnen immer mehr an Bedeutung. In dem zuvor beschriebenen Tiermodell wurde eine kupferhaltige Titanoxidbeschichtung untersucht.

Hierfür wurden $n = 41$ Versuchstiere mit einem Durchschnittsalter von $71,1 \pm 8,4$ Tagen verwendet. Da ein Tier (Gruppe I) intraoperativ ohne offensichtlich erkennbare Ursache verstarb und somit aus den Versuchen ausgeschlossen wurde, wurden insgesamt $n = 40$ Tiere primär in die Untersuchungen eingeschlossen. Bei keinem Tier führte eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes oder Anzeichen einer Sepsis zu einem Versuchsausschluss durch eine vorzeitige Euthanasie.

Pro Gruppe sind jeweils $n = 8$ Versuchstiere in die Untersuchungen eingeschlossen worden; neben den Analysen der einzelnen Schichten (TiO_2 , Cu-TiO_2 , 3xCu-TiO_2) wurden zwei Gruppen definiert, in denen ein unbeschichteter Pin implantiert wurde. Gruppe I diente als Negativkontrolle, den Tieren sind keine Bakterien inokuliert worden. Gruppe II bildete die Referenzgruppe für alle infizierten Tiere, um die Effektivität der Beschichtungen vergleichen zu können. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Gruppenverteilung.

Tabelle 2: Anzahl der in die Versuche eingeschlossenen Tiere

(TiO_2 = Titanoxid; Cu-TiO_2 = Kupfer-Titanoxid mit einem Kupfergehalt von 0,1 mmol/l; 3xCu-TiO_2 = Kupfer-Titanoxid mit einem Kupfergehalt von 0,3 mmol/l)

Gruppen-Nummer	Beschichtung	Keim	Anzahl der Tiere (n)
I	Unbeschichtet	steril	8
II	Unbeschichtet	<i>S. aureus</i>	8
III	TiO_2		8
IV	Cu-TiO_2		8
V	3xCu-TiO_2		8

Gewichtsverlauf

Zu Beginn der Untersuchungen wiesen die Tiere im Durchschnitt ein Körpergewicht von $250,4 \pm 21,4$ g auf (Mittelwert \pm Standardabweichung). Am dritten postoperativen Tag zeigten alle Tiere eine Gewichtsabnahme von durchschnittlich $28,7 \pm 12,4$ g ohne signifikante Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen ($p = 0,661$). Der direkte Vergleich der Referenzgruppe II mit der nicht-infizierten Kontrollgruppe I ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,195$). Im Verlauf des 42-tägigen Beobachtungsintervalls nahmen alle Tiere im Durchschnitt um $49,0 \pm 18,8$ g an Gewicht zu; auch hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p = 0,065$ für alle Versuchsgruppen; $p = 0,105$ Gruppe I vs. II; bei den Ergebnissen des Körpergewichtes handelt es sich um normalverteilte Stichproben, p stets $> 0,05$).

Die relativen Gewichtsveränderungen sind im Folgenden tabellarisch (Tabelle 3) aufgeführt.

Tabelle 3: Gewichtsverhalten der einzelnen Untersuchungsgruppen; angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung an Tag 0 in Gramm (g), sowie an Tag 3, 7 und 42 als prozentualer Anteil des Ausgangsgewichtes.

Gruppe	Tag 0	Tag 3	Tag 7	Tag 42
I	$231,0 \pm 15,1$	$89,3 \pm 6,6$ %	$101,1 \pm 9,3$ %	$127,0 \pm 11,8$ %
II	$253,9 \pm 15,4$	$87,5 \pm 5,1$ %	$91,2 \pm 8,1$ %	$115,6 \pm 4,2$ %
III	$274,4 \pm 18,8$	$90,3 \pm 4,0$ %	$95,2 \pm 3,7$ %	$114,3 \pm 7,1$ %
IV	$234,1 \pm 12,0$	$88,1 \pm 4,8$ %	$90,3 \pm 12,7$ %	$122,1 \pm 8,5$ %
V	$258,4 \pm 11,1$	$87,4 \pm 4,5$ %	$91,4 \pm 10,2$ %	$121,0 \pm 3,6$ %
gesamt	$253,9 \pm 15,4$	$87,5 \pm 5,1$ %	$91,2 \pm 8,1$ %	$115,6 \pm 4,2$ %

Körperliche Untersuchung, Wundheilung und Temperaturverlauf

Eine klinische Untersuchung der Tiere erfolgte initial am dritten Tag post operationem und im Verlauf in wöchentlichen Abständen (Tag 7, 14, 21, 28, 35, 42).

Dabei wurde besonderes Augenmerk auf Wundheilung, Schwellung oder Rötung des operierten Beines, sowie eine eventuelle Lahmheit gelegt. Eine reizlose Wundheilung konnte in der Regel am 3. postoperativen Tag beobachtet werden.

Bei 11 von 32 Tieren (34,3 %) der Gruppen II-V zeigte sich eine verzögerte Wundheilung der Haut, mit zum Teil größeren Hautdefekten (einen typischen Hautdefekt zeigt Abbildung 14). In keinem dieser Fälle bestand eine Beeinträchtigung des Tieres; gravierende Entzündungen der Weichteile wurden nicht beobachtet. Bis zur definitiven Wundheilung wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten und die Wunden regelmäßig oberflächlich desinfizierend gereinigt.



Wundheilungsstörungen wurden bei folgenden Tieren beobachtet:

Gruppe II:	5 Tiere
Gruppe III:	3 Tiere
Gruppe IV:	2 Tiere
Gruppe V:	1 Tier

Abbildung 14: Wundheilungsstörung am linken Hinterbein oberhalb der Implantationsstelle mit großem Hautdefekt; das Nahtmaterial wurde vom Tier entfernt.

Bis zum 14. postoperativen Tag konnte in allen Fällen ein adäquater Wundverschluss beobachtet werden. Keines der Tiere zeigte in den Verlaufskontrollen Anzeichen von Lahmheit, schweren Infektionsverläufen oder septischen Zuständen. Eine erhöhte Körpertemperatur (über 38,5 °C) konnte nicht nachgewiesen werden (in Abbildung 15 ist der Temperaturverlauf der einzelnen Gruppen wiedergegeben).

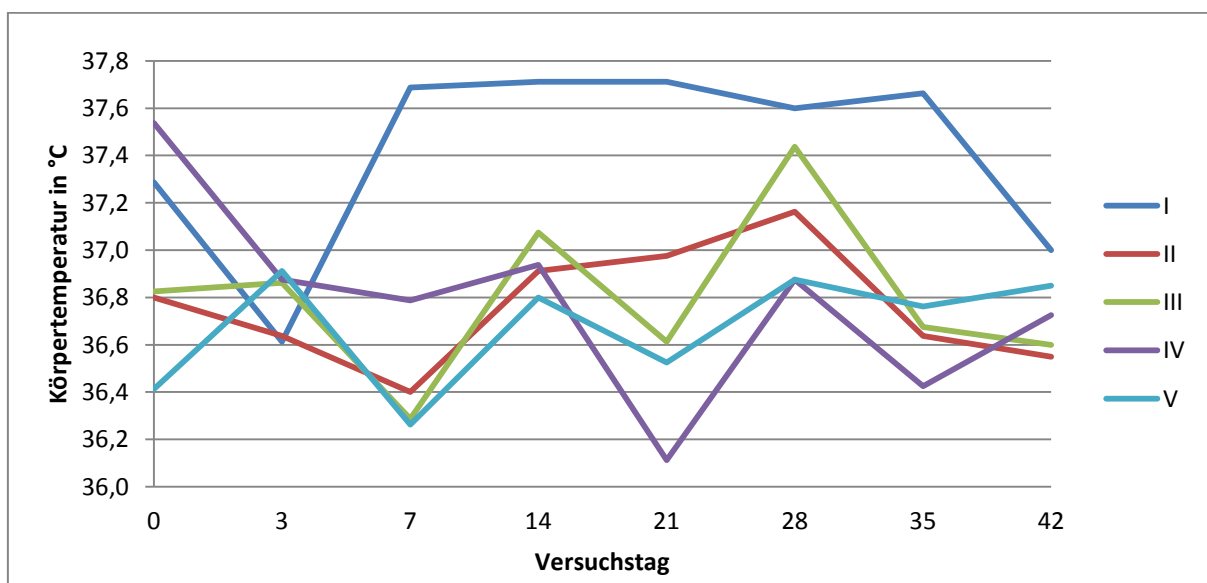


Abbildung 15: Grafische Darstellung des Temperaturverlaufes über den gesamten Beobachtungszeitraum (abgebildet als Mittelwert je Versuchsgruppe)

Mikrobiologische Ergebnisse

In der Kontrollgruppe I waren alle Knochen- sowie Pin-Proben steril, es kam weder zu einer Keimverschleppung innerhalb der Versuchstiere, noch zu einer Kontamination während der einzelnen Arbeitsschritte.

Bei einem Tier der Gruppe II (unbeschichteter Pin) und einem der Gruppe IV (mit Cu-TiO₂ beschichteter Pin) stimmten die gefundenen Erreger in der Keimanalyse nicht mit dem ursprünglich eingebrachten *S. aureus* – Stamm überein, so dass von einer Kontamination ausgegangen werden musste. Diese Tiere wurden aus den weiteren Berechnungen und Analysen ausgeschlossen.

Somit gingen die Ergebnisse von n = 38 Tieren in die mikrobiologischen Analysen ein. Die Tabelle 4 zeigt den Anteil der jeweiligen Versuchsgruppe. Bei den Ergebnissen der mikrobiologischen Analysen handelte es sich um nicht-normalverteilte Stichproben, p stets < 0,01.

Tabelle 4: Anzahl der in die mikrobiologischen Analysen eingeschlossenen Versuchstiere pro Untersuchungsgruppe

Gruppe	Kontrollgruppe	Unbeschichtet	TiO ₂	Cu-TiO ₂	3xCu-TiO ₂
Anzahl	8	7	8	7	8

Wundabstrich und Blutkultur

Bei drei von 38 Tieren (8 %) konnten im Wundabstrich vereinzelt *S. aureus* – Kolonien nachgewiesen werden (eine Probe in Gruppe II (unbeschichtet) und zwei Proben in Gruppe III (TiO₂)). Hierbei zeigte nur ein Tier der Gruppe III (TiO₂) ein gleichzeitiges Auftreten von Wundheilungsstörungen und positivem Wundabstrich.

In den Blutkulturen wurde in fünf Fällen (13 %) eine Kontamination durch Keime der kommensalen Hautflora nachgewiesen (eine Probe in Gruppe II (unbeschichtet), drei Proben Gruppe III (TiO₂) und eine Probe in Gruppe V (3xCu-TiO₂)). In keinem Fall konnte nach 24-stündiger Inkubation der eingebrachte *S. aureus* – Keim in der Blutkultur ermittelt werden.

Tabelle 5: Mikrobiologischer Nachweis von *S. aureus* im Wundabstrich und in der Blutkultur.

* Vereinzelt Kolonien nachgewiesen in n = x Fällen

Gruppe	Kontrollgruppe	Unbeschichtet	TiO ₂	Cu-TiO ₂	3xCu-TiO ₂
Abstrich*	0	1	2	0	0
Blutkultur	0	0	0	0	0

S. aureus – Nachweis im Knochenpräparat

30 Knochen wurden mikrobiologisch untersucht. In der Versuchsgruppe II konnten in drei Proben (60 %) *S. aureus* – Kolonien mit einer mittleren Keimkonzentration von $8,66 \times 10^2 \pm 1,92 \times 10^3$ KBE/ml (Median $1,13 \times 10^1$ KBE/ml) nachgewiesen werden. Im Vergleich mit der nicht-infizierten Kontrollgruppe I ergab dieses keine signifikante Zunahme der Keimmenge im Knochenpräparat (p = 0,151). Auch im

Vergleich der Versuchsgruppen II – V konnten keine signifikanten Unterschiede im Keimnachweis festgestellt werden ($p = 0,407$).

Tabelle 6: Keimnachweis im Knochenpräparat;

angegeben in Mittelwert \pm Standardabweichung, sowie als Median (dargestellt in Klammern (**x**)); n = Anzahl der untersuchten Knochen pro Versuchsgruppe; n-positiv = Anzahl positiver Erregernachweise

Gruppe	Kontrollgruppe	Unbeschichtet	TiO ₂	Cu-TiO ₂	3xCu-TiO ₂
n	5	5	6	6	8
n-positiv	0	3	6	5	6
KBE/ml	0,00 (0,00)	8,66x10 ² \pm 1,92x10 ³ (1,13x10 ¹)	2,58x10 ² \pm 3,17x10 ² (1,16x10 ²)	8,93x10 ² \pm 1,32x10 ³ (1,16x10 ²)	5,44x10 ² \pm 9,13x10 ² (4,17x10 ¹)

S. aureus – Nachweis am Pin

Es wurden alle Pins (n = 38) in die mikrobiologischen Analysen eingeschlossen.

In der Gruppe II konnte in drei Proben (43 %) nach Ultraschallbehandlung des Pins ein Keimnachweis (*S. aureus*) mit einer durchschnittlichen Keimmenge von $3,22 \times 10^2 \pm 6,97 \times 10^2$ KBE/ml (Median 0,0 KBE/ml) ermittelt werden. Im Vergleich zu der sterilen Kontrollgruppe ergab dieses keinen signifikant höheren Keimnachweis in der Gruppe II ($p = 0,189$). Auch vergleichende Untersuchungen der Keimzahlen der infizierten Gruppen II – V ergaben keine signifikanten Unterschiede beim Keimnachweis am Pin, nachdem im Ultraschallwasserbad die Bakterien von der Oberfläche gelöst wurden ($p = 0,148$).

Tabelle 7: Keimnachweis am Pin nach Ultraschallbehandlung;

angegeben in Mittelwert \pm Standardabweichung, sowie als Median (dargestellt in Klammern (**x**)). n = Anzahl der untersuchten Pins; n-positiv = Anzahl positiver Erregernachweise

Gruppe	Kontrollgruppe	Unbeschichtet	TiO ₂	Cu-TiO ₂	3xCu-TiO ₂
n	8	7	8	7	8
n-positiv	0	3	1	0	3
KBE/ml	0,00 (0,00)	3,22x10 ² \pm 6,97x10 ² (0,00)	1,25x10 ⁰ \pm 3,54x10 ⁰ (0,00)	0,00 (0,00)	3,21x10 ¹ \pm 6,98x10 ¹ (0,00)

In einem zweiten Analyseschritt wurde die durch Sonikation gewonnene Bakterienlösung zentrifugiert, um im konzentrierten Sediment erneut die Keimmenge zu bestimmen.

Auch mit diesem Verfahren konnte in nur drei Fällen (50 %) in der Versuchsgruppe II ein positiver Keimnachweis mit einer durchschnittlichen Keimkonzentration von $7,3 \times 10^1 \pm 1,45 \times 10^2$ KBE/ml (Median 0,0 KBE/ml) ermittelt werden; bei einer Probe war der Keimnachweis im Sediment aus technischen Gründen nicht möglich, so dass nur sechs Proben in die Analysen gingen. Im Vergleich zu der nicht-infizierten Kontrollgruppe I ergab sich ebenfalls kein signifikant höherer Keimnachweis in der Gruppe II ($p = 0,345$). Somit war auch in diesem Analyseverfahren keine sichere

Infektionsauslösung nachweisbar. Der Vergleich aller infizierten Untersuchungsgruppen (II – V) ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Keimmengen ($p = 0,496$).

Tabelle 8: Keimnachweis am Pin nach Sedimentation;

angegeben in Mittelwert \pm Standardabweichung, sowie als Median (dargestellt in Klammern (x)).

n = Anzahl der untersuchten Pins; n-positiv = Anzahl positiver Erregernachweise

Gruppe	Kontrollgruppe	Unbeschichtet	TiO ₂	Cu-TiO ₂	3xCu-TiO ₂
n	8	6	8	7	8
n-positiv	0	3	1	1	3
KBE/ml	0,00 (0,00)	$7,3 \times 10^1$ $\pm 1,45 \times 10^2$ (0,00)	$2,5 \times 10^0$ $\pm 7,07 \times 10^0$ (0,00)	$3,57 \times 10^0$ $\pm 9,45 \times 10^0$ (0,00)	$5,6 \times 10^1$ $\pm 1,02 \times 10^2$ (0,00)

Um Aussagen über die Wirkung unterschiedlicher Oberflächenbeschichtungen machen zu können, wird eine annähernd 100 %ige Infektionsauslösung in der Referenzgruppe II gefordert, in welcher zu der Bakteriensuspension ein unbeschichteter Pin in den Markraum eingebracht wurde. Da es nicht gelang, eine Infektion sicher auszulösen und mit diesen Methoden zuverlässig nachzuweisen, ist es nicht zulässig, durch Vergleiche der Versuchsgruppen Rückschlüsse auf die Effektivität und protektive Wirksamkeit der unterschiedlichen Oberflächenbeschichtung zu ziehen. Im Folgenden sind die mikrobiologischen Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen grafisch gegenüber gestellt (Abbildung 16).

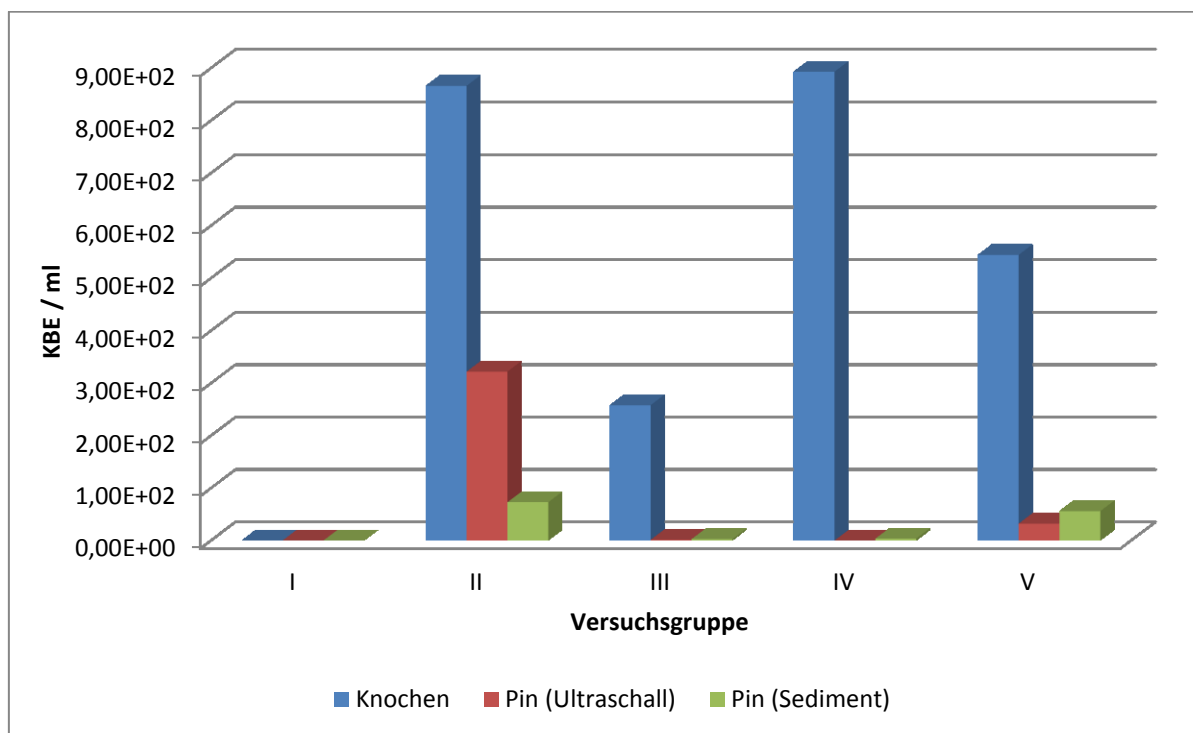


Abbildung 16: Ergebnis der mikrobiologischen Analysen; grafisch dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen in KBE/ml im Knochengewebe (blau), am Pin nach Ultraschallbehandlung (rot) sowie im Sediment (grün).

Ergebnisse der bildgebenden und histologischen Analysen

In der im Folgenden beschriebenen bildgebenden Beurteilung der Knochen und Pin-Oberflächen wurden nur vereinzelt Hinweise auf Implantat-assoziierte Infektionen gefunden, ohne dass statistisch signifikante Häufungen in einer der Untersuchungsgruppen zu beobachten waren. Daher soll die Darstellung dieser Ergebnisse nur exemplarisch erfolgen.

Röntgenologische Diagnostik

An Tag 0, 21 sowie 42 wurde bei allen Tieren eine Röntgenaufnahme des operierten Hinterbeines im seitlichen Strahlengang angefertigt. Bei 18 von 40 Tieren (45 %) konnten in einer der Kontroll-Röntgenaufnahmen Anzeichen von Knocheninfektionen nachgewiesen werden, welche überwiegend minimaler Ausprägung waren. Nach dem (im Methodenteil beschriebenen) Score-System wurden pro Tier für die Regionen R1 bis R3 zusammen Punkte von 0 bis 12 bei maximal zu erreichenden 45 Punkten ermittelt. Die Ergebnisse des Röntgen-Scores waren nicht-normalverteilt (p stets $< 0,01$).

Tabelle 9: Röntgenscore; angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung sowie als Median (**x**) je Untersuchungsgruppe und Untersuchungstag; (*) $p = 0,04$ im Vergleich zu Kontrollgruppe I

Gruppe	Kontrollgruppe	Unbeschichtet	TiO ₂	Cu-TiO ₂	3xCu-TiO ₂
Tag 21	0,13 \pm 0,35 (0,0)	0,29 \pm 0,49 (0,0)	0,5 \pm 0,54 (0,5)	0,14 \pm 0,38 (0,0)	3,71 \pm 5,10 (*) (1,0)
Tag 42	0,13 \pm 0,35 (0,0)	1,43 \pm 2,51 (0,0)	0,25 \pm 0,46 (0,0)	1,0 \pm 1,83 (0,0)	2,29 \pm 3,30 (1,0)

Im Vergleich der Kontrollgruppe (I) mit der Referenzgruppe (II), sowie innerhalb aller infizierten Versuchsgruppen (II – V) gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung radiologischer Infektionszeichen (p stets $> 0,1$). Der einzig signifikante Unterschied in der Punktebewertung lässt sich im speziellen Vergleich der Gruppe V zur Kontrollgruppe I an Tag 21 erfassen, wenn die Summe der ermittelten Punkte der Regionen R1 – R3 verglichen werden ($p = 0,04$).

Die Röntgenaufnahmen am Operationstag dienten der Lagekontrolle. Bei einem Tier der Gruppe V (3xCu-TiO₂) war der Pin nicht zentral intramedullär, sondern diagonal, die Tibia perforierend und in die dorsalen Weichteile hineinragend lokalisiert (Abbildung 17 b). Dieses Tier wurde aus der Wertung genommen. Alle weiteren Aufnahmen zeigten eine weitgehend korrekte, intramedulläre Lage des Pins (Abbildung 17 a).

Die Kontrollen an Tag 21 post operationem zeigten insgesamt geringe Hinweise auf eine Osteomyelitis. 12 Tiere (30 %) erreichten Punktzahlen zwischen 1 und 12 Punkten; diese begründeten sich vorwiegend auf leichten Deformierungen oder Sequesterbildungen (Gruppe II, III, IV).

Bei zwei Tieren der Gruppe V zeigte die Röntgen-Kontrolle Frakturen der Tibia und Fibula im Bereich der Pin-Mitte (Abbildung 17 c); auf den postoperativen Röntgenaufnahmen zur Lagekontrolle ist eine perioperativ entstandene Fraktur aufgrund mangelnder Bildqualität und einer eindimensionalen Aufnahme weder sicher zu erkennen, noch auszuschließen. Die Frakturen erklären die relativ hohe Punktzahl im Röntgen – Score bei dieser Versuchsgruppe an Tag 21. Am Ende des

Beobachtungszeitraumes (an Tag 42) ist bei beiden Tieren eine deutliche Kallusbildung erkennbar, radiologische Hinweise auf eine Infektion waren nur marginal sichtbar.

Die Gesamtbetrachtung nach der abschließenden Röntgenkontrolle an Tag 42 post operationem erbrachte keine wesentliche Steigerung radiologisch darstellbarer Infektionszeichen. Diese zeigten sich vor allem in Form leichter Deformierungen, Sequesterbildungen, sowie angedeuteter periostaler Reaktionen (Abbildung 17 d). Bei 12 Tieren (30 %) wurden Punktzahlen von 1 – 8 Punkten erreicht, wobei diese Tiere nicht immer identisch derer waren, welche in der Voruntersuchung bereits Auffälligkeiten zeigten. Im Vergleich zu den Voraufnahmen an Tag 21 zeigten sich nur vereinzelt Befundverschlechterungen; jedoch fielen häufig Befundverbesserungen bis hin zu völlig unauffälligen Röntgenbefunden an Tag 42 auf.

Verglichen mit den mikrobiologischen Ergebnissen, ist in 50 % der Fälle eine Koinzidenz zwischen positivem Bakterienwachstum im Knochen oder am Pin und röntgenologisch erkennbaren Infektionszeichen zu beobachten.



Abbildung 17: a) Postoperative Lagekontrolle; dargestellt ist eine korrekte, zentral intramedulläre Lage des Pins; b) Postoperative Lagekontrolle; inkorrekte Lage des Pins, da er diagonal die Tibia durchbricht; c) Kontrollaufnahme nach drei Wochen: zu sehen ist eine Fraktur der Tibia und Fibula im Bereich der Pinmitte / Region R2; die Knochenstrukturen sind deutlich aufgelockert, am lateralen Rand ist eine Weichteilschwellung angedeutet (Pfeil); d) Kontrolle nach sechs Wochen: es sind Entzündungszeichen in Form periostaler Reaktionen (blaue Pfeile) und Sequesterbildungen (roter Pfeil) in der Region R2 erkennbar.

Ergebnisse der histologischen Untersuchung

Histologische Schnitte von neun Tieren sind in Masson-Goldner-Färbung untersucht worden. In dieser Färbung stellen sich die einzelnen Strukturen wie folgt dar (Prospekt Technovit®; Infobroschüre Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland; Mikroskopie; 1.00485 Mason-Goldner-Färbekitt; Stand 2006):

- Osteoid und Zytoplasma – rot
- mineralisiertes Knochengewebe und Bindegewebe – grün
- Zellkerne – dunkelbraun bis schwarz

In keinem Präparat zeigten sich Anzeichen einer Infektion, wie Entzündungszellen, Destruktion der Knochenstruktur, Lyseränder oder -höhlen; jedoch war in allen Versuchsgruppen eine dünne Knochenlamelle neu gebildeten, mineralisierten Knochens entlang des Pin-Kanals erkennbar (Abbildung 18 a - d). Einschränkend sei bemerkt, dass die Beurteilung der histologischen Schnitte aufgrund von Artefaktbildungen deutlich reduziert und somit eine zuverlässige Aussage über eventuell vorhandene Knocheninfektionen nicht zu treffen war.

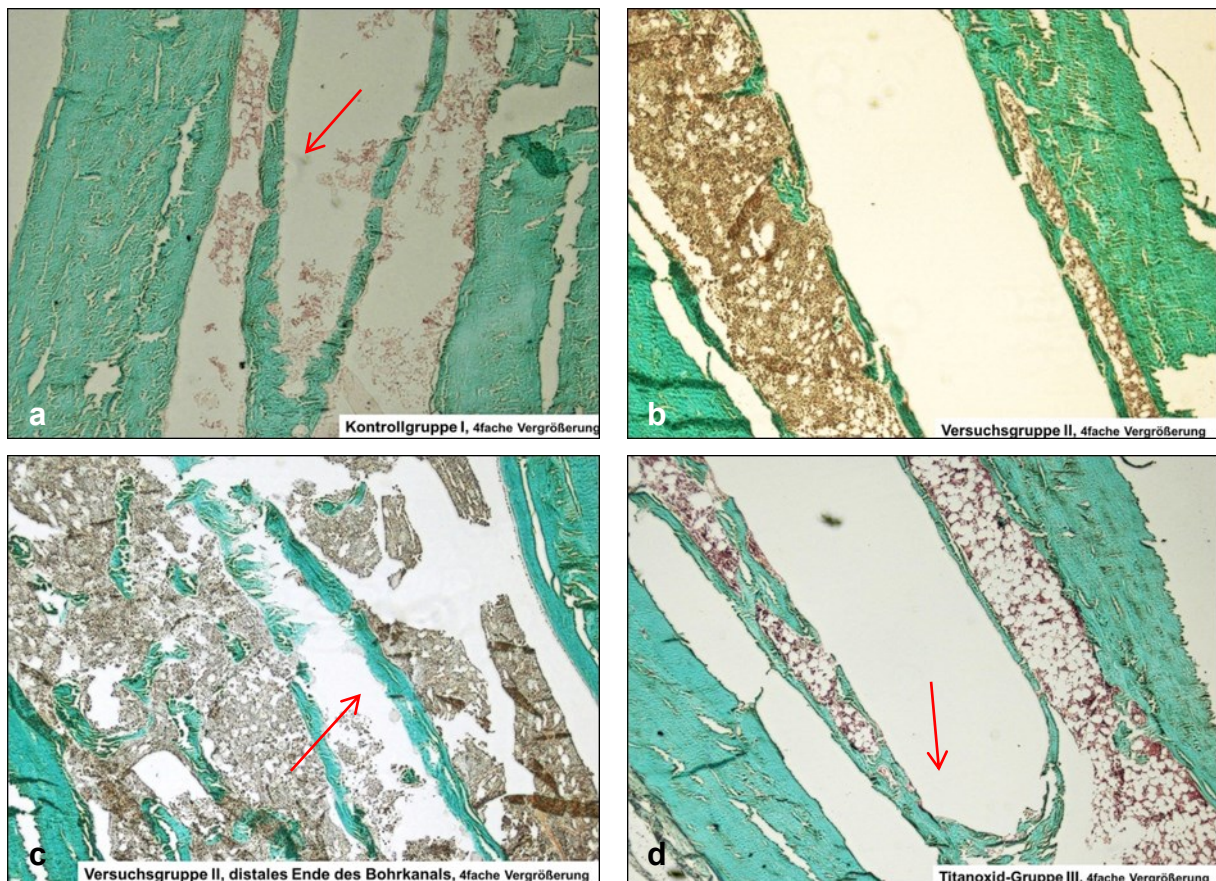


Abbildung 18: a) Histologische Darstellung eines Knochenpräparates der Kontrollgruppe I in vierfacher Vergrößerung; zu sehen ist das distale Ende des Bohrkans mit einer neu gebildeten feinen Knochenlamelle, die die Form der Pinspitze wiedergibt (grün; mit Pfeil markiert). Abbildung b) zeigt den zentralen Verlauf des Pin-Kanals in einer Knochenprobe der Versuchsgruppe II; es ist ebenfalls eine feine Knochenlamelle (grün) zu erkennen, welche den Pin-Kanal weitgehend auskleidet. Abbildung c) zeigt das distale Ende des Bohrkans einer Probe der Versuchsgruppe II, eine frische Knochenlamelle ist ebenfalls erkennbar (Pfeil); d) Abbildung des distalen Bohrkans mit gut sichtbarer Knochenlamelle (Pfeil) in einem Präparat der Versuchsgruppe III.

Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung

Aufgrund der vorliegenden mikrobiologischen und radiologischen Ergebnisse sind die Präparate nur stichprobenweise im Rasterelektronenmikroskop untersucht worden.

Es wurden gezielt die Pins ausgewählt, welche in den mikrobiologischen Analysen ein Bakterienwachstum gezeigt hatten. Im REM konnten trotzdem weder eindeutige Biofilmbildungen, noch deutliche *S. aureus* – Kolonien sicher erkannt werden (Abbildung 19 a und b).

S. aureus stellt sich als circa 1 µm messende, kugelförmige Struktur dar.

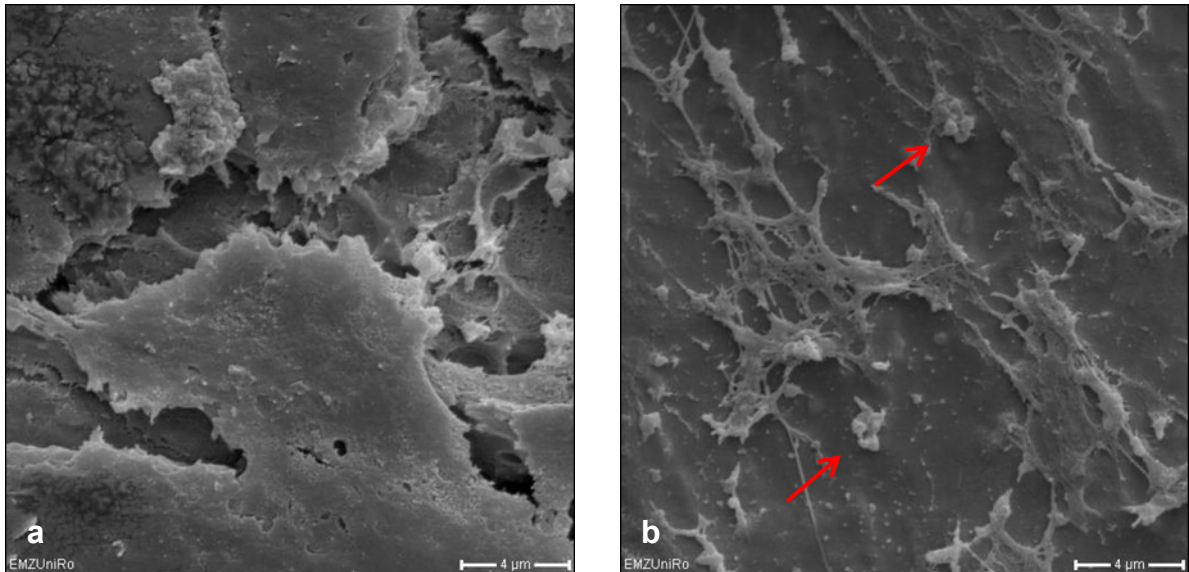


Abbildung 19: REM-Darstellungen in 5000facher Vergrößerung. Abbildung a) zeigt eine Pin-Oberfläche der Gruppe II, es sind keine Bakterien erkennbar. Auf der Abbildung b) sind vereinzelte Bakterienkolonien (Pfeile) auf einer Pinoberfläche aus der Gruppe IV zu erkennen. Deutliche Biofilmbildungen konnten in den untersuchten Proben nicht festgestellt werden.

3.1.2 Ergebnisse der Versuchsgruppen VI – IX; Inokulation von *S. epidermidis* (10^6 KBE/10 μ l)

Da *S. aureus* und *S. epidermidis* die häufigsten Verursacher der Implantat-assoziierten Infektion sind, wurden die verschiedenen Oberflächenbeschichtungen in einem zweiten Versuchsarm auf ihre prophylaktische Wirksamkeit gegen *S. epidermidis* – Infektionen untersucht. Hierfür wurden $n = 19$ Versuchstiere mit einem Durchschnittsalter von $68,7 \pm 17,1$ Tagen in die tierexperimentellen Untersuchungen aufgenommen. Kein Tier musste von den Analysen ausgeschlossen werden. Im Verlauf der Untersuchungen der Versuchsgruppe VI, welche einen unbeschichteten Pin eingesetzt bekam, zeigte sich bereits, dass durch *S. epidermidis* mit einer Keimkonzentration von 10^8 KBE/ml keine Infektion auszulösen war. Somit wurde der Schwerpunkt auf die Bioverträglichkeit der kupferhaltigen Oberflächenbeschichtung verlagert und die Versuchsgruppen VII und VIII nicht weiter untersucht; ein Tier der Gruppe VII (Cu-TiO₂) war zu diesem Zeitpunkt jedoch bereits in die Versuche eingeschlossen. Einen Überblick über die Einteilung der Versuchsgruppen gibt Tabelle 10:

Tabelle 10: Einteilung der Versuchsgruppen und Anzahl der untersuchten Tiere

Gruppen-Nummer	Beschichtung	Anzahl der Tiere (n)
VI	unbeschichtet	9
VII	TiO ₂	0
VIII	Cu-TiO ₂	1
IX	3xCu-TiO ₂	9

Zu Beginn der Untersuchungen wogen die Tiere im Durchschnitt $239,8 \pm 27,2$ g. 15 der 19 Tiere verloren innerhalb der ersten drei postoperativen Tage durchschnittlich $14,7 \pm 16,4$ g, im Verlauf nahmen allerdings alle Tiere an Gewicht zu (Endgewicht $288,4 \pm 20,2$ g; Gewichtszunahme während der Untersuchungszeit $69,8 \pm 13,3$ g). Keines der Tiere entwickelte Fieber, das heißt Temperaturen $> 38,5$ °C (rektal gemessen) oder zeigte Anzeichen von Lahmheit, Fress- oder Trinkunlust.

In vier Fällen (21 %) wurden postoperative Wundheilungsstörungen beobachtet, ohne dass auffällige Häufungen in einer der Untersuchungsgruppen zu beobachten waren. Eine definitive Wundheilung war nach circa einer Woche erreicht.

Mikrobiologische Ergebnisse

In keinem der intraoperativ entnommenen Wundabstriche konnte *S. epidermidis* nachgewiesen werden; in einem Fall kam es zu einer Kontamination, alle anderen Proben blieben steril.

In der Blutkultur waren ebenfalls keine *S. epidermidis* – Kolonien nachweisbar; in zwei Fällen zeigten sich Kontaminationen mit Keimen der kommensalen Hautflora.

In den mikrobiologischen Untersuchungen konnte bei einem Tier der Gruppe VI im Knochenpräparat *S. epidermidis* in einer Keimkonzentration von $7,47 \times 10^3$ KBE/mg Knochenpulver nachgewiesen werden, die parallel durchgeführten Untersuchungen des Pins zeigten kein Keimwachstum.

In allen anderen Analysen der Pins und Tibia-Präparate der mit *S. epidermidis* infizierten Versuchstiere konnte kein Bakterienwachstum ermittelt werden.

Ergebnisse der bildgebenden und histologischen Analysen

Röntgenologische Diagnostik

Die postoperativen Lokalisationskontrollen zeigten korrekte, intramedulläre Lagen des Pins. In den Verlaufskontrollen nach drei bzw. sechs Wochen konnten bei jeweils zwei Tieren leichte Veränderungen im Sinne von Sequestrierungen im proximalen oder zentralen Bereich des Pins erkannt werden (jeweils ein Punkt im Röntgen-Score). Alle anderen Röntgenaufnahmen zeigten blande Untersuchungsbefunde.

Ergebnisse der histologischen Untersuchung

In den histologischen Untersuchungen konnten keine Hinweise auf Implantat-assoziierte Infektionen gefunden werden. Bei allen Präparaten zeigte sich um das Implantatlager herum eine durchgängige Bindegewebsschicht mit intaktem Knochengewebe (Abbildung 20 a und b) ohne Infiltrationen durch Entzündungszellen, Lysesäume oder -zysten.

Auch in diesen Präparaten muss einschränkend vermerkt werden, dass durch eine ausgeprägte Artefaktbildung keine exakte Auswertung möglich war.

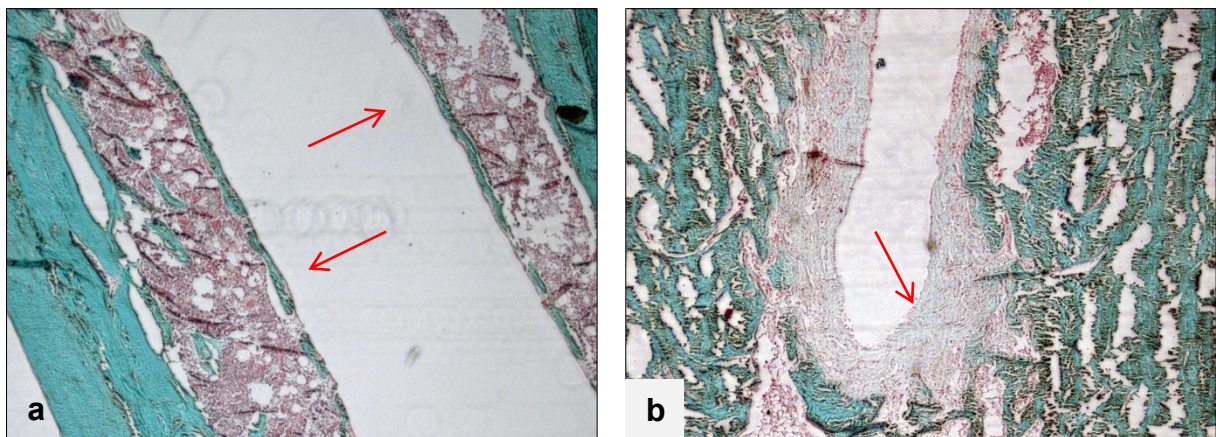


Abbildung 20: Histologische Darstellungen in vierfacher Vergrößerung, nach Masson-Goldner gefärbt. In Abbildung a) ist ein zentraler Abschnitt des Pinkanals in einer Probe der Gruppe VI zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Kanal mit einer dünnen Lamelle, neu gebildeten Knochens ausgekleidet ist (grüne Struktur lumenseitig; siehe Pfeile). Abbildung b) zeigt ein distales Ende des Pinkanals der Gruppe IX. Auch hier ist der Kanal mit Knochengewebe ausgekleidet, welches noch nicht vollständig kalzifiziert ist (Pfeil, hellgrüne Strukturen lumenseitig).

3.2 Metaphysäres Infektionsmodell

Die zuvor dargestellten Ergebnisse aus dem intramedullären Infektionsmodell führten zu einer Veränderung und Optimierung des Versuchsaufbaus. Es wurde die Erzeugung Implantat-assoziiertes Infektionen im metaphysären Bereich zur Wirksamkeitsuntersuchung prophylaktischer Oberflächenbeschichtungen von Dauerimplantaten fokussiert. Für die Etablierung des Modells und Ermittlung der zur Auslösung einer Infektion notwendigen, optimalen Erregermenge wurden $n = 40$ weibliche Ratten der Rasse *Sprague Dawley* als Versuchstiere in die Untersuchungen eingeschlossen. Da jeweils beide Hinterbeine für die Infektionsauslösung genutzt wurden, konnten $n = 80$ Proben für die Analysen verwendet werden. Kein Tier verstarb vor Beendigung des Versuches oder musste aus medizinischen oder tierschutzrechtlichen Gründen von den Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Zur Negativkontrolle erhielten $n = 8$ Ratten anstelle der Bakteriensuspension sterile PBS-Lösung. Des Weiteren wurden Bakteriensuspensionen mit Keimmengen von 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 und 10^7 KBE/15 μ l verwendet, so dass insgesamt sieben Versuchsgruppen definiert wurden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Gruppeneinteilung und Anzahl der Tiere des metaphysären Infektmodells

Gruppen-Nummer	Keimmenge (KBE/15 μ l)	Anzahl der Tiere (n)	Anzahl der infizierten Beine (n)
I	--	8	16
II	10^2	6	12
III	10^3	6	12
IV	10^4	8	16
V	10^5	8	16
VI	10^6	2	4
VII	10^7	2	4

Gewichts- und Temperaturveränderungen

Im Rahmen der Verlaufskontrollen wurde bei den Tieren unmittelbar postoperativ, am dritten Tag post operationem, sowie im Verlauf in wöchentlichen Abständen das Körpergewicht und die Temperatur bestimmt.

Am ersten Untersuchungstag wogen alle Tiere im Durchschnitt $279,5 \pm 13,7$ g (Mittelwert \pm Standardabweichung). Sie nahmen innerhalb der ersten drei Tage $3,5 \pm 8,7$ g und innerhalb der ersten Woche $3,3 \pm 13,2$ g ab, so dass sie zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt einen prozentualen Anteil des Ausgangsgewichts von $98,8 \pm 3,2$ % (Tag 3) bzw. $98,9 \pm 4,7$ % (Tag 7) erreichten. Im Verlauf des 42-tägigen Beobachtungszeitraumes nahmen die Tiere um $35,5 \pm 19,4$ g an Gewicht zu und wiesen somit $112,3 \pm 6,6$ % des Ausgangsgewichtes auf. Im Folgenden sind die Gewichtsveränderungen tabellarisch (Tabelle 12) dargestellt; bei den Messdaten des Körpergewichts handelt es sich um normalverteilte Stichproben ($p > 0,2$).

Signifikante Unterschiede im Gewichtsverhalten im Vergleich zu der Kontrollgruppe I ergaben sich insbesondere in der Gruppe II (Tag 3: $p = 0,043$, Tag 7: $p = 0,003$, Tag 42: $p = 0,001$), Gruppe III und V an Tag 7 (III: $p = 0,013$, V: $p = 0,038$) und in den Gruppen VI und VII jeweils an Tag 3 und 7 ($p = 0,044$). Die größten Gewichtszunahmen wurden in der Versuchsgruppe II verzeichnet, in der nach 3 Tagen $102,2 \pm 3,2 \%$, nach 7 Tagen $105,5 \pm 2,9 \%$ und nach 42 Tagen $124,2 \pm 3,2 \%$ des Ausgangsgewichts festgestellt wurden.

Tabelle 12: Gewichtsverhalten innerhalb des Untersuchungszeitraumes; angegeben ist das Gewicht an Tag 0 als Mittelwert \pm Standardabweichung in Gramm; an Tag 3, 7 und 42 ist der prozentuale Anteil des Ausgangsgewichtes als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. (*) bezeichnet signifikante Gewichtsveränderungen in Bezug auf das Ausgangsgewicht. Während in den Versuchsgruppen I und II ein relativ konstantes Zunehmen des Körpergewichtes zu erkennen ist, fallen insbesondere in der Gruppe VI und VII deutliche Gewichtsverluste innerhalb der ersten Woche und eine geringe Gewichtszunahme über den gesamten Untersuchungszeitraum auf.

Gruppe	Tag 0	Tag 3	Tag7	Tag 42
I	285,3 \pm 16,4	98,8 \pm 1,6 %	100,7 \pm 2,1 %	111,2 \pm 3,9 %
II	262,2 \pm 7,8	102,2 \pm 3,2 % (*)	105,5 \pm 2,9 % (*)	124,2 \pm 3,2 % (*)
III	272,5 \pm 9,7	99,0 \pm 2,6 %	97,0 \pm 1,9 % (*)	112,8 \pm 3,1 %
IV	283,9 \pm 10,3	97,8 \pm 2,9 %	98,7 \pm 3,6 %	108,0 \pm 3,1 %
V	286,5 \pm 11,7	99,2 \pm 3,0 %	97,4 \pm 3,7 % (*)	111,3 \pm 5,1 %
VI	280,0 \pm 8,5	93,9 \pm 0,7 % (*)	90,3 \pm 6,5 % (*)	109,9 \pm 5,3 %
VII	282,5 \pm 3,5	94,5 \pm 1,2 % (*)	93,1 \pm 1,2 % (*)	103,4 \pm 4,3 %
gesamt	279,5 \pm 13,8	98,8 \pm 3,2 %	98,9 \pm 4,7 %	112,3 \pm 6,6 %

Die größten Gewichtsabnahmen wurden bei Tieren der Versuchsgruppen VI und VII verzeichnet. Die beiden Tiere der Gruppe VI zeigten am 3. Tag 94,4 % und 93,4%, sowie am 7. Tag 85,7 % und 94,9 % des Ausgangsgewichts. In der Gruppe VII ergaben die Gewichtsbestimmungen 95,4 % und 93,7 % an Tag 3 und 93,9 %, sowie 92,3% an Tag 7. Zum Versuchsende erzielten die Tiere durchschnittlich $109,9 \pm 5,3 \%$ (Gruppe VI) und $103,4 \pm 4,3 \%$ (Gruppe VII) des ursprünglichen Gewichts.

Die rektal am wachen Tier gemessene Körpertemperatur an den jeweiligen Verlaufskontrollterminen lag zwischen $35,1 \text{ }^\circ\text{C}$ und $38,7 \text{ }^\circ\text{C}$ mit durchschnittlichen Körpertemperaturen zwischen $35,8$ und $38,0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Abbildung 21). Zu Versuchsbeginn wiesen die Tiere eine Körpertemperatur von $37,2 \pm 0,6 \text{ }^\circ\text{C}$ auf. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes wurden bei sieben Tieren Körpertemperaturen unter $36,0 \text{ }^\circ\text{C}$ und bei 20 Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten Temperaturen über $38,0 \text{ }^\circ\text{C}$ rektal gemessen, wobei die maximale Körpertemperatur bei einem Tier der Gruppe V mit $38,9 \text{ }^\circ\text{C}$ am 21. postoperativen Tag bestimmt wurde.

Diese Tiere verteilen sich auf die einzelnen Versuchsgruppen wie folgt:

	Temperatur < 36,0 °C:	Temperatur ≥ 38,0 °C:
Gruppe I	drei Tiere	drei Tiere
Gruppe II		fünf Tiere
Gruppe III		vier Tiere
Gruppe IV		drei Tiere
Gruppe V	drei Tiere	fünf Tiere
Gruppe VI		
Gruppe VII	ein Tier	

Bei der Betrachtung der Temperaturverläufe und Fieberentwicklung lassen sich keine eindeutigen Tendenzen und Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen erkennen.

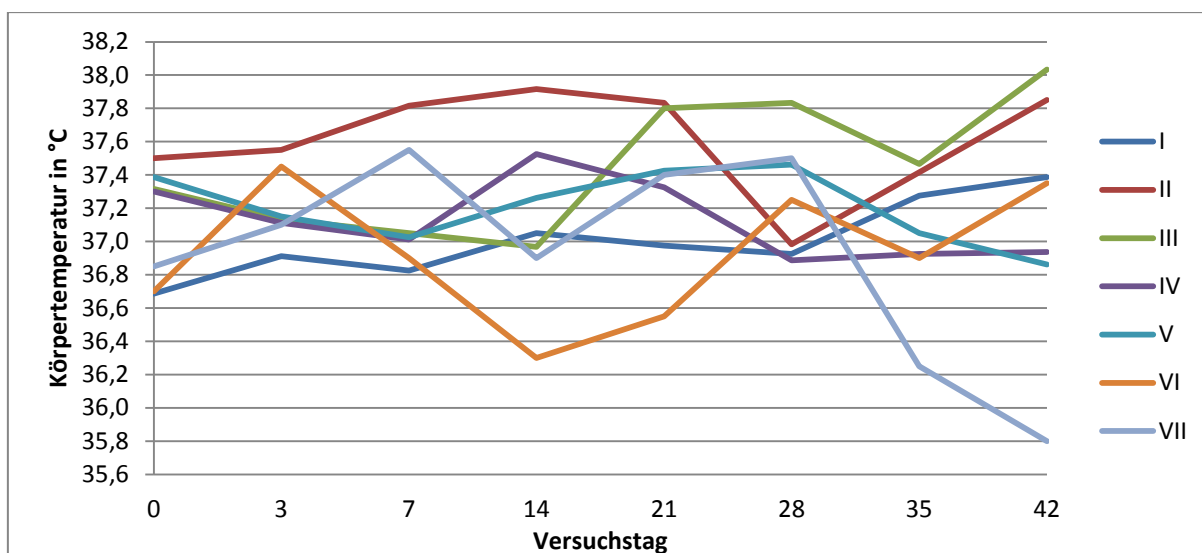


Abbildung 21: Veränderungen der Körpertemperatur (rektal) während des Beobachtungszeitraumes von 42 Tagen, die grafische Darstellung zeigt, dass eine überwiegende Anzahl an Messdaten im mittleren Bereich zwischen 36,6 und 37,8 °C liegen und keine deutlichen Abweichungen einzelner Gruppen zu erkennen sind. Die Daten sind als Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen in °C angegeben.

Körperliche Untersuchungen

Zusätzlich zu den Bestimmungen des Gewichtes und der Temperatur erfolgte bei den jeweiligen Verlaufskontrollen eine klinische Untersuchung mit besonderem Augenmerk auf die Hinterbeine, eventuell bestehende Haut- und Weichteilveränderungen sowie Deformierungen der Knochen.

Innerhalb der ersten Woche zeigten sich alle Tiere der postoperativen Situation entsprechend. Anzeichen von Lahmheit, extremer Scheu oder Deformierungen wurden nicht beobachtet.

In der Kontrollgruppe I (PBS) zeigte keines der Tiere klinische Auffälligkeiten bzw. Zeichen einer lokalen oder systemischen Infektion. Die Implantate waren am Tag der Explantation fest in den Knochen integriert, in zwei Fällen waren sie am dorsomedialen Rand der Tibia gar nicht bzw. nur spärlich von Knochengewebe umgeben (Abbildung 22 a).

In den Versuchsgruppen II (10^2 KBE) und III (10^3 KBE) wiesen die Tiere innerhalb des 42 tägigen Beobachtungszeitraumes keinerlei Auffälligkeiten oder klinische Anzeichen einer lokalen oder systemischen Infektion auf. Die Implantate waren allesamt fest in den Knochen integriert.

In der Versuchsgruppe IV (10^4 KBE) zeigten sechs der acht Versuchstiere über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg ein völlig adäquates und klinisch unauffälliges Verhalten. Bei einem Tier war an Tag 21 ein erbsgroer, derber Tumor über der Implantationsstelle des rechten Beines zu erkennen (ähnlich Abbildung 22 b, Abbildung 23 a), welcher im Verlauf an Größe abnahm. Das Tier zeigte keine Auffälligkeiten in der Bewegung. Bei der Entnahme der Proben war das Implantat beidseits im Knochenbett lokalisiert, aber nicht in dieses eingewachsen.



Abbildung 22: a) Ansicht eines Unterschenkels der Gruppe I während der Freipreparation des Knochens von umgebenden Weichteilstrukturen mit Blick von dorsomedial auf die Tibiaruckflache. Es ist zu erkennen, dass das Implantat dorsal nicht von Knochengewebe umgeben ist. b) Hautschnitt über der Implantationsstelle; eine circa 5 mm messende Schwellung ist oberhalb der Implantatoberfläche erkennbar (Pfeil)

Bei einem weiteren Tier dieser Versuchsgruppe kam es bei Implantation und Setzen der Infektion rechts zu einer Splitterfraktur der das Implantat umgebenden Kortikalis. Das Tier erhielt postoperativ Buprenorphin zur Analgesie. Es zeigte zunächst einen unauffälligen postoperativen Verlauf mit normalem Bewegungs- und Fressverhalten bis zum Tag 21, an dem eine deutliche, tumoröse Schwellung über der rechten Implantationsstelle auffiel. In der Röntgenkontrolle an Tag 21 post operationem war das Implantat außerhalb des Knochens und innerhalb der Schwellung lokalisiert (Abbildung 23 b). Im Verlauf zeigte das Tier deutlich lahrende Bewegungen des rechten Hinterbeines. Die Schwellung blieb bestehen, zu einem Eiteraustritt kam es nicht. Bei Explantation der Proben zeigte sich, dass sich das Implantat in einer Weichteilkapsel befand, welche mit einer Eiter-ähnlichen, grobkörnigen Masse angefüllt war. Das Implantat auf der Gegenseite war ebenfalls locker, jedoch im Bohrloch lokalisiert, Eiter war nicht erkennbar. Bei weiteren drei Tieren waren die Implantate

bei der Entnahme ein- oder beidseits nicht fest in das Knochengewebe eingewachsen, ohne dass klinische Auffälligkeiten bei diesen Tieren zu beobachten waren (vgl. Abbildung 24 a und b). Alle anderen Implantate der Gruppe IV (insgesamt 10 von 16) zeigten einen festen Sitz im Knochen.

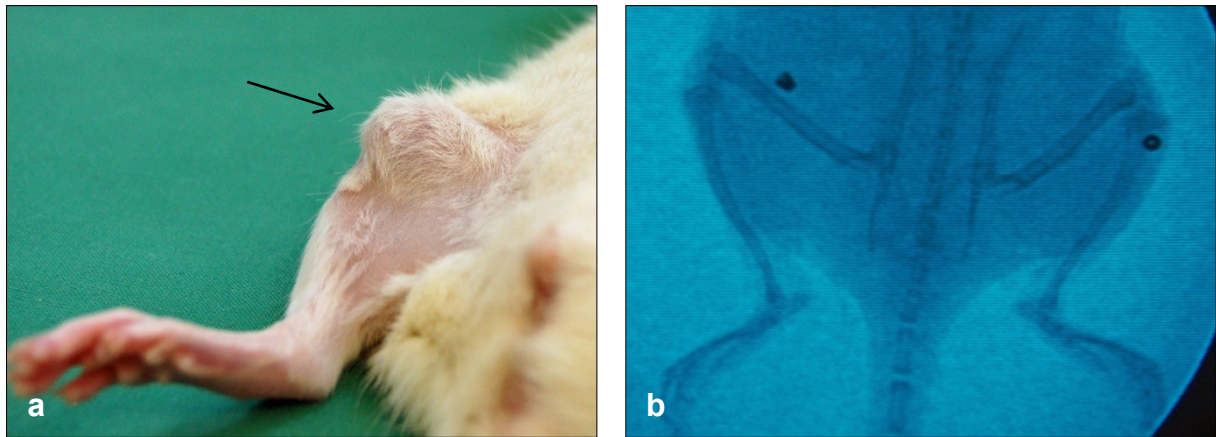


Abbildung 23: a) Körperliche Untersuchung nach 21 Tagen in Narkose; zu erkennen ist ein etwa erbsgroßer Tumor (Pfeil) über der Implantationsstelle. b) zeigt eine Röntgenkontrolle nach 21 Tagen des Beckens sowie der unteren Extremitäten beidseits in anterior-posteriorem Strahlengang: das Implantat rechts befindet sich außerhalb des Knochens.

In der Versuchsgruppe V (10^5 KBE) konnte bei fünf von acht untersuchten Tieren ein völlig unauffälliges Verhalten ohne makroskopische Veränderungen an den Implantationsstellen beobachtet werden. Zwei Tiere wiesen tumoröse Weichteilschwellungen an den Implantationsstellen ohne Hautveränderungen auf, welche im Verlauf an Größe zunahmten (bis circa 10 mm Durchmesser). Bei beiden Tieren waren die Implantate nicht fest in den Knochen integriert, in einem Fall befand sich über dem Implantat ein circa 10 mm messender Weichteilabszess. Ein weiteres Tier zeigte zusätzlich lahmes Verhalten in den ersten 14 Tagen mit Dominanz auf der linken Seite. Im Verlauf entwickelte sich links eine größenprogrediente, tumoröse, derbe Weichteilschwellung oberhalb der Implantationsstelle. In der radiologischen Verlaufskontrolle an Tag 21 zeigte sich links das Implantat außerhalb des Knochens lokalisiert. Bei der Explantation nach 42 Tagen befand sich das Implantat in einer Eiter-gefüllten Abszesshöhle, die sich im Knochen- und Weichteilgewebe ausbreitete. Zusätzlich waren Nekrosezeichen an der linken Tibia deutlich erkennbar (vgl. Abbildung 26 b). Auf der rechten Seite zeigte sich an der Implantationsstelle eine offene und eitrige Hautläsion über einer relativ gering ausgeprägten, tumorösen Veränderung. Das Implantat befand sich locker im Knochengewebe in einem deutlich erkennbaren Entzündungsbereich. Fünf weitere Implantate der Gruppe V waren locker im Knochen lokalisiert, ohne dass die Tiere klinisch auffällig waren (vgl. Abbildung 24 b). Fünf der 16 Implantate waren fest in den Knochen integriert.

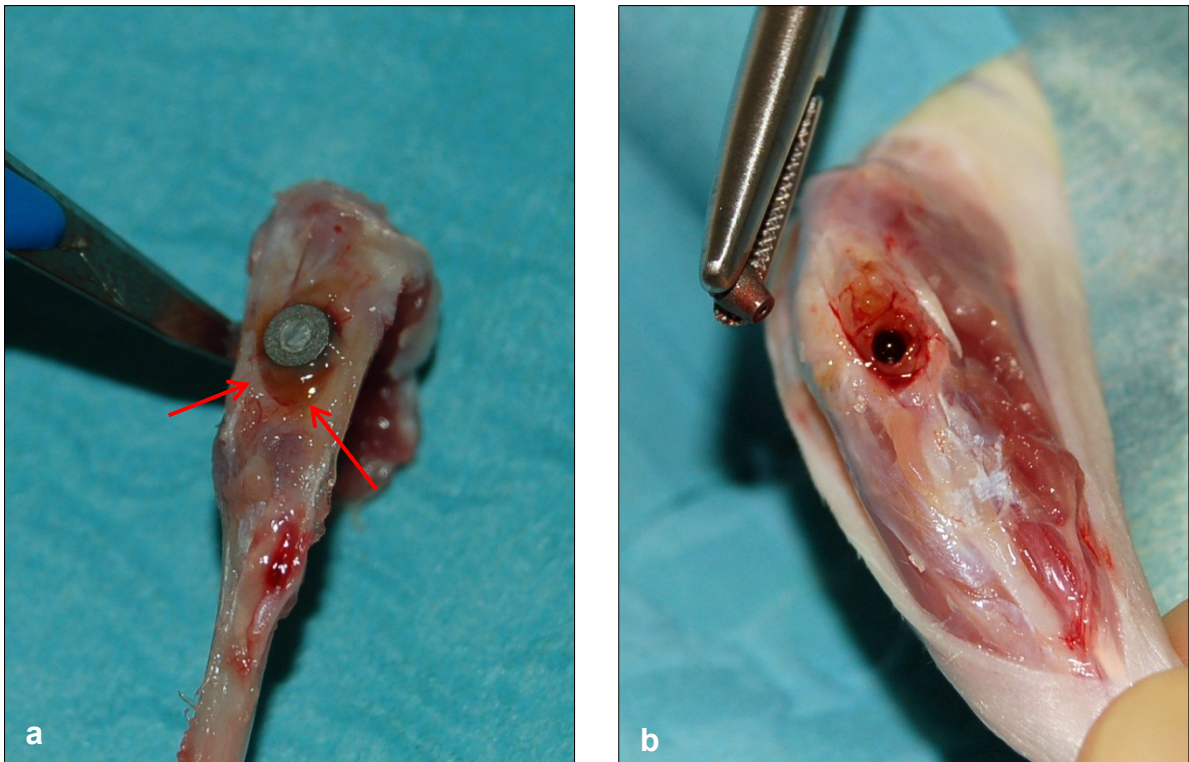


Abbildung 24: a) Zu erkennen ist der freipräparierte Knochen mit dem Implantat, um welches Lysesäume deutlich erkennbar sind (Pfeile), das Implantat war nicht fest in den Knochen integriert. b) Darstellung während der Explantation, das Implantat war lose im Knochenbett lokalisiert und ohne aufwändige Maßnahmen zu entfernen. In den Weichteilen zeigten sich keine offensichtlichen Entzündungszeichen.

Die beiden Versuchstiere der Gruppe VI (10^6 KBE) zeigten von Beginn an lahmes Verhalten ohne eindeutige Seitendifferenz. Ein Tier wies an Tag 7 beidseits derbe Verdickungen über den Implantationsstellen auf, welche primär zunächst links, im Verlauf auch rechts an Größe zunahm. An Tag 42 zeigte die Schwellung auf der rechten Seite eine mit Schorf bedeckte Hautläsion. In der Abschluss-Röntgenkontrolle befand sich das Implantat außerhalb des Knochens im Weichteilgewebe, projiziert auf die tumoröse Schwellung. Bei dem zweiten Versuchstier waren ebenfalls ab Tag 7 beidseitige Schwellungen über den Implantationsstellen zu erkennen, welche im Verlauf an Größe abnahmen. Bei den Tieren dieser Versuchsgruppen befanden sich drei der vier Implantate in großen Abszesshöhlen außerhalb des Knochens, welche paraartikulär auf Höhe des Kniegelenkes lokalisiert waren (Abbildung 25 a und b).

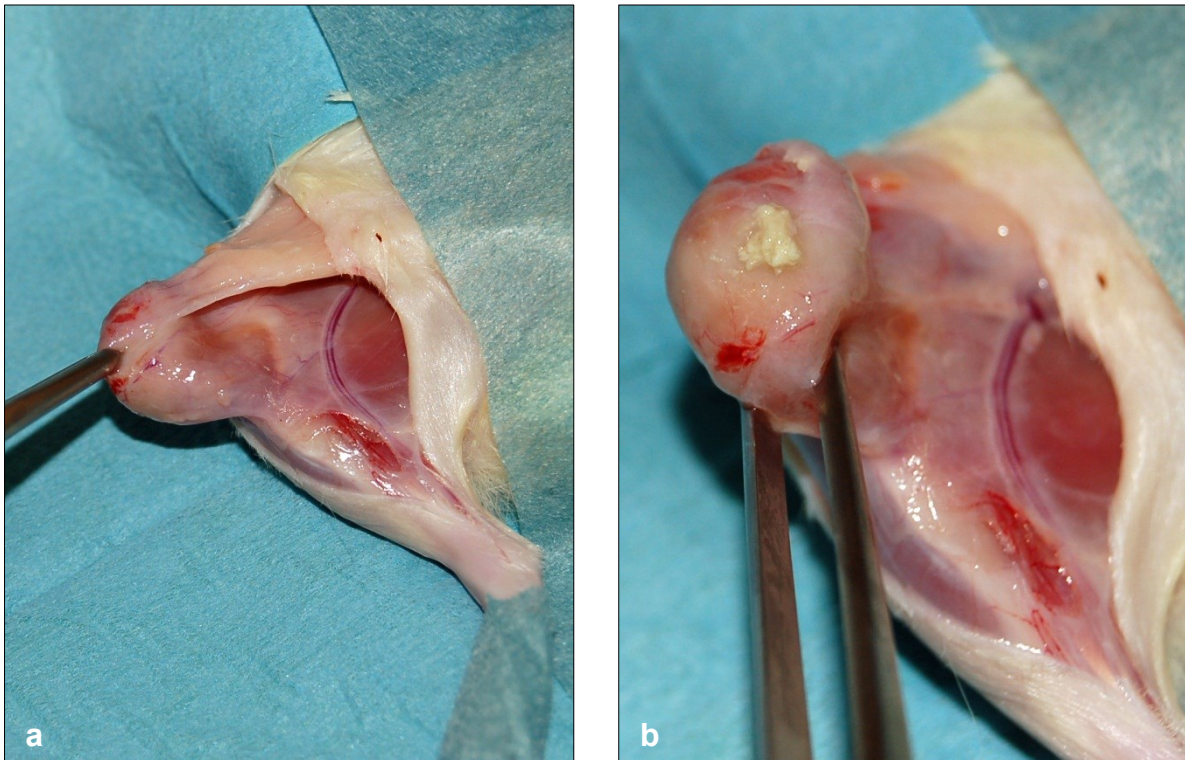


Abbildung 25: a) Darstellung während der Explantation. Nach dem Hautschnitt erscheint eine tumoröse Schwellung über dem Implantat, welche allseits von feinen Weichteilstrukturen umkapselt ist. b) Bei leichtem Druck auf die Kapsel eröffnet sich diese an der Oberseite und eitrige Masse entleert sich. Die tumoröse Struktur präsentiert sich als eine Abszesshöhle oberhalb der Implantatlokalisierung.

In der Versuchsgruppe VII (10^7 KBE) wies ein Tier eine beidseitige, derbe Schwellung mediokaudal der Kniegelenke auf, welche sich im Verlauf der Beobachtungen zurückbildete. Das zweite Tier dieser Untersuchungsgruppe zeigte an Tag 7 eine fibrinös belegte Hauttasche über der Implantationsstelle rechts, aus der sich im Verlauf Eiter entleerte. Im Abstrich konnten *S. aureus*- und *Proteus mirabilis*-Kolonien nachgewiesen werden. Die Wunde verheilte innerhalb von vier Wochen. Auf der linken Seite zeigte sich an Tag 21 ein stark verkürztes Bein mit deutlich verhärteter Muskulatur. Das Bein wurde zunächst kaum belastet, im Verlauf zeigte sich jedoch eine Befundverbesserung und eine vermehrte Aktivität des Tieres. Das Implantat war am Tag der Explantation fest in die proximale Tibia eingewachsen, allerdings wies das Kniegelenk femoral und tibial deutliche Deformierungen und Verdickungen auf (vgl. Abbildung 26 a). Die Implantate der übrigen drei Proben waren locker in großen Infektionshöhlen im Knochen lokalisiert (vgl. Abbildung 26 b).

Bei einigen Tieren aller infizierter Untersuchungsgruppen (II bis VII) zeigten sich nach dem Hautschnitt, bei primär äußerlich unauffälligen Haut- und Weichteilbefunden, lokalisierte, etwa 5 mm messende, runde Schwellungen über den Implantatoberseiten, welche zum Teil von leicht entzündlich verändertem Gewebe umgeben waren (Abbildung 27 a). Bei weiterer Eröffnung der Schwellung präsentierte sich eine wachsartige, deckelförmige Struktur, die an die ursprüngliche Form und Textur des Knochenwachses erinnerte (Abbildung 27 b). Retrospektiv ist bei fehlender eindeutiger Dokumentation dieses Phänomens eine genaue Bezifferung und Zuordnung zu den einzelnen Untersuchungsgruppen nicht möglich.



Abbildung 26: Darstellungen nach Exartikulation des Knochens und Entfernung der Weichteilstrukturen. a) Sicht von medial auf die proximale Tibia, die Form des Kniegelenkes (Tibiaplateau) ist kaum abzugrenzen, das Knochengewebe ist weich, aufgelockert, Osteolysen sind deutlich erkennbar. b) Darstellung der proximalen Tibia, Aufsicht von medial auf die ursprüngliche Implantationsstelle. Das Gewebe ist nekrotisch, Osteolysen sind deutlich zu erkennen



Abbildung 27: Darstellung während der Explantation nachdem die Haut über dem Kniegelenk und der Tibia großzügig eröffnet wurde. a) Lokale, umschriebene Schwellung oberhalb der Implantatstelle; leichte Entzündungszeichen sind erkennbar. b) Bei weiterer Eröffnung der Schwellung präsentiert sich ein wachsähnlicher Stöpsel auf der Implantatoberseite; möglicherweise ein Anhalt für Knochenwachs als Ursprung der Schwellung.

Mikrobiologische Ergebnisse

Kontrolle der Keimkonzentrationen der verwendeten Bakteriensuspensionen

Die eingefrorenen Bakteriensuspensionen, welche zu je 1 ml in Kryo-Tubes aliquotiert vorlagen, wurden unmittelbar nach dem Auftauen und der Entnahme von 15 µl für die Injektion in den Knochen ausplattiert und so hinsichtlich der Keimkonzentration und Lebensfähigkeit der Bakterien untersucht. In allen Suspensionen waren die Bakterien zu diesem Zeitpunkt lebensfähig.

Die größten Abweichungen von der zuvor definierten und gewünschten Keimmenge wurden bei 1×10^2 KBE/15 µl und bei 1×10^6 KBE/15 µl ermittelt. In der Untersuchungsgruppe II ergab die Kontrolle der Bakterienkonzentration durchschnittlich $3,75 \times 10^2$ KBE/15 µl. Somit wurde das 3,75 fache der gewünschten Bakterienmenge in den Knochen eingebracht. Die Einstellung einer Bakteriensuspension mit 10^2 KBE/15 µl war daher nicht exakt möglich. In der Untersuchungsgruppe VI hingegen sind bei den vier verwendeten Suspensions-Aliquots wahrscheinlich aufgrund von technischen Ungenauigkeiten im Rahmen der Lernkurve im Durchschnitt lediglich $6,7 \times 10^5$ KBE/15 µl Suspension gemessen worden, so dass durchschnittlich die 3,3 fach geringere Bakterienmenge in den Knochen eingebracht wurde (vgl. Tabelle 13).

Tabelle 13: Kontrolle der eingesetzten Bakterienkonzentrationen; angegeben in Mittelwert \pm Standardabweichung pro 15 µl der Bakteriensuspension. In Gruppe III – V sowie VII werden die angestrebten Keimmengen relativ genau erreicht, in der Gruppe II ist die Suspension zu konzentriert, in Gruppe VI sind zu wenig Bakterien in der Suspension enthalten.

Gruppe	II	III	IV	V	VI	VII
gewünschte KBE	1×10^2	1×10^3	1×10^4	1×10^5	1×10^6	1×10^7
eingebrachte KBE	$3,75 \times 10^2$ $\pm 1,25 \times 10^2$	$1,88 \times 10^3$ $\pm 2,19 \times 10^2$	$8,33 \times 10^3$ $\pm 2,44 \times 10^3$	$1,25 \times 10^5$ $\pm 2,20 \times 10^4$	$6,7 \times 10^5$ $\pm 1,25 \times 10^5$	$1,04 \times 10^7$ $\pm 1,03 \times 10^6$

Ergebnisse der Wundabstriche

Bei der Explantation der Implantate und Probenentnahme wurden nach dem Hautschnitt von der Oberfläche des Implantates Wundabstriche analog der klinischen Routinediagnostik für Abstrich-Untersuchungen genommen, welche aerobe, anaerobe sowie gram-negative Keime erfasst. In einer anschließenden Spa-Typisierung wurde die Übereinstimmung der ermittelten Keime mit dem ursprünglich eingebrachten *S. aureus* – Stamm ATCC 25923 überprüft.

In der Kontrollgruppe I wurden bei zwei der acht untersuchten Tiere Bakterien in den Wundabstrichen nachgewiesen. In einem Fall handelte es sich um eine Kontamination durch Fremdkeime – *Staphylococcus warneri*, ein Keim der kommensalen Hautflora, und *Proteus mirabilis*, ein fakultativ pathogener Keim der Darmflora – bei dem anderen Tier wurde eine Kontamination mit dem ursprünglichen *S. aureus* – Keim nachgewiesen, welche möglicherweise durch den Handkontakt mit anderen, infizierten Tieren übertragen wurde. Die Abstriche der übrigen fünf Tiere blieben steril.

In der Versuchsgruppe II (10^2 KBE) waren 10 Abstriche (83 %) positiv für *S. aureus*, in der Versuchsgruppe III (10^3 KBE) ergaben alle 12 Abstriche einen positiven *S. aureus* – Befund.

In der Gruppe IV (10^4 KBE) wurde in 13 Abstrichen (81 %) und in der Versuchsgruppe V (10^5 KBE) in allen 16 Abstrichen der ursprüngliche *S. aureus* – Stamm nachgewiesen. Bei den Versuchsgruppen VI (10^6 KBE) und VII (10^7 KBE) waren ebenfalls alle Abstriche positiv für *S. aureus*. Einen tabellarischen Überblick gibt Tabelle 14.

Tabelle 14: Positiver Nachweis des ursprünglich verwendeten *S. aureus* – Stammes pro Versuchsgruppe (Angabe in absoluten Fallzahlen)

Gruppe	I	II	III	IV	V	VI	VII
Gesamtanzahl der Proben	16	12	12	16	16	4	4
<i>S. aureus</i> - Nachweis	1	10	12	13	16	4	4

Quantitativer *S. aureus* – Nachweis im Knochen

Eine Implantat-assoziierte Infektion manifestiert sich sowohl am Implantat, als auch im umgebenden Knochengewebe. Um zu untersuchen, ob und wie viele Bakterien sich im Knochen der proximalen Tibia nach dem sechswöchigen Beobachtungsintervall befinden, wurden die Bakterien durch eine Rüttler-Behandlung aus dem Knochen gewaschen und in PBS-Puffer gelöst. Basierend auf dieser Lösung wurde die Lebendkeimzahl jeder einzelnen Tibiaprobe bestimmt. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Analysen lagen in nicht-Normalverteilung vor ($p < 0,05$).

In der Kontrollgruppe I (PBS) wurden keine Bakterien im Knochengewebe nachgewiesen, die Proben blieben allesamt steril.

In der Versuchsgruppe II (10^2 KBE) und III (10^3 KBE) wurden jeweils nur 10 der 12 Tibiapräparate mikrobiologisch untersucht, da je zwei komplette Tibia- und Implantatproben pro Versuchsgruppe für eine histologische Untersuchung verwendet wurden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgestellt wird. In allen Tibiapräparaten der Versuchsgruppe II (10^2 KBE) konnte *S. aureus* nachgewiesen werden. Im Median lag die Keimmenge bei $4,29 \times 10^4$ KBE/ml, mit einem Maximum von $1,44 \times 10^5$ KBE/ml und einem Minimum von $8,4 \times 10^3$ KBE/ml.

In der Versuchsgruppe III (10^3 KBE) waren ebenfalls alle Knochenproben positiv für *S. aureus* mit einer medianen Bakterienkonzentration von $9,7 \times 10^3$ KBE/ml, einer maximalen Konzentration von $4,8 \times 10^4$ KBE/ml und einem Minimum von $7,7 \times 10^2$ KBE/ml.

In der Versuchsgruppe IV, welche mit 10^4 KBE beimpft wurde, konnte in einer Probe kein Bakterienwachstum beobachtet werden (an dem dazu gehörigen Implantat wurden Bakterien nachgewiesen). Insgesamt wurden Bakterienmengen von $1,03 \times 10^4$ KBE/ml (Median) ermittelt. Der maximale Wert betrug $7,0 \times 10^4$ KBE/ml und der minimale null KBE/ml.

Bei der Versuchsgruppe V (10^5 KBE) ließ sich in allen Knochenproben ein Bakterienwachstum mit $6,8 \times 10^3$ KBE/ml untersuchter Suspension im Median nachweisen. Maximal wurden $4,4 \times 10^4$ KBE/ml und minimal $2,05 \times 10^2$ KBE/ml gemessen.

In der Versuchsgruppe VI (10^6 KBE) ergaben die mikrobiologischen Analysen aller vier Proben Bakterienkonzentrationen von $7,5 \times 10^4$ KBE/ml, mit einem Maximum von $2,85 \times 10^5$ KBE/ml und einem

Minimum von null KBE/ml. In der Gruppe VII (10^7 KBE) wurde *S. aureus* in einer medianen Konzentration von $6,0 \times 10^4$ KBE/ml an allen vier Tibiae ermittelt. Der maximale Wert war $9,66 \times 10^4$ KBE/ml und der minimale $4,66 \times 10^4$ KBE/ml.

In allen infizierten Versuchsgruppen II bis VII sind durchschnittlich signifikant mehr *S. aureus* – Kolonien im Knochengewebe nachgewiesen worden, als in der Kontrollgruppe I ($p = 0,001$).

Quantitativer *S. aureus* – Nachweis am Implantat

Ein Merkmal der Implantat-assoziierten Infektionen ist die Biofilmbildung auf der Implantatoberfläche durch die verursachenden Bakterien. Um die Bakterien auf den Implantaten nachweisen zu können, wurden diese mittels Ultraschallbehandlung von der Oberfläche gelöst und aus der so entstandenen Bakteriensuspension die Keimmenge mittels Ausplattieren bestimmt. Auch bei diesen Ergebnissen handelt es sich um nicht-normalverteilte Messwerte ($p < 0,05$).

Die Implantate der Kontrollgruppe I blieben alle steril, es konnte kein Bakterienwachstum nachgewiesen werden. Wie bereits bei den Knochenanalysen erwähnt, wurden aufgrund der histologischen Untersuchung in der Versuchsgruppe II und III nur jeweils 10 der 12 Implantate mikrobiologisch untersucht. In Gruppe II (10^2 KBE) wurden Bakterienkonzentrationen im Median von $5,7 \times 10^5$ KBE/ml (Maximum: $3,85 \times 10^7$ KBE/ml, Minimum: $6,0 \times 10^4$ KBE/ml) und in der Gruppe III (10^3 KBE) $5,1 \times 10^5$ KBE/ml (Maximum: $9,4 \times 10^6$ KBE/ml, Minimum: $8,9 \times 10^4$ KBE/ml) ermittelt.

In der Gruppe IV (10^4 KBE) waren an einem Implantat keine Bakterien nachweisbar, die dazu gehörige Knochenprobe war positiv. Insgesamt wurde *S. aureus* im Median in einer Konzentration von $1,1 \times 10^5$ KBE/ml mit einem Maximum von $1,66 \times 10^6$ KBE/ml und einem Minimum von null KBE/ml ermittelt.

In der Versuchsgruppe V (10^5 KBE) zeigten alle Implantate einen Bakterienbewuchs mit einer Keimkonzentration von $1,3 \times 10^5$ KBE/ml (Median). Maximal wurden $2,03 \times 10^6$ KBE/ml und minimal $1,47 \times 10^3$ KBE/ml ermittelt. An den Implantaten der Gruppe VI (10^6 KBE) wurde ein medianes Keimwachstum von $9,4 \times 10^4$ KBE/ml (Maximum: $2,61 \times 10^5$ KBE/ml; Minimum: $2,1 \times 10^4$ KBE/ml) und in der Gruppe VII (10^7 KBE) von $9,9 \times 10^6$ KBE/ml (Maximum: $1,85 \times 10^7$ KBE/ml, Minimum: $1,23 \times 10^6$ KBE/ml) nachgewiesen.

In allen infizierten Versuchsgruppen (II bis VII) wurden am Implantat signifikant mehr *S. aureus* – Kolonien nachgewiesen, als in der Kontrollgruppe I (p stets $\leq 0,05$). Einen tabellarischen, sowie grafischen Überblick über die mikrobiologischen Ergebnisse geben Tabelle 15 und Abbildung 28.

Tabelle 15: Mikrobiologische Ergebnisse der Knochen- und Implantatanalysen.

Die Keimkonzentrationen des *S. aureus* - Nachweises sind angegeben als Median und Maximum / Minimum (/), jeweils in KBE/ml untersuchter Lösung.

S. aureus – Nachweis	II	III	IV	V	VI	VII
Knochen KBE/ml	4,29x10 ⁴ (1,44x10 ⁵ / 8,4x10 ³)	9,7x10 ³ (4,8x10 ⁴ / 7,7x10 ²)	1,03x10 ⁴ (7,0x10 ⁴ / 0,0)	6,8x10 ³ (4,4x10 ⁴ / 2,05x10 ²)	7,5x10 ⁴ (2,85x10 ⁵ / 0,0)	6,0x10 ⁴ (9,66x10 ⁴ / 4,66x10 ⁴)
Implantat KBE/ml	5,7x10 ⁵ (3,85x10 ⁷ / 6,0x10 ⁴)	5,1x10 ⁵ (9,4x10 ⁶ / 8,9x10 ⁴)	1,1x10 ⁵ (1,66x10 ⁶ / 0,0)	1,3x10 ⁵ (2,03x10 ⁶ / 1,47x10 ³)	9,4x10 ⁴ (2,61x10 ⁵ / 2,1x10 ⁴)	9,9x10 ⁶ (1,85x10 ⁷ / 1,23x10 ⁶)

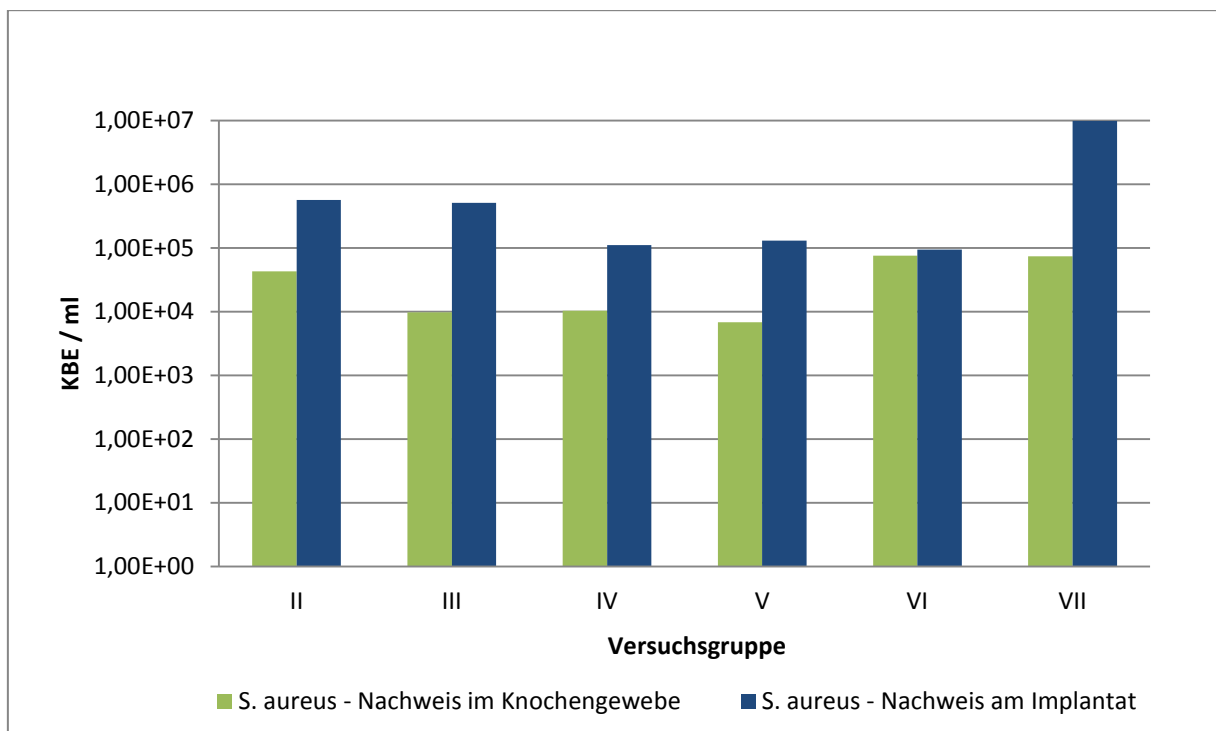


Abbildung 28: Grafische Darstellung der mikrobiologischen Ergebnisse im Überblick. Dargestellt sind jeweils die Mediane der Keimkonzentrationen in KBE/ml in den Untersuchungsmaterialien Knochen (grün) und Implantat (blau).

Übersicht über die mikrobiologischen Ergebnisse je Versuchsgruppe in Verbindung mit den makroskopischen Befunden bei Explantation und Probenentnahme:

- **Kontrollgruppe I**
 - 16 untersuchte Proben
 - 1 Wundabstrich positiv (Kontamination)
 - Alle Implantate fest in den Knochen integriert
 - Kein *S. aureus* – Nachweis im Knochengewebe oder am Implantat

- **Versuchsgruppe II (10² KBE)**
 - 12 untersuchte Proben
 - 10 Wundabstriche positiv
 - Alle Implantate fest in den Knochen integriert
 - 4,29x10⁴ (max 1,44x10⁵, min 8,4x10³) KBE/ml im Knochen
 - 5,7x10⁵ (max 3,85x10⁷, min 6,0x10⁴) KBE/ml am Implantat

- **Versuchsgruppe III (10³ KBE)**
 - 12 untersuchte Proben
 - 12 Wundabstriche positiv
 - Alle Implantate fest in den Knochen integriert
 - 9,7x10³ (max 4,8x10⁴, min 7,7x10²) KBE/ml im Knochen
 - 5,1x10⁵ (max 9,4x10⁶, min 8,9x10⁴) KBE/ml am Implantat

- **Versuchsgruppe IV (10⁴ KBE)**
 - 16 untersuchte Proben
 - 13 Wundabstriche positiv
 - 10 Implantate fest in den Knochen integriert, 5 locker im Knochengewebe ohne Eiterhinweis, ein Implantat außerhalb des Knochens in Abszesshöhle
 - 1,03x10⁴ (max 7,0x10⁴, min 0,0) KBE/ml im Knochen
 - 1,1x10⁵ (max 1,66x10⁶, min 0,0) KBE/ml am Implantat

- **Versuchsgruppe V (10⁵ KBE)**
 - 16 untersuchte Proben
 - 16 Wundabstriche positiv
 - 5 Implantate fest in den Knochen integriert, 9 locker im Knochen sitzend ohne Eiterhinweise und 2 Implantate locker innerhalb oder außerhalb des Knochens lokalisiert, Eiter deutlich erkennbar
 - 6,8x10³ (max 4,4x10⁴, min 2,05x10²) KBE/ml im Knochen
 - 1,3x10⁵ (max 2,03x10⁶, min 1,47x10³) KBE/ml am Implantat

-
- **Versuchsgruppe VI (10^6 KBE)**
 - 4 untersuchte Proben
 - 4 Wundabstriche positiv
 - ein Implantat fest in den Knochen integriert, ein Implantat locker im Knochenbett ohne Hinweis auf Eiteransammlungen und 2 Implantate in deutlichen Abszesshöhlen lokalisiert
 - $7,5 \times 10^4$ (max $2,85 \times 10^5$, min 0,0) KBE/ml im Knochen
 - $9,4 \times 10^4$ (max $2,61 \times 10^5$, min $2,1 \times 10^4$) KBE/ml am Implantat

 - **Versuchsgruppe VII (10^7 KBE)**
 - 4 untersuchte Proben
 - 4 Wundabstriche positiv
 - ein Implantat fest in das Knochengewebe integriert bei deutlich deformiertem Kniegelenk, ein Implantat locker im Knochenbett ohne eindeutigen Entzündungsnachweis, 2 Implantate in großen Infektionshöhlen lokalisiert mit deutlichen Nekrosezeichen
 - $6,0 \times 10^4$ (max $9,66 \times 10^4$, min $4,66 \times 10^4$) KBE/ml im Knochen
 - $9,9 \times 10^6$ (max $1,85 \times 10^7$, min $1,23 \times 10^6$) KBE/ml am Implantat

4 Diskussion

Eingangs wurde ausführlich erläutert, dass Implantat-assoziierte Infektionen ein zunehmendes Problem der modernen Endoprothetik darstellen. Die steigende Zahl der Endoprothesen-Wechseloperationen birgt insbesondere bei den zunehmend älteren und mitunter multimorbiden Patienten ein erhöhtes Risiko für diese Komplikation. Die steigenden Resistenzraten gegenüber immer weiteren Antibiotikaklassen fordern zusätzlich ein Umdenken im Umgang mit Implantat-assoziierten Infektionen. Ein prophylaktisches, möglichst antibiotikaarmes Handeln scheint immer mehr Vorzüge zu bringen.

Aus diesem Grund wurde beispielsweise von Heidenau et al. (2005) eine Oberflächenbeschichtung mit integrierten Metallionen vorgestellt und hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirkung, sowie Gewebetoxizität *in vitro* untersucht. Kupfer überzeugte im Rahmen dieser Untersuchungen durch gute antimikrobielle Eigenschaften bei gleichzeitig geringer Zellschädigung. Um diese Ergebnisse *in vivo* zu bestätigen, wurden die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche am Tiermodell der Ratte durchgeführt. Nach einem Infektionsmodell von Lucke et al. (2003a) sollten Osteomyelitiden im Knochen der Tibia mit Hilfe eines intramedullär lokalisierten Pins und in die Markhöhle applizierten Bakterien ausgelöst werden. In einem zweiten Schritt sollte ermittelt werden, ob durch eine kupferhaltige Oberflächenbeschichtung des Pins eine Minimierung der Bakterienmenge erzielt oder die Infektionsauslösung verhindert werden kann. Durch unterschiedliche Kupferkonzentrationen der Oberflächenbeschichtungen sollten antimikrobielle Wirkung, sowie Gewebetoxizität auf eine Dosisabhängigkeit hin untersucht werden.

Wie bereits im Ergebnisteil ersichtlich, konnte das Infektionsmodell nach Lucke et al. (2003a) nicht uneingeschränkt mit guten Ergebnissen angewandt werden. Im Folgenden sollen die Ursachen entstandener Probleme und die jeweiligen Lösungsansätze in der Weiterentwicklung des Infektionsmodells diskutiert werden. Des Weiteren werden die Ergebnisse der Versuche auch im Hinblick auf den Versuchsverlauf beurteilt.

4.1 Intramedulläres Infektionsmodell

4.1.1 Diskussion der Methodik

Das verwendete Infektionsmodell nach Lucke et al. (2003a) spiegelt eine Situation wider, welche bei der Verwendung von intramedullären Marknägeln in der Traumatologie zu finden ist. Nach einer Fraktur wird der Knochen durch ein intramedullär liegendes Implantat geschient und der Bruch stabilisiert. Vor allem bei offenen Frakturen mit Weichteilverletzungen und entsprechenden Verschmutzungen der Wunde ist mit einem hohen Risiko der Keimverschleppung in die Markhöhle und einer konsekutiven Implantat-assoziierten Infektion zu rechnen. Von Vorteil ist hier allerdings die gute Durchblutung der Diaphyse, wodurch Zellen der Immunabwehr rasch in den Fraktur- und Implantatbereich einwandern und eine Infektion gegebenenfalls verhindern können.

Genau diese Situation der guten Durchblutung des Diaphysenbereiches hat im Tiermodell nach Lucke et al. (2003a) zu erheblichen Problemen geführt. Unmittelbar nach Aufbohren der Markhöhle kam es zu Blutansammlungen im Bohrkanal, so dass bei Injektion der 10 µl Bakteriensuspension und

nachfolgender Insertion des Pins stets Flüssigkeit proximal aus dem Bohrkanal heraus und in das umgebende Weichteilgewebe floss. Da davon ausgegangen werden muss, dass es sich bei der Flüssigkeit um ein Bakterien-Blut-Gemisch handelte, ist die jeweilig definierte Bakterienmenge (KBE), die in den Markraum eingebracht wurde, im gesamten Versuch uneinheitlich und letztlich unbekannt. Durch eine Erweiterung des Bohrkanals nach distal kann ein vergrößertes intraossäres Volumen geschaffen werden. Allerdings führt dieses auch zu einer Reservoirbildung distal des Pins, in welchem sich die Bakteriensuspension außerhalb der Diffusionsreichweite der Kupferbeschichtungen ansammeln kann, so dass ein Raum geschaffen wird, in dem Infektionen entstehen können, die jeweiligen Oberflächenbeschichtungen aber keinen oder nur einen verminderten Effekt erzielen. Da eine Reservoirbildung somit die Aussagekraft über eine prophylaktische Effektivität und eine Vergleichbarkeit der Oberflächenbeschichtungen einschränken würde, wurde von einer Erweiterung des Bohrkanals zur Verhinderung des Herauslaufens der Bakteriensuspension bereits während der Versuche abgesehen. Es war ferner nicht möglich, die Pins weiter nach distal in den Bohrkanal vorzuschieben, um eine distale Höhlenbildung außerhalb der Kupferreichweite zu verhindern. Ein Extrahieren des Pins aus dem Knochengewebe wäre auf diese Weise unmöglich gewesen, ohne den Knochen zu zerstören und so den Biofilm von der Pinoberfläche zu lösen. Dieses hätte eventuell zu einer weiteren Verfälschung der Studienergebnisse geführt.

Von einer Veränderung der Pinlänge wurde aus zweierlei Überlegungen Abstand genommen:

Zum einen wird durch eine Verlängerung des Pins die ursprüngliche Situation in vergrößerten Dimensionen dargestellt. Es käme wiederum zu einer Verdrängung der bakterienhaltigen Flüssigkeit aus dem Bohrkanal mit Kontamination der umgebenden Weichteilstrukturen. Zum anderen kann durch eine einheitliche Länge der Pins bei identischer Schichtdicke der Oberflächenbeschichtung eine einheitliche Kupfermenge erzielt werden, so dass die Ergebnisse vergleichbar sind.

Im Fazit gelang es in den Versuchen nicht, die Bakteriensuspension zusammen mit den Pins in zufriedenstellender Weise im Bohrkanal zu platzieren und somit eine einheitliche und bekannte Erregermenge in den Markraum zu applizieren.

In den ersten postoperativen Wochen wurden vermehrt Wundheilungsstörungen mit teilweise großen Hautdefekten beobachtet, ohne dass sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen evaluieren ließen. Eine mögliche Erklärung für die verzögerte Wundheilung ist ebenfalls in dem Entweichen der Bakteriensuspension aus dem Bohrkanal zu sehen (An et al. 2006). Die Flüssigkeiten sind weitgehend ungehindert über die angrenzende Muskulatur, das Bindegewebe und die Haut gelaufen. Durch die sehr feinen prätibialen Bindegewebsverhältnisse der Ratte, erfolgte der Haut- und Wundverschluss mit Einzelknopfnähten in einer Schicht, die Faszie konnte nicht separat über dem proximalen Ende des Bohrkanals und dem Pin verschlossen werden. Dies kann möglicherweise dazu geführt haben, dass sich in der kontaminierten Haut und den darunter gelegenen Weichteilen eine oberflächliche Infektion entwickelte. Der begleitende Juckreiz führte dazu, dass sich die Tiere die Nähte aufbissen, so dass sich Wundheilungsstörungen manifestieren konnten. Bei regelmäßiger Wunddesinfektion konnte bei allen Tieren innerhalb von zwei Wochen ein definitiver Wundverschluss beobachtet werden. Um die Studienergebnisse nicht zu verfälschen, wurde von einer primären Desinfektion der Weichteilgewebe unmittelbar nach Insertion des Pins Abstand genommen, da das Eindringen des Desinfektionsmittels in den Bohrkanal wiederum zu einer Minderung der Bakterienkonzentration hätte führen können. Retrospektiv ist es nicht eruierbar, ob es bei den Tieren

mit den deutlichsten Wundheilungsstörungen auch zu einem massiven Überlaufen der Bakteriensuspension kam; allerdings wurden in der Kontrollgruppe, in der anstatt der Bakteriensuspension steriler PBS-Puffer zur Anwendung kam, keine Wundheilungsstörungen beobachtet.

Eine weitere Problematik der durchgeführten Versuche ist im Bereich der mikrobiologischen Probenbereitstellung und –verarbeitung zu sehen. Vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock, wurden die Bakteriensuspensionen in -80 °C tiefgefrorenen Kryo-Tubes zur Verfügung gestellt. Da es anfänglich nicht möglich war, die Tierversuche und die mikrobiologischen Arbeiten in einem Gebäude zu vereinen, wurden die Bakteriensuspensionen zum Transport primär auf Eis und im Weiteren bei -20 °C gelagert. Erst kurz vor dem Einbringen in den Knochen wurden die Bakterien bei circa 8 °C Kühlschranktemperatur aufgetaut. Stichprobenartig wurden die eingefrorenen Kryo-Tubes im Mikrobiologischen Institut hinsichtlich der Keimmenge und der Teilungsfähigkeit der Bakterien untersucht. Durch die räumliche Trennung erfolgte allerdings keine unmittelbare Überprüfung der eingebrachten Bakteriensuspensionen auf Vitalität und Keimmenge in der Suspension nach Transport und Auftauen. In Auftau-Untersuchungen, welche das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock, (nach Beenden der Tierversuche des intramedullären Infektmodells) durchführte, wurden *S. aureus* – und *S. epidermidis* – Bakteriensuspensionen hinsichtlich Vitalität und Vermehrungsfähigkeit untersucht. Die Suspensionen lagen bei -80 °C tiefgefroren vor und waren mit unterschiedlichen Gefrierschutz-Beimischungen versehen. Bei Raumtemperatur ohne Zuführen weiterer Wärme wurden diese aufgetaut und zu verschiedenen Zeitpunkten auf ihre Keimmenge und Vermehrungsfähigkeit hin untersucht. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Bakterien unterschiedlich starke Wachstumstendenzen zeigten, jedoch grundsätzlich zu jedem Zeitpunkt zwischen 0 und 120 Minuten nach dem Auftauen vermehrungsfähig waren.

Die Auftauprozesse in diesen Versuchen entsprachen nicht exakt den Auftau- und Transportprozessen während der Tierexperimente. Zudem wurden die tatsächlich verwendeten Suspensionen wie bereits erwähnt nicht unmittelbar nach Einbringen in den Knochen untersucht, so dass sich diese Ergebnisse nur bedingt auf die Tierversuche übertragen lassen und die Möglichkeit einer fehlenden Teilungsfähigkeit der Bakterien oder einer abweichenden Keimmenge zum Zeitpunkt der Inokulation in den Knochen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

Die Weiterverarbeitung und mikrobiologische Analyse der Knochenproben bot ein zusätzliches Problem in der Methodik und der sicheren Ermittlung der sich im Knochen befindlichen Keimmenge. Nach Lucke et al. (2003a) wird das Knochenpräparat zur Ermittlung der Keimzahl 60 Minuten bei -80 °C tiefgefroren und anschließend in einer Knochenmühle zu einem Pulver zermahlen, aus dem die Keimkonzentration nach Resuspension ermittelt werden kann. Während des Mahlprozesses kam es allerdings zu einem Antauen des Knochengewebes, wodurch anstelle des Knochenpulvers eine zähe, gummiartige Knochenmasse entstand. Diese ließ sich weder vollständig aus dem Mahlbehälter entfernen, noch homogen in Lösung bringen. Somit müssen große Ungenauigkeiten in den Analysen der Keimmenge im Tibiapräparat angenommen werden. Ein Vergleich der Keimkonzentrationen in den verschiedenen Untersuchungsgruppen erscheint somit nicht zulässig.

4.1.2 Diskussion der Ergebnisse

Betrachtet man all diese Unsicherheiten und Ungenauigkeiten in der Durchführung der Versuche, ist eine Analyse der Ergebnisse hinsichtlich der protektiven Wirkung der kupferhaltigen Oberflächenbeschichtung nur sehr eingeschränkt vorzunehmen. Dennoch soll in einem kurzen Abschnitt auf die Ergebnisse eingegangen und diese im Zusammenhang interpretiert werden.

Gemäß der Ausführungen von Lucke et al. (2003a) ist es bereits möglich, mit Bakteriensuspensionen, welche in einer Keimkonzentration von 10^4 KBE/ml (10^2 KBE/10 μ l) vorliegen, nach 14 bis 28 Tagen klinisch, mikrobiologisch und radiologisch Osteomyelitiden hervorzurufen.

In ersten (in diesem Rahmen nicht ausführlich beschriebenen) Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit wurden 25 Tiere mit einer *S. aureus*-haltigen Keimsuspension in einer Keimkonzentration von 10^5 KBE/ml (10^3 KBE/10 μ l) nach dem intramedullären Infektionsmodell infiziert. In keiner Probe, weder am unterschiedlich beschichteten Pin, noch im Knochen konnten nach einem sechswöchigen Beobachtungszeitraum Bakterien nachgewiesen werden. Die Tiere zeigten des Weiteren allesamt einen unauffälligen postoperativen Verlauf ohne klinische Anzeichen einer Infektion. Daraufhin wurde die Keimmenge um drei Zehnerpotenzen erhöht und die Versuche mit einer *S. aureus*- und *S. epidermidis* – Suspension mit 10^8 KBE/ml (10^6 KBE/10 μ l) wie bereits beschrieben an 60 Tieren durchgeführt.

Während des gesamten Versuchsverlaufes zeigten die Tiere keine klinischen Anzeichen einer Infektion, weder im allgemeinen Fress- und Bewegungsverhalten noch hinsichtlich der Gewichts- und Temperaturveränderungen. Insbesondere waren in der klinischen Untersuchung keine Unterschiede innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen zu erkennen, die auf unterschiedliche Ausprägungen einer Osteomyelitis gedeutet hätten.

Es war ein Ziel dieser Arbeit, eine chronische, lokalisierte Infektion im Bereich der Tibia zu erzeugen, welche gegebenenfalls durch eine entsprechende Oberflächenbeschichtung verhindert werden kann. Eine Streuung in den Organismus durch eine überschießende Infektion war nicht beabsichtigt. Zustände generalisierter Infektionen bzw. einer Sepsis waren somit im Vorfeld als Ausschlusskriterien und Indikationen zur vorzeitigen Euthanasie, auch aus Tierschutzgründen, definiert worden. Lucke et al. (2003a) kontrollierten dies durch zusätzliche, regelmäßige Blutentnahmen aus der Vena ophthalmica, um die Entzündungswerte zu monitoren. In den Arbeiten von Lucke et al. (2003a) waren nur primär postoperativ ansteigende Entzündungswerte zu verzeichnen, welche zu diesem Zeitpunkt häufig erhöht (Gollwitzer et al. 2006a) und durch den operativen Stress erklärbar sind. Im Verlauf stellte sich regelmäßig eine Normalisierung ein. Da die Blutentnahme zudem einen weiteren Stressfaktor für die Tiere darstellt, wurde in den Versuchen der vorliegenden Arbeit auf eine laborchemische Kontrolle hinsichtlich generalisierter Infektionen bei regelmäßiger und gründlicher klinischer Untersuchung verzichtet. Keines der Tiere bot Hinweise auf septische Zustände in Form von deutlichem Gewichtsverlust (über 20 % des Ausgangskörpergewichtes), Fieber oder Fress- und Trinkunlust. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass es in keinem Fall zu generalisierten Infektionen kam. Als abschließende, definitive Diagnostik einer systemischen Infektion wurde den Versuchstieren allerdings vor der Euthanasie einmalig unter Narkose Blut im Rahmen einer kardialen Punktion entnommen, welches in einer Blutkultur auf das Vorliegen des ursprünglich eingebrachten Keimes untersucht wurde. Da weder der eingebrachte *S. aureus* – noch der *S. epidermidis* – Stamm

in den Blutkulturen wiedergefunden wurde, ist eine systemische Infektion am Ende der sechswöchigen Beobachtungsphase weitgehend ausgeschlossen. Die Kontaminationen der Blutkulturen durch Keime der kommensalen Hautflora deuten allerdings auf eine mangelnde Desinfektion der Haut vor Punktion hin. Die Punktionsstelle wurde unrasiert durch Sprühdesinfektion gereinigt. Dieses reichte offensichtlich nicht aus, um valide, nicht kontaminierte Ergebnisse zu erreichen. Im Weiteren stellte sich die perkutane, kardiale Punktion als diffizile Methode mit einer sehr flachen Lernkurve heraus. Zusätzlich birgt sie ein hohes Risiko für das Stechen eines Pneumothorax, welcher zum Kreislaufversagen der Versuchstiere vor der eigentlichen Euthanasie führt.

Bei Anwendung dieses Infektionsmodells ist nicht mit einer septischen Streuung der Infektion zu rechnen und Blutuntersuchungen sowohl aus peripher-venösen, als auch aus zentralen Gefäßen bedeuten erhebliche Stress- und Risikofaktoren für die Versuchstiere. Da zudem eine Kontamination aufgrund des Fells relativ wahrscheinlich ist, sollte bei erneuter Durchführung dieses Infektionsmodells eine genaue Nutzen – Risiko – Analyse für die Blutentnahme erfolgen.

Um eine lokalisierte Infektion in der Tibia zu erzeugen, wurden jeweils 10 µl einer Bakteriensuspension mit einer Keimkonzentration von 10^8 KBE/ml, also insgesamt 10^6 KBE in die aufgebohrte Markhöhle gegeben. Ziel des Versuches war es, dass sich eine Implantat-assoziierte Infektion am Pin und im umgebenden Knochengewebe manifestierte, so dass nach einem sechswöchigen Beobachtungsintervall der eingebrachte Keim mikrobiologisch, sowie eine Biofilmbildung in REM-Untersuchungen nachgewiesen werden kann.

Lucke et al. (2003a) brachten für die Untersuchung einer antibiotikahaltigen Oberflächenbeschichtung insgesamt 10^3 KBE in den Knochen ein und konnten nach sechs Wochen bei Versuchstieren, welche einen unbeschichteten Pin implantiert bekamen, im Durchschnitt mehr als 10^5 KBE/g Knochenpulver im Tibiapräparat nachweisen.

In den hier vorgestellten Infektionsversuchen konnten in den mikrobiologischen Analysen nur vereinzelt Bakterien am Pin oder im Knochen nachgewiesen werden. In der Versuchsgruppe II, in welcher die Tiere einen unbeschichteten Pin zusammen mit 10^6 KBE eines *S. aureus*-Stammes in die Tibia implantiert bekamen, konnten in zwei von fünf Knochenpräparaten keine Bakterien nachgewiesen werden. In den drei positiven Analysen wurden Keimmengen von $1,1 \times 10^1$ bis $4,3 \times 10^3$ KBE/g Knochengewicht ermittelt. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Lucke et al. (2003a) bedeutet dies bei der um drei Zehnerpotenzen größeren, eingebrachten Keimmenge weniger als ein Hundertstel der gefundenen Bakterien am Ende der Versuche. Vergleicht man zudem die Keimmengen der Versuchsgruppe II mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe I, in der keine Bakterien injiziert wurden, so ist keine signifikante Bakterienvermehrung in der Versuchsgruppe II zu erkennen ($p = 0,151$).

Ähnliches lässt sich über die Ergebnisse der Pinanalysen berichten. Auch in diesem Fall sind nur an drei von sieben Proben Bakterien in Keimkonzentrationen von $2,9 \times 10^1$ bis $1,9 \times 10^3$ KBE/ml Analysensuspension nachgewiesen worden. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe I ergibt sich auch in diesem Fall kein signifikanter Unterschied ($p = 0,189$ für die Untersuchungen nach Sonikation, bzw.

$p = 0,345$ für die Analysen nach Konzentration der Analysesuspension). Somit ist es nicht gelungen, eine Implantat-assoziierte Infektion anhand des intramedullären Infektionsmodells nach Lucke et al. (2003a) sicher und reproduzierbar auszulösen.

Die Tatsache, dass in der überwiegenden Anzahl der Knochen- und Pin-Proben kein Keimnachweis erfolgte und zudem die positiven Ergebnisse eine deutliche Streuung aufwiesen (sehr große Standardabweichungen), lässt vermuten, dass es sich bei den ermittelten Ergebnissen eher um zufällige, als um valide, reproduzierbare Ergebnisse handelt. Die Ergebnisse besitzen somit keine statistische Aussagekraft. Bei kleinen Stichproben, die nicht normalverteilt sind, wird definitionsgemäß der Median angegeben. Aufgrund der Tatsache, dass die überwiegende Anzahl der Analysen keinen Keimnachweis erbrachten, beträgt der Median, insbesondere bei den Keimkonzentrationen am Pin, in fast allen Untersuchungen null, so dass der Mittelwert gemeinsam mit der Standardabweichung eher anschauliche Ergebnisse bietet und daher trotz der Nicht-Normalverteilung und der kleinen Stichprobengröße in diesem Rahmen angegeben wird.

Ursachen für die mikrobiologischen Ergebnisse können in den diskutierten Unzulänglichkeiten der Methodik des Versuchs zu sehen sein. Es ist weder auszuschließen, dass eine zu geringe Bakterienmenge im Knochenlager verblieben ist, nachdem der Pin in die Markhöhle eingebracht wurde, noch dass ein Teil der Bakterien aufgrund des Transportes und des Auftauprozesses avital und damit nicht mehr vermehrungsfähig waren. Die bereits diskutierten Probleme in der Analyse der Knochenpräparate können weiterhin zu Verfälschungen der Ergebnisse geführt haben. Auffällig ist, dass trotz der ungenauen Keimzahlbestimmung der Knochenproben an den Tibiae dennoch (wenn auch in geringem Maße) mehr Bakterien gefunden wurden, als an den Pins. Möglicherweise ist es bereits beim Herausziehen der Pins aus dem Knochen zu einem Abstreifen des Biofilms mit konsekutivem Verbleiben an der Tibia und zudem beim Halbieren der Pins zu einem weiteren Biofilmbrieb gekommen. Angesichts der allgemeinen Analysenungenauigkeit sind diese allerdings eher untergeordnete Überlegungen, zu denen keine weiteren Belege oder Untersuchungen existieren.

Ein anderer Ansatz, um den unzufriedenstellenden Versuch zu erklären, eine Implantat-assoziierte Infektion reproduzierbar zu erzeugen, ist möglicherweise in der Pathogenese, genauer gesagt im „race for the surface“ zu sehen. Der Markraum der Tibia wurde traumatisch eröffnet, wodurch zahlreiche Blutgefäße verletzt wurden und sich Blut in der Markhöhle ansammelte. Der eingesetzte Pin wurde somit nicht nur von der Bakteriensuspension benetzt, sondern auch von körpereigenen Zellen, Proteinen und Molekülen. Gemäß Gristina et al. (1987, 1991) ist eine bakterielle Besiedelung einer Oberfläche umso schwieriger, je mehr körpereigene Zellen sich zuvor auf dieser angesiedelt haben. Des Weiteren ist anzunehmen, dass noch frei flottierende Bakterien von eingeschwemmten Zellen der körpereigenen Abwehr phagozytiert wurden, bevor sie an der Pinoberflächen adhären konnten.

Eine mögliche Erklärung zeigen auch die Untersuchungen von Monzón et al. (2002). In der Studie wurden vier unterschiedliche Infektionsmodelle an der Ratte miteinander verglichen, bei denen jeweils ein Pin in die Tibia eingebracht wurde. In zwei Fällen wurde der Pin primär von einem Biofilm überzogen (präkolonisiert; *S. aureus* in einer Keimmenge von etwa 10^6 KBE). Eine Gruppe erhielt zusätzlich zu dem präkolonisierten Pin eine lokale Injektion einer Bakteriensuspension (10^4 KBE). In zwei weiteren Ansätzen wurden sterile Pins eingesetzt, welche im Anschluss jeweils mit einer Bakteriensuspension kontaminiert wurden (10^5 KBE bzw. 10^6 KBE). Nach sechs Wochen wurden unter anderem die Bakterienkonzentrationen an den Pins und in den Tibiae bestimmt.

Erstaunlicherweise waren in der Versuchsgruppe, in der nur der präkolonisierte Pin eingesetzt wurde, 100 % der Tiere am Pin und im Knochen infiziert. In der zweiten Gruppe (präkolonisierter Pin und Suspension) war ein Bakteriennachweis an allen Pins, jedoch nur bei 62 % der Knochen zu ermitteln. In der Versuchsgruppe, in der ein steriler Pin sowie die höherkonzentrierte Suspension (10^6 KBE) verwendet wurden, konnten nur in 75 % der Fälle Bakterien am Pin und im Knochen nachgewiesen werden. Wurden nur 10^5 KBE in den Knochen eingebracht, so verringerte sich die Nachweisrate auf 25 % (Pin) bzw. 12 % (Knochen). Monzón et al. (2002) erklären diese Ergebnisse mit einer möglichen Aktivierung des Immunsystems durch niedrig konzentrierte, frei flottierende Bakterien (in der Suspension), so dass die körpereigene Abwehr das Entzündungsgeschehen im Knochen eindämmen bzw. in Teilen sogar verhindern kann. Des Weiteren weisen sie auf eine inhomogene Biofilmbildung hin, wenn dieser erst nach Einsetzen der Infektion entsteht. Eine Biofilmbildung *in vivo* entspräche zwar der klinischen Situation, jedoch verringere sie die Wahrscheinlichkeit, sicher Infektionen für experimentelle Zwecke zu erzeugen (Monzón et al. 2002).

In einem Übersichtsartikel über tierexperimentelle Modelle zur Erzeugung und Evaluation von Osteomyelitiden empfehlen An et al. (2006) ebenfalls eine zu applizierende Erregermenge von 10^6 bis 10^8 KBE, sofern ein *S. aureus* – Stamm verwendet und eine zu 100 % sichere Infektionsauslösung angestrebt wird.

Neben der Erzeugung einer lokalen Osteomyelitis war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, eine kupferhaltige Oberflächenbeschichtung auf ihre protektive Wirkung gegenüber Implantat-assoziierten Infektionen zu untersuchen. Um valide Aussagen treffen zu können, muss in einer Referenzgruppe (entsprechend der Versuchsgruppe II) sicher und reproduzierbar eine Infektion auslösbar sein, an deren mikrobiologischen Ergebnissen und ermittelten Keimzahlen sich die Versuchsgruppen der unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen messen lassen können. Da es aber weder in der Referenzgruppe, noch in den einzelnen Untersuchungsgruppen gelungen ist, eine Infektion bei allen Versuchstieren zu erzeugen und mikrobiologisch durch eine signifikante Keimzahlerhöhung am Pin oder im Knochen nachzuweisen, können keine Aussagen über die Wirksamkeit der Kupferbeschichtungen getroffen werden. Somit kann an Hand der Versuche des intramedullären Infektionsmodells im Rahmen dieser Arbeit die antibakterielle Effektivität der kupferhaltigen Oberflächenbeschichtung nicht bewertet werden.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Analysen spiegeln sich auch in der bildgebenden Diagnostik wider. Gemäß Lucke et al. (2003a) sind zwei Wochen nach setzten der Infektion bereits deutliche Infektionszeichen in Form von Osteolysen und Knochendestruktionen im Röntgenbild erkennbar.

In den hier vorliegenden Versuchen wurden die operierten Hinterbeine der Ratten zur Lagekontrolle der Pins unmittelbar postoperativ und zur Infektionsdiagnostik nach drei und abschließend nach sechs Wochen im seitlichen Strahlengang geröntgt. Auch hierbei fiel auf, dass sich nur bei einem Drittel der Tiere Hinweise auf Infektionen des Knochens erkennen ließen. Die Infektionszeichen waren in der Regel von geringer Ausprägung und zeigten kaum Steigerung im Verlauf des sechswöchigen Beobachtungsintervalls. Ebenso war keine bevorzugte Lokalisation der Infektionen entsprechend des proximalen, mittleren oder distalen Bereichs des Pins oder der Tibiadiaphyse zu erkennen. Dieses kann ein Hinweis darauf sein, dass die intramedullären Bohrkanäle eine optimale Länge in Relation

zur Länge der Pins aufwiesen, obwohl die Markräume nicht mit einem in der Länge genormten Draht eröffnet wurden. Für eine zu weite Eröffnung nach distal mit konsekutiver Höhlenbildung distal des Pins und somit vermehrter Infektionslokalisation an dieser Stelle gibt es zumindest röntgenologisch keine Hinweise.

Bei den Tieren mit positiven mikrobiologischen Knochenanalysen (*S. aureus* wurde im Tibiapräparat nachgewiesen) zeigten die Röntgenbilder nur in 50 % der Fälle ebenfalls Anzeichen einer Osteomyelitis. Dagegen wurden Röntgenbilder mit Infektionszeichen stets von einem positiven Keimnachweis begleitet. Entsprechend der geringen Keimmengen, die an den Proben gefunden wurden, ist es durchaus nachvollziehbar, dass im Röntgenbild Infektionszeichen nicht unbedingt zu diagnostizieren sind, zumal für die Diagnostik gering ausgeprägter und möglicherweise lokalisierter Infektionen Röntgenaufnahmen mit hoher Auflösung nötig sind.

Auffallend sind zwei Tiere der Versuchsgruppe V (dreifache Kupferbeschichtung), bei denen radiologisch Frakturen der Tibia und Fibula nachweisbar waren, ohne dass diese klinisch in Erscheinung getreten wären. Da die Röntgenfilme nicht unmittelbar nach Aufnahme entwickelt und analysiert wurden, fielen die Frakturen in beiden Fällen nicht sofort auf und die Tiere blieben in die Versuche eingeschlossen. Retrospektiv betrachtet ist es nicht möglich zu eruieren, ob es während der Implantation bereits zu feinen Frakturen oder Läsionen der Knochen kam, welche in den unmittelbar postoperativen Röntgenkontrollen nicht zu erkennen waren. In den mikrobiologischen Analysen waren in beiden Tibiae *S. aureus* – Kolonien (in den in diesen Versuchen üblichen Keimmengen) nachweisbar. Eine frische Fraktur würde durch eine behinderte Blutzirkulation, sowie eine gestörte Gewebeintegrität einen zusätzlichen Einflussfaktor auf die Pathogenese der Implantat-assoziierten Infektion darstellen, die eine Infektion und einen positiven Keimnachweis wahrscheinlicher macht (An et al. 2006). Allerdings muss bei positivem Keimnachweis differentialdiagnostisch auch eine pathologische Fraktur in Betracht gezogen werden.

Bei insgesamt neun Versuchstieren wurden die Tibiapräparate für eine histologische Untersuchung verwendet. Ziel war es, diese Präparate zum einen auf das Vorliegen histologischer Infektionszeichen wie Osteolysen, Knochendestruktionen und Ansammlungen von Entzündungszellen hin zu untersuchen. Zum anderen sollte die Gewebeverträglichkeit der Kupferbeschichtungen analysiert und bildlich dargestellt werden.

Technische Probleme bei der Herstellung der Knochenschnitte führten zu deutlichen Artefaktbildungen, so dass eine valide Auswertung nicht möglich war. Eindeutige Infektionszeichen oder Ansammlungen von Entzündungszellen waren nicht mit Sicherheit nachweisbar. Dieses trifft auch für die Tiere zu, bei denen in den mikrobiologischen Analysen der Pins *S. aureus* nachgewiesen werden konnte. Allerdings zeigte sich in annähernd jedem Schnitt eine feine Knochenlamelle, die den Bohrkanal auskleidete. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf eine nicht vorliegende Gewebetoxizität der Oberflächenbeschichtungen. Um hierzu detailliertere Aussagen treffen zu können, sind weitere Untersuchungen und artefaktfreie histologische Schnitte notwendig.

Als weitere bildgebende Diagnostik sollte per Rasterelektronen-Mikroskopie (REM) die Biofilmbildung auf der Pinoberfläche dargestellt werden. Nachdem die mikrobiologischen und radiologischen Ergebnisse bekannt waren, ist diese Untersuchung nur stichprobenartig an Pins, an denen mikrobiologisch bereits Bakterien nachgewiesen wurden, durchgeführt worden. Ein flächendeckender

Bakterienfilm konnte dennoch in keiner REM-Darstellung ermittelt werden; es waren allenfalls vereinzelte Bakterien zu erkennen, was möglicherweise durch die geringen Bakterienmengen auf den Präparaten zu erklären ist.

Neben *S. aureus* ist *S. epidermidis* einer der wichtigsten und häufigsten Keime bei der Entstehung von Implantat-assoziierten Infektionen, da er besonders auf Kunststoff – Oberflächen wie beispielsweise Polyethylen-Inlays anhaftet und sich dort als biofilmbildender Keim ausbreitet. Aus diesem Grund sollten die kupferhaltigen Oberflächenbeschichtungen auch auf ihre Wirkung gegenüber *S. epidermidis* *in vivo* getestet werden.

Es ist in keinem Fall der neun Versuchstiere gelungen, anhand des intramedullären Infektionsmodells mit einer applizierten Keimmenge von 10^6 KBE eine Infektion klinisch, mikrobiologisch oder radiologisch nachzuweisen. Alle untersuchten Proben blieben steril, so dass die Versuchsreihe mit *S. epidermidis* abgebrochen wurde.

Als größten Kritikpunkt an diesen Versuchen muss die Tatsache angesehen werden, dass im Vorfeld keine eigenen Vorversuche an Tieren mit unbeschichteten Pins durchgeführt wurden. Es wurde nicht überprüft, ob anhand der Angaben von Lucke et al. (2003a) die Versuche in den eigenen Räumlichkeiten und mit den eigenen Möglichkeiten nachzuvollziehen sind, die Ergebnisse identisch ausfallen und Implantat-assoziierte Infektionen sicher zu erzeugen und nachzuweisen sind.

Um auszuschließen, dass sich eine Lernkurve zu Gunsten bestimmter Versuchsgruppen bildete, wurden Tiere aller Versuchsgruppen in gewisser Weise parallel in die Versuche eingeschlossen. Als erkennbar war, dass sich keine Infektionen reproduzierbar erzeugen ließen, wurden die Versuche abgebrochen.

4.2 Metaphysäres Infektionsmodell

Die „Schwachstellen“ des intramedullären Modells und das Anliegen, ein an Dauerimplantate orientiertes Infektionsmodell zu etablieren, führten zu einer Weiterentwicklung des Versuchsaufbaus. Hierbei wurden der Ort der Implantation und somit auch die Infektionslokalisierung analog zu Endoprotheseninfektionen in die gelenknahe Metaphyse verlagert. Zusätzlich wurde ein neues Implantat entwickelt, welches die Möglichkeit bot, Bakteriensuspensionen sicher, ohne heraus zu fließen, in das Knochengewebe zu applizieren. Die Entwicklung eines neuen Modellaufbaus fordert zu Beginn die Evaluation der optimalen Keimmenge, welche einzubringen ist, um eine Infektion sicher, reproduzierbar und in gewünschter Ausprägung auszulösen. Die Weiterentwicklung und die Untersuchungen zur Keimzahlfindung sind ein weiterer Teil dieser Arbeit.

4.2.1 Diskussion der Methodik

Einer der größten Kritikpunkte des intramedullären Modells war die bereits beschriebene Tatsache, dass aus dem proximalen Ende des Bohrkanals die mit Blut vermischte Bakteriensuspension nach Insertion des Pins wieder heraus lief und so die jeweilig eingebrachte Erregermenge unbekannt blieb. Um dieses in weiteren Versuchen bei der Erzeugung einer Implantat-assoziierten Infektion zu

verhindern, wurde ein konusförmiges Implantat entwickelt, welches durch Press-fit in der Tibia verankert werden kann. Durch die Press-fit-Verankerung in einem primär gesetzten Bohrloch in der Metaphysenregion kam es zu einem dichten Abschließen des Implantates mit der Kortikalis, so dass seitlich keine Flüssigkeiten am Implantat vorbei und aus dem Knochengewebe herauslaufen konnten. Durch die Formunterschiede zwischen Bohrloch (zylindrisch) und Implantat (konisch) entstand ein schmaler Spalt zwischen intaktem Knochengewebe und Implantatoberfläche, in welchen die Bakteriensuspension durch den zentral im Implantat befindlichen und mit dem Spalt kommunizierenden Kanal appliziert werden konnte (vgl. Abbildung 7 b auf Seite 40 im Abschnitt 2.2.1, Material des metaphysären Infektionsmodells). Aufgrund des geringen Durchmessers des Kanals kam es nur unwesentlich zu einem Zurückfließen der eingebrachten Bakteriensuspension. Ein weiteres Herausfließen im Verlauf wurde durch den Verschluss des Kanals mit sterilem Knochenwachs verhindert. Auf diese Weise konnte die gewünschte Menge der Bakteriensuspension weitgehend rückflussfrei in das Knochengewebe eingebracht werden.

Vor dem Hintergrund, Versuchstiere insbesondere im Rahmen der Vorversuche und der Keimzahlfindung ökonomisch zu nutzen, wurden die Infektionen jeweils in beide Hinterbeine der Tiere eingebracht und am Ende der Versuche mikrobiologisch oder histologisch (die Untersuchungsmethode ist im Rahmen dieser Arbeit nicht näher beschrieben) auf das Vorhandensein von Infektionszeichen und Bakterien untersucht.

Weitere Veränderungen und Weiterentwicklungen des Modells fanden im Bereich der Herstellung der Keimsuspension und der mikrobiologischen Analysen statt. Von großem Vorteil zeigte sich, dass es bei dieser Versuchsreihe möglich war, die tierexperimentellen und mikrobiologischen Arbeiten innerhalb eines Gebäudes durchzuführen. Dieses ermöglichte eine zeitnahe Kontrolle und Diagnostik und verhinderte unnötige Transportwege, auf denen unkontrollierte Auftauprozesse möglich waren.

In den bereits erwähnten Auftauversuchen wurde unter anderem die Wirkung verschiedener Gefrierschutzzusätze verglichen. Die Ergebnisse zeigten ein vermehrtes Überleben der Bakterien und bessere Wachstumsbedingungen beim Zusatz von Glycerin anstelle des Zellgiftes DMSO. Daher wurde der Bakteriensuspension beim metaphysären Implantatmodell Glycerin als Gefrierschutz zugegeben.

Als weiterer Kontrollschritt zur Steigerung der Versuchsgenauigkeit wurde jede verwendete Bakteriensuspension (jeweils 1 ml – Aliquot pro Seite) unmittelbar nach Infektion des Knochens hinsichtlich der Keimkonzentration und Lebensfähigkeit der Bakterien untersucht. Davon ausgehend, dass durch das neu entwickelte Implantat – Design ein nachträgliches Herauslaufen der Bakteriensuspension weitgehend verhindert wurde, konnte so jede in den Knochen eingebrachte Keimmenge relativ genau bestimmt werden. Bei diesen Analysen fiel auf, dass die Bakteriensuspensionen für die Versuchsgruppe VI (10^6 KBE) um den Faktor 3,3 vermindert waren und somit eine zu geringe Bakterienmenge enthielten. Diese Ungenauigkeit ist am ehesten auf technische Gründe im Rahmen der Lernkurve zurück zu führen. Da aufgrund der klinischen Erscheinung der massiven Infektion jedoch nach zwei untersuchten Tieren diese Keimkonzentration verworfen wurde, ist die Abweichung der eingebrachten Erregermenge für weitere Überlegungen des Versuches zu vernachlässigen. Die Abweichungen in der Bakteriensuspension der Versuchsgruppe II (10^2 KBE) hingegen haben mehr Relevanz. In diesem Fall gelang es bei insgesamt acht verwendeten Aliquots

nicht, die Bakteriensuspensionen so weit zu verdünnen, dass sie nur 10^2 KBE/15 μ l Suspension erhielten, so dass auch bei positiven infektiologischen und mikrobiologischen Ergebnissen diese Keimmenge für weitere Untersuchungen nicht zielführend ist.

Die Erfahrungen aus dem intramedullären Infektionsmodell über das Arbeiten mit der Knochenmühle führten ebenfalls zu einer Veränderung der mikrobiologischen Analyse des Knochengewebes. In Vorversuchen zu der bestmöglichen Verarbeitung von ossärem Gewebe wurde ermittelt, dass eine in den Knochen eingebrachte, definierte Bakterienmenge nach einer einminütigen Behandlung auf dem Vortex[®]-Schüttler mit einem Verlust von circa zwei Zehnerpotenzen relativ konstant wieder zu finden war. Durch die Verarbeitung mit der Knochenmühle hat man circa einen Verlust von vier bis fünf Zehnerpotenzen. Hinzu kommen aufwändige und letztendlich zu Ungenauigkeiten führende Arbeitsschritte, so dass diese Methode durch die Schüttlerbehandlung zur Analyse der Lebendkeimzahl im Knochengewebe ersetzt wurde.

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse

Primäres Ziel in der Weiterentwicklung und Etablierung des neuen Infektionsmodells war es, die optimale Bakterienkonzentration zu ermitteln, welche bei annähernd 100 % der untersuchten Tiere lokale Infektionen in beiden Tibiametaphysen erzeugt. Eine massive, lokale Ausbreitung oder septische Streuung in den Organismus sollte dabei vermieden werden. Angelehnt an die Erfahrungen aus dem intramedullären Infektionsmodell, sowie die Publikationen von Monzón et al. (2002) und An et al. (2006), wurden die Versuche mit 10^6 und 10^7 eingebrachten KBE begonnen. Da dies bereits makroskopisch zu überschießenden Infektionen führte, wurde die Keimmenge im weiteren Verlauf schrittweise reduziert. Dieses Vorgehen erklärt die unterschiedliche Anzahl an Versuchstieren bzw. Probenmengen innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen.

Bereits während der Verlaufskontrollen zeigten sich zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen deutliche Unterschiede im Krankheitsbild. Diese manifestierte sich sowohl im Gewichts- und Temperaturverlauf, als auch an der klinisch-makroskopischen Erscheinung der infizierten Beine.

Die Tiere der Kontrollgruppe (Gruppe I), sowie die der Versuchsgruppe II nahmen im Verlauf der Untersuchungen (außer unmittelbar postoperativ) stetig an Gewicht zu (circa 20 % des Ausgangsgewichtes), wohingegen insbesondere die Tiere der Versuchsgruppe VI (10^6 KBE) und VII (10^7 KBE) innerhalb einer Woche zwischen 5 und 15 % an Gewicht verloren und nach 42 Tagen nur wenig (< 10 % des ursprünglichen Gewichtes) zunahm. Generell ist der Gewichtsverlust sowohl in einer Fressunlust, als auch in einer katabolen Stoffwechsellage begründet, welche in Folge der Infektion auftreten kann und sich analog der Schwere der Infektion verhält. Die Veränderungen des Körpergewichtes stellen somit einen guten Verlaufsparemeter dar, um die klinische Situation abzuschätzen. In der Fieberentwicklung hingegen war kein deutlicher Trend erkennbar. Jedoch war auffällig, dass sowohl die Tiere der Kontrollgruppe, als auch jene, bei welchen 10^5 KBE injiziert wurden, deutlich häufiger als andere, Temperaturen über 38,0 °C entwickelten. Generell muss man die Untersuchungen der Körpertemperatur mit Einschränkungen betrachten, da nicht standardisiert zu einer bestimmten Uhrzeit gemessen wurde und somit zirkadiane Schwankungen, sowie unterschiedliche Raumtemperaturen die Körpertemperatur mit beeinflussen. Zudem sind die Tiere ohne Sedierung gemessen worden, womit eine konstante Lokalisation der Thermometerspitze mit

einheitlicher Tiefe im Anus bzw. Rektum in keiner Weise gewährleistet war. Die rektale Temperaturmessung ist ein komplikationsarmes Verfahren, welches schnell zu erlernen ist. Dennoch übt es einen gewissen Stress auf die Tiere aus, da man sie fixieren muss. In diesem Fall wurden die Tiere so am Schwanz festgehalten, dass die Thermometer-führende Hand immer mit dem sich bewegenden Tier mitging und somit keine völlige Fixierung im engeren Sinne bestand. In weiteren Versuchen sollte man abwägen, ob dieser komplikationsarm zu erfassende Verlaufparameter trotz Ungenauigkeiten und Stress für das Tier erhoben werden sollte und sich dann auf einen standardisierten Messzeitpunkt bei konstanten Umgebungstemperaturen festlegen.

Am eindrucksvollsten zeigte sich die Ausprägung der Entzündung allerdings am makroskopischen Bild der Infektion. Während die Tiere der Versuchsgruppen I – III einen vollkommen blanden postoperativen Verlauf ohne Aktivitätsminderungen oder lokale Auffälligkeiten boten, waren mit steigenden Bakterienkonzentrationen vermehrt lokale Tumore und Abszesse, sowie deutlich lahmendes Verhalten und Deformierungen der Extremitäten zu erkennen. In den Versuchsgruppen, bei denen mehr als 10^4 KBE in den Knochen eingebracht wurden, waren die Infektionen häufig so schwer, dass die Knochenstruktur der proximalen Tibia zerstört war. Es bildeten sich große Areale entzündeten Gewebes oder käsig-eitrig gefüllte Abszessformationen im Bereich der primären Implantationsstelle. Des Weiteren waren einige Implantate ohne Knochenkontakt im Entzündungsgebiet lokalisiert. In einer parallel durchgeführten (aber im Rahmen dieser Arbeit nicht explizit beleuchteten) histologischen Untersuchung einer Probe aus der Versuchsgruppe VII (10^7 KBE) zeigte sich zudem, dass selbst makroskopisch im Knochen lokalisierte Implantate bei diesen hohen Erregermengen an keiner Stelle Knochenkontakt hatten (siehe Abbildung 29 b, Seite 88). Die Ausprägung dieser Infektionen überstieg deutlich das Maß der gewünschten, lokalen Implantat-assoziierten Infektion.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang die mikrobiologischen Ergebnisse, fällt auf, dass trotz der unterschiedlichen inokulierten Keimzahlen und der verschiedenartigen Ausprägung klinischer Befunde in allen infizierten Versuchsgruppen relativ einheitliche Bakterienmengen im Bereich zwischen 10^4 und 10^5 KBE/ml im Knochengewebe gefunden wurden. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liegt in dem begrenzten Raum- und Nährstoffangebot, welches das Bohrloch in der proximalen Metaphyse bietet. Bakterien wachsen und vermehren sich entsprechend ihres Platz- und Nährstoffangebotes bis ein bestimmtes stady-state erreicht ist, in dem es zu einer Stagnation weiteren Wachstums kommt. So ist es erklärlich, dass Bakterien, welche in Konzentrationen von 10^2 und 10^3 KBE eingebracht wurden, sich langsam und klinisch inapparent vermehren sowie ausbreiten können und somit lokale Infektionen hervorrufen.

Weiter ist davon auszugehen und in gewisser Weise auch durch die positiven Wundabstriche von der Implantatoberfläche belegt, dass durch die Injektion der Bakteriensuspension nicht nur der zentrale Kanal, sondern auch die Oberfläche des Implantates mit Bakterien kontaminiert wurden. Das Knochenwachs, welches zum Verschluss des Kanals verwendet wurde, und die Implantatoberfläche stellen an sich Fremdkörper dar (An et al. 2006) und bieten somit in Form von Adhäsionsflächen für Bakterien eine Grundlage für Implantat-assoziierte Infektionen (vgl. Pathogenese der Implantat-assoziierten Infektion im Abschnitt 1.1.3). Werden die Oberflächen nur mit wenigen Bakterien kontaminiert, wie es bei Lösungen mit geringen Bakterienkonzentrationen der Fall ist, wird das

körpereigene Abwehrsystem des Versuchstieres angeregt (Monzón et al. 2002) und kann diese Erreger möglicherweise bekämpfen. Lokale Infektionen außerhalb des Knochengewebes werden so eingedämmt oder gar verhindert. Werden die Oberflächen jedoch mit hochkonzentrierten Bakteriensuspensionen kontaminiert, welche sich zudem bei Wundverschluss in das Gewebe ausbreiten, scheint die Kapazität des Immunsystems nicht auszureichen und lokale Infektionen können sich außerhalb des Knochens etablieren und ausweiten (Monzón et al. 2002). Einen Hinweis auf die Fremdkörperproblematik des Knochenwachses bieten die lokalen Befunde einiger Tiere bereits zu sehr frühen Zeitpunkten. Die beobachteten Schwellungen über der Implantationsstelle präsentierten sich in der Regel primär als circa 5 mm durchmessende, knopfförmige Erhebungen, welche bei der Explantation in etwa der Form der Knochenwachsstöpsel entsprachen (siehe auch Abbildung 27 a und b auf Seite 68), sofern sich die Schwellungen nicht im Verlauf zu großen Abszesshöhlen entwickelt hatten.

In Untersuchungen von Nelson et al. (1990) konnte bereits festgestellt werden, dass im Tiermodell an der Ratte durch die Verwendung von sterilem Knochenwachs eine signifikante Reduktion der zur Auslösung einer chronischen Osteomyelitis benötigten Bakterienmenge zu erzielen ist. Diese Ergebnisse werden von neueren Versuchen von Wellisz et al. (2008) gestützt. An einem Kaninchenmodell wurden Infektionsraten und Knochenheilung unter der Verwendung von Bakterien entweder in Kombination mit Knochenwachs, einem löslichen Polymer oder ohne die Verwendung eines Hämostyptikums untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei allen Tieren, die Knochenwachs erhielten, nach einem vierwöchigen Intervall Osteomyelitiden ohne Anzeichen einer Knochenheilung zu finden waren. Die Infektionsraten der übrigen Versuchstiere waren deutlich geringer. Steriles Knochenwachs ist in der Traumatologie und Orthopädie ein weit verbreitetes Mittel zur Blutstillung. Im Rahmen der Forschung muss allerdings bedacht werden, dass es sich um einen weiteren Fremdkörper und damit um eine potenziell von Bakterien zu besiedelnde Oberfläche handelt (An et al. 2006).

In Zusammenfassung der makroskopischen und mikrobiologischen Ergebnisse ist festzuhalten, dass in allen infizierten Versuchsgruppen bei nahezu allen Tieren sowohl im Knochengewebe, als auch am Implantat Infektionen mit signifikanten Mengen von *S. aureus* – Kolonien auszulösen waren. Wurden Keimmengen von mehr als 10^3 KBE pro Seite in die Tibiae eingebracht, führte dies mit zunehmendem Bakterieninokulum zu überschießenden Infektionen und schweren Krankheitsverläufen der Tiere, welche nicht Ziel der Versuche waren. Da es jedoch aus technischen Gründen nicht gelang, die Bakteriensuspension im Vorfeld so weit zu verdünnen, dass sie zuverlässig 10^2 KBE/15 μ l enthielt, scheint die optimale, einzubringende Erregermenge 10^3 KBE/15 μ l zu sein, um mit dem neu entwickelten, metaphysären Infektmodell eine durch *S. aureus* ausgelöste Implantat-assoziierte Infektion im Tiermodell zu erzeugen.

4.3 Ausblick

Analog zu dem primären, intramedullären Infektionsmodell und in gewisser Weise auch der klinischen Situation und Diagnostik entsprechend, soll in der Weiterentwicklung das Infektionsgeschehen bildlich dargestellt werden. Da dies nicht Teil dieser Arbeit ist, soll im Folgenden ein exemplarischer Ausblick über die Möglichkeiten der bildgebenden Diagnostik im metaphysären Infektionsmodell gegeben werden.

Die Probleme in der histologischen Aufarbeitung der Knochenproben veranlasste zu weiteren Versuchen und experimentellen Darstellungsweisen der histologischen Knochen- und Implantatproben. Um insbesondere auch den Zwischenraum – das Interface – zwischen Implantat und Knochen betrachten und so Aussagen über eine gute Osteointegration, beispielsweise in Zusammenhang mit neu entwickelten Oberflächenbeschichtungen, treffen zu können, wurden die histologischen Präparate vom Knochen mit lokalisiertem Implantat angefertigt (Abbildung 29 a und b). Mit einer speziellen Einbettung in einen lichterhärtenden Kunststoff (Technovit® 7200 VLC, Firma Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland), welcher speziell für medizinische und zahnmedizinische histologische Präparate entwickelt wurde, können die Proben ohne vorherige Entkalkung und unter geringer Wärmeentstehung eingebettet werden, so dass die Gewebestrukturen erhalten bleiben. Die Präparate eignen sich zudem für besonders dünne histologische Schnitte und zeichnen sich durch eine hohe Festigkeit aus (www.kulzer-technik.de).

Durch einen standardisierten, longitudinalen Schnitt auf Höhe des zentralen Injektionskanals des Implantates kann das Ausmaß einer Implantat-assoziierten Infektion beispielsweise im Zusammenhang mit unterschiedlichen antimikrobiellen Oberflächenbeschichtungen mikroskopisch verglichen werden. Es bedarf allerdings noch weiterer Versuche, um die Schnittführung exakt zu lokalisieren, so dass der zentrale Kanal mittig geschnitten wird.

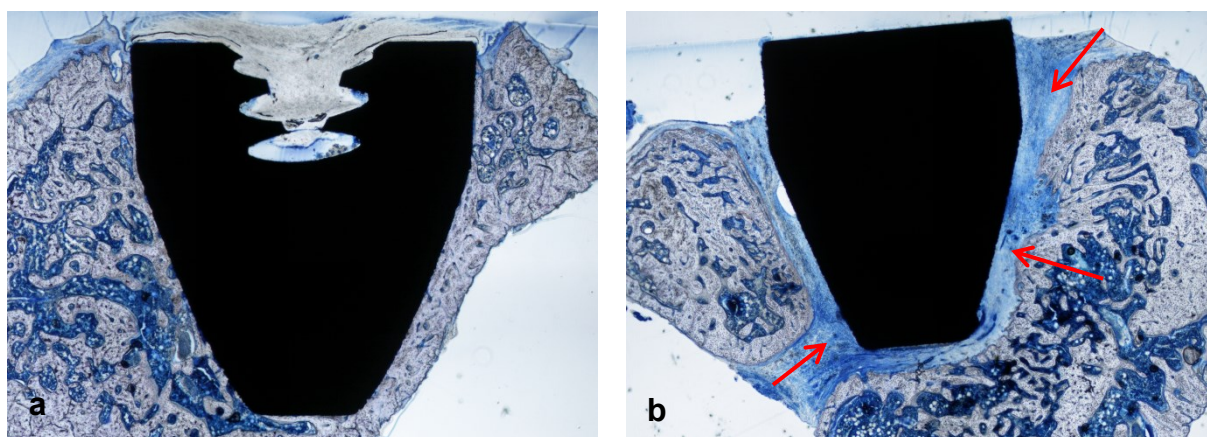


Abbildung 29: Histologische Schnitte durch das Implantat (Färbung: Giemsa-Toluidin) a) Abbildung eines Implantates der Gruppe I (steril). Der zentrale Injektionskanal ist nicht mittig angeschnitten. Die Knochenstrahlen (hellblau) sind allseits bis an das Implantat herangewachsen. b) Darstellung eines Implantates aus der Versuchsgruppe VII (10^7 KBE). Um das Implantat herum ist ein hellblauer Saum nicht ossifizierten Gewebes erkennbar (Pfeile), es hat keine Osteointegration stattgefunden. Der zentrale Kanal ist nicht angeschnitten.

Ferner ist auch die Darstellung einer Biofilmbildung auf den Implantatoberflächen in diesem Tiermodell möglich und wurde bereits exemplarisch in den Versuchsgruppen mit hohem Bakterieninokulum durchgeführt. Es zeigten sich insbesondere bei den Implantaten, welche mit 10^7 KBE beimpft wurden, ein deutlicher Bakterienrasen und eine Biofilmbildung (Abbildung 30). Die Implantatoberflächen, welche mit 10^3 KBE bzw. 10^4 KBE beimpft wurden, müssen im Verlauf noch auf die Möglichkeit der REM-Diagnostik untersucht werden. Erste Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass bei der Anwendung des metaphysären Infektionsmodells zur Überprüfung unterschiedlicher Oberflächenbeschichtungen dieses Verfahren wie bereits im intramedullären Infektionsmodell regelhaft zur bildgebenden Diagnostik einer Biofilmbildung eingesetzt werden kann.

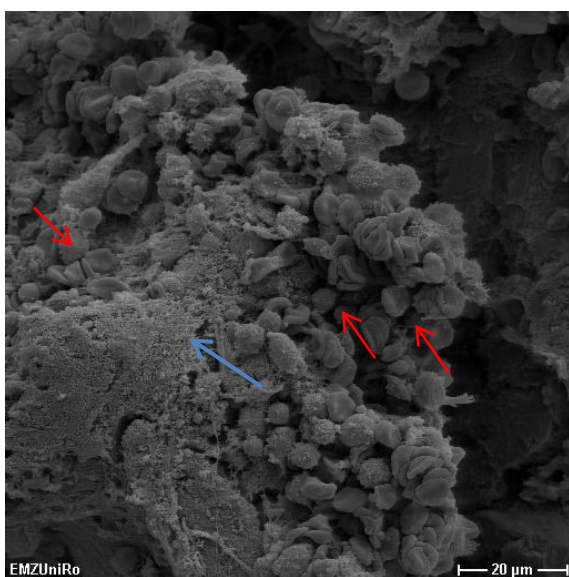


Abbildung 30: REM Fotografie einer Oberfläche aus der Versuchsgruppe VII (10^7 KBE); deutlich erkennbare Erythrozyten (Pfeile rot), die von einem Bakterienrasen überzogen sind (Pfeile blau); 2000fache Vergrößerung.

Des Weiteren wird im Bereich der mikrobiologischen Diagnostik an einer Verbesserung der quantitativen Bakterienanalyse gearbeitet. Im Rahmen der zuvor beschriebenen Lebendkeimzahl-Bestimmung werden nur solche Bakterien erfasst, die sich durch die Schüttler-Behandlung aus dem Knochengewebe lösen lassen. Auf der Basis von Voruntersuchungen gibt es Näherungswerte, die das Verhältnis von gelöster zu tatsächlich vorhandener Erregermenge aufzeigen, wobei nicht exakt alle sich im Knochengewebe befindenden Bakterien erfasst werden. Dies ist jedoch möglich durch eine enzymatische Aufspaltung des Knochengewebes und anschließender Quantifizierung aller darin enthaltenen Bakterien durch Ermittlung ihrer DNA mit Hilfe der PCR. Im Rahmen dieser Versuche sind die Knochen nach Ermittlung der Lebendkeimzahl bereits mit der PCR-Methode untersucht worden. Jedoch befindet sich diese Methodik noch im Aufbauprozess, so dass die Enddaten nicht in diese Arbeit aufgenommen werden konnten. Der Vorteil der PCR ist die sehr sensitive, quantitative Analyse der Erreger, indem mittels eines Primerpaars ein bestimmter Bereich der DNA des jeweiligen Bakteriums vermehrt amplifiziert und somit erfasst wird (Gollwitzer et al. 2006a). Im Fall des *S. aureus* ist dies das *S. aureus*-spezifische *nuc*-Gen (Li et al. 2008). Für die Analysen mit PCR muss das untersuchte Gewebe vollständig demineralisiert und enzymatisch aufgespalten werden. Das hat zur Folge, dass keine lebenden Zellen mehr im Untersuchungsmaterial vorhanden sind (Li et al. 2008).

Nachteilig an dieser Methode ist somit, dass keine Unterscheidung zwischen noch lebenden und bereits abgestorbenen Bakterien möglich ist, welche beispielsweise durch eine antimikrobielle Oberflächenbeschichtung oder im Rahmen einer systemischen Antibiotikatherapie abgetötet wurden und sich immer noch im periimplantären Gewebe befinden können (Gollwitzer et al. 2006a). Deshalb ist es in jedem Fall ratsam, parallel eine Lebendkeimzahlbestimmung durchzuführen.

Mit den beschriebenen Untersuchungen zur Keimzahlfindung ist ein erster wichtiger Schritt in der Entwicklung eines Infektionsmodells erfolgt. Wenn die experimentellen Weiterentwicklungen der bildgebenden Diagnostikverfahren und der speziellen mikrobiologischen Untersuchungen erfolgreich abgeschlossen sind, wird das metaphysäre Infektionsmodell ein Tiermodell bieten, an dem Implantat-assoziierte Infektionen und prophylaktische Interventionen *in vivo* mikrobiologisch, histologisch, sowie bildgebend untersucht werden können. Parallel werden derzeit Untersuchungen zur Keimzahlfindung an *S. epidermidis* durchgeführt, um dieses Modell für die beiden häufigsten Erreger der Implantat-assoziierten Infektion anwenden zu können.

Antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen, wie beispielsweise die primär verwendete kupferhaltige Titanoxidbeschichtung, sollen zukünftig mit diesem metaphysären Infektionsmodell hinsichtlich ihres Effektes zur Infektprävention untersucht werden. Kupfer (Cu^{2+}) hat sich von den Metallionen, welche antimikrobielle Eigenschaften besitzen, als das Ion ausgezeichnet, welches in gewissen Konzentrationsgrenzen gleichzeitig antimikrobiell und in geringerem Maße zytotoxisch auf humane Zellen wirkt (Heidenau et al. 2005; Haenle 2008).

Der bakterizide Wirkmechanismus von Kupfer und Kupferverbindungen beruht auf einem Zusammenwirken zahlreicher Reaktionsmechanismen (Michels et al. 2005), wobei vor allem Proteine und Nukleinsäuren die Hauptangriffspunkte der Metallionen darstellen. Aufgrund einer hohen Bindungsaffinität zu unterschiedlichen Bindungsstellen wie zu Carboxyl-, Amino- und Thiolgruppen können Kupferionen Komplexe mit Proteinen bilden und auf diese Weise Enzymsysteme inaktivieren (Michels et al. 2005). Ferner kommt es durch Reaktion mit Sauerstoffmolekülen zu einer Kette von Redoxreaktionen in unmittelbarer Nähe zum Protein. Hierdurch entstehen Hydroxidradikale (OH^{\cdot}), welche die Tendenz haben, direkt vor Ort zu reagieren und so das Protein unmittelbar zu schädigen (Thurmann et al. 1989). Divalente Kupferionen (Cu^{2+}) haben zudem eine besondere Affinität zu Nukleinsäure, deren helikale Doppelstrang-Struktur sie beispielsweise durch Aufbrechen von Wasserstoffbrücken oder Bindungen mit Phosphatgruppen zwischen einzelnen DNA-Abschnitten zerstören. Eine weitere Replikation der Zielzelle wird somit verhindert (Thurmann et al. 1989; Michels et al. 2005). Interaktionen mit Lipidstrukturen in Zellwänden und -membranen führen zu Permeabilitätssteigerungen, welche einen Zusammenbruch von Oberflächenspannung und osmotischem Gleichgewicht der Zelle zur Folge haben (Michels et al. 2005).

Diese zahlreichen, teilweise simultan stattfindenden Angriffsmöglichkeiten der Kupferionen gegenüber Bakterien erschweren eine Resistenzentwicklung deutlich (Michels et al. 2005). Dennoch wurden bereits Bakterien beobachtet, die beispielsweise Proteine synthetisieren können, welche Metallionen im Komplex binden und so unschädlich machen (Thurmann et al. 1989). Allerdings sind die bisher aufgetretenen Resistenzen nicht von klinischer Bedeutung, zumal bakterielle Infektionen standardmäßig mit Antibiotika therapiert werden. Daher sollte es zu keinen interagierenden

Resistenzmechanismen kommen, wenn in der Prophylaxe von Implantat-assoziierten Infektionen Metallionen eingesetzt werden.

Die erwähnten bakteriellen Zielstrukturen kommen auch auf oder in humanen Zellen vor. Letztere scheinen jedoch eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Kupfer zu besitzen (Heidenau et al. 2005; Haenle 2008). Ein möglicher Erklärungsansatz wird darin vermutet, dass Kupfer als essentielles Spurenelement im humanen Organismus verstoffwechselt wird (Shirai et al. 2009; Finke et al. 2012). Der physiologische Serumspiegel liegt bei 11 - 23 $\mu\text{mol/l}$ (80 -150 $\mu\text{g}/100\text{ml}$), der Gesamtkupfergehalt eines gesunden Erwachsenen bei circa 1,6 - 2,4 mmol (40-80 mg), wobei die Leber den zentralen Ort des Kupferstoffwechsels und der Speicherung darstellt (Petrides et al. 2003). Durch eine gut funktionierende Homöostase sind alimentäre Vergiftungen durch Kupfer beim Menschen kaum bekannt. Bei der autosomal-rezessiv vererbten Hepatolentikulären Degeneration (M. Wilson) kommt es allerdings durch fehlerhafte Kupfer-ATPasen zu Überladung des Organismus und Ablagerung von Kupfer in der Haut (Bronze-Diabetes), Leber, Niere, Gehirn (Corpus striatum) und im Auge (Kayser-Fleischer-Cornealring) (Weber et al. 2001). Direkt toxische Interaktionen sind hierbei nicht beschrieben worden.

Entgegen früherer Meinungen deuten neueste Erkenntnisse darauf hin, dass durch Kupferionen vermehrt planktonisches Bakterienwachstum gehemmt werden kann, im Gegensatz zu solchem, fest adhärenter und in einen Biofilm integrierter Bakterien (Stranak et al. 2011). Ferner wurde beobachtet, dass aus kupferhaltigen Oberflächen freigesetzte hohe Kupferspiegel deutlich zytotoxisch wirkten. Wurden jedoch im Verlauf die Kupferionen aus der Beschichtung und dem umgebenen Medium ausgewaschen, so konnte sogar ein zunehmendes Zellwachstum auf einer titanhaltigen Oberfläche ermittelt werden (Stranak et al. 2011). Die primäre antibakterielle Potenz mit folgender Wachstumsförderung von Gewebezellen lässt vermuten, dass durch kupferhaltige Titanbeschichtungen eine gute Primärprophylaxe der Implantat-assoziierten Infektion erzielt werden kann (Stranak et al. 2011).

Derzeit gibt es einige *in vitro* – Ansätze, kupferhaltige Oberflächenbeschichtungen zur Prophylaxe Implantat-assoziierten Infektionen zu entwickeln (Haenle et al. 2011; Stranak et al. 2011; Finke et al. 2012; Patenge et al. 2012), weitere Ergebnisse aus *in vivo* – Untersuchungen, sowie klinische Erfahrungen sind jedoch noch notwendig, um Kupfer regulär in der modernen Medizin einsetzen zu können. Aufgrund der (bereits beschriebenen) alarmierenden Resistenzlage gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen und den damit einhergehenden Konsequenzen für eine Therapie ist es allerdings von großer Relevanz, den standardmäßigen Einsatz von Antibiotika in der Primärprävention Implantat-assoziierten Infektionen zu limitieren und alternative antibakterielle Substanzen zu erproben.

Mit der hier vorgestellten Weiterentwicklung des intramedullären Infektmodells ist es gelungen, mit einem orthopädisch orientierten, metaphysären Infektmodell *in vivo* Implantat-assoziierte Infektionen am Tiermodell der Ratte sicher und reproduzierbar zu erzeugen.

In weiteren Versuchen muss nun evaluiert werden, inwieweit mit diesem Modell antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen orthopädischer und osteosynthetischer Implantate hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Toxizität überprüfbar sind.

5 Zusammenfassung

Endoprothesen und Osteosynthesematerialien werden weltweit mit großem Erfolg zur Wiederherstellung der Beweglichkeit von degenerativ veränderten Gelenken bzw. zur Heilung von Knochenbrüchen verwendet. Allein in Deutschland werden jährlich circa 370.000 Hüft- und Knie-Endoprothesen implantiert (Statistisches Bundesamt 2011), von steigenden Zahlen ist auszugehen (Kurtz et al. 2007). Eine Implantat-assoziierte Infektion tritt durchschnittlich in etwa 2 % der Fälle nach primären Endoprothesen-Implantationen auf (Geipel et al. 2004; Militz et al. 2010). Damit ist diese Komplikation zwar nicht die häufigste, jedoch ist sie für den Patienten physisch und psychisch stark belastend, sowie sehr kostenintensiv und langwierig zu therapieren. Dieses begründet das große Interesse in der Forschung, Strategien zu entwickeln, um das Auftreten von Implantat-assoziierten Infektionen bereits im Vorfeld zu verhindern.

Eine mögliche Prophylaxe-Strategie liegt im Einsatz antimikrobieller Beschichtungen auf Endoprothesenoberflächen. Mit antibiotikahaltigen Oberflächenbeschichtungen sind bereits erste experimentelle sowie klinische Erfolge verzeichnet worden (Lucke et al. 2005; Darouiche et al. 2007; Moskowitz et al. 2010; Fuchs et al. 2011). Die zunehmenden Antibiotika-Resistenzen stellen jedoch ein ernstzunehmendes Problem dar und veranlassen dazu, andere Substanzen, wie beispielsweise antimikrobiell wirkende Metalle zu erproben. Für orthopädische sowie traumatologische Zwecke haben sich Kupferionen in *in vitro* Untersuchungen als günstig erwiesen, da sie in gewissen Konzentrationsgrenzen antibakteriell wirken, ohne tierische oder humane Zellen wesentlich zu schädigen (Heidenau et al. 2005; Haenle 2008).

Untersuchungen neuer Substanzen für antimikrobielle Oberflächen im Tiermodell sind nach erfolgreichen *in vitro* Ergebnissen vor dem Einsatz am Patienten ein notwendiger Schritt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine von Heidenau et al. (2005) entwickelte kupferhaltige Oberflächenbeschichtung in einem Infektionsmodell der Ratte hinsichtlich der antibakteriellen Wirksamkeit und Gewebe-Toxizität untersucht werden.

In den durchgeführten Untersuchungen gelang es jedoch nicht, mit einem durch Lucke et al. (2003a) publizierten Infektionsmodell zuverlässig mikrobiologisch, röntgenologisch oder histologisch nachweisbare Implantat-assoziierte Infektionen am Tier zu erzeugen, so dass keine Aussagen über Wirksamkeit oder Toxizität dieser Beschichtung abgeleitet werden können.

Aus diesem Grund wurden die weiteren Arbeiten auf die Optimierung eines eigenen Infektionsmodells fokussiert, welches näher an die endoprothetische Situation angelehnt ist. Dazu wurde ein kegelförmiges Implantat neu generiert, welches durch Press-Fit – Verankerung in die Metaphyse der proximalen Rattentibia eingebracht wurde. Durch einen zentralen Kanal im Implantat wurde eine Bakteriensuspension (*S. aureus*) in das Knochenlager appliziert und die optimal einzubringende Bakterienmenge mit unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 10^2 und 10^7 KBE/15 μ l bestimmt.

Nach einem sechswöchigen Beobachtungsintervall konnten in den mikrobiologischen Analysen, die im Vergleich zum primären Versuchsaufbau ebenfalls optimiert wurden, bei allen verwendeten Bakterienkonzentrationen *S. aureus* – Kolonien in signifikanten Mengen am Implantat sowie im

Knochengewebe nachgewiesen werden. Die Verwendung hoher Bakterienkonzentrationen ($\geq 10^4$ KBE) führte zu überschießenden Infektionsverläufen mit makroskopisch sichtbaren Knochennekrosen, Weichteildefekten sowie Bildung großer Abszesshöhlen, welche beim Einsatz geringerer Keimmengen nicht zu beobachten waren.

Eine zuverlässige Verdünnung der Bakteriensuspension auf eine Konzentration von 10^2 KBE/15 μ l war technisch schwierig, so dass sich die Verwendung der Bakteriensuspension mit 10^3 KBE/15 μ l als optimales Inokulum herausstellte. Damit konnten mikrobiologisch nachweisbare Infektionen sicher und reproduzierbar ausgelöst werden.

In weiteren Schritten soll analysiert werden, inwieweit die im optimierten Infektionsmodell erzeugten Implantat-assoziierten Infektionen auch histologisch und röntgenologisch darstellbar sind. Des Weiteren gilt es festzustellen, ob sich mit diesem Infektionsmodell antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit untersuchen lassen, so dass es zur Evaluation neuer, der Implantat-assoziierten Infektion vorbeugender Oberflächen eingesetzt werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- Ahrens, H.; Grosheger, G.; Streitbuerger, A.; Gebert, C.; Harges, J. (2006): Antimikrobielle Silberbeschichtung von Tumorendoprothesen. In: *Der Onkologe* 12, S. 145–151.
- AlBuhairan, B.; Hind, D.; Hutchinson, A. (2008): Antibiotic prophylaxis for wound infections in total joint arthroplasty: a systematic review. In: *J Bone Joint Surg Br* 90 (7), S. 915–919.
- Alt, V.; Lips, K.S; Henkenbehrens, C.; Muhrer, D.; Cavalcanti-Garcia, M.; Sommer, U. (2011): A new animal model for implant-related infected non-unions after intramedullary fixation of the tibia in rats with fluorescent in situ hybridization of bacteria in bone infection. In: *Bone* 48 (5), S. 1146–1153.
- An, Y. H.; Kang, Q. K.; Arciola, C. R. (2006): Animal models of osteomyelitis. In: *Int J Artif Organs* 29 (4), S. 407–420.
- Anagnostakos, K.; Schmid, N.V.; Kelm, J.; Grun, U.; Jung, J. (2009): Classification of hip joint infections. In: *Int J Med Sci* 6 (5), S. 227–233.
- Andriole, V. T.; Nagel, D. A.; Southwick, W. O. (1973): A paradigm for human chronic osteomyelitis. In: *J Bone Joint Surg Am* 55 (7), S. 1511–1515.
- Andriole, V. T.; Nagel, D. A.; Southwick, W. O. (1974): Chronic staphylococcal osteomyelitis: an experimental model. In: *Yale J Biol Med* 47 (1), S. 33–39.
- Arens, S.; Schlegel, U.; Printzen, G.; Ziegler, W. J.; Perren, S. M.; Hansis, M. (1996): Influence of materials for fixation implants on local infection. An experimental study of steel versus titanium DCP in rabbits. In: *J Bone Joint Surg Br* 78 (4), S. 647–651.
- Arens S., Hansis M. (2001): Risiko der posttraumatischen Oseitis bei Osteosynthesen. In: *Trauma und Berufskrankheit* 3 (Suppl 4), S. 487–490.
- Ascherl R., Erhardt W. Kerschbaumer S. Schmeller M.L Gradinger R. (2006): Grundlagen. Tierexperimentelle Untersuchungen. In: *Ossäre Integration*; Hrsg.: Gradinger, R; Gollwitzer, H.; Springer, S. 30–36.
- Bader, R.; Mittelmeier, W.; Steinhauser, E. (2006): Versagensanalyse von Knieendoprothesen. Grundlagen und methodische Ansätze zur Schadensanalyse. In: *Orthopade* 35 (9), S. 896, 898-900, 902-3.
- Belmatoug, N.; Cremieux, A. C.; Bleton, R.; Volk, A.; Saleh-Mghir, A.; Grossin, M. et al. (1996): A new model of experimental prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a microbiologic, histopathologic, and magnetic resonance imaging characterization. In: *J Infect Dis* 174 (2), S. 414–417.
- Barbari, E. F.; Hanssen, A. D.; Duffy, M. C.; Steckelberg, J. M.; Ilstrup, D. M.; Harmsen, W. S.; Osmon, D. R. (1998): Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. In: *Clin Infect Dis* 27 (5), S. 1247–1254.

- Bernthal, N.M.; Stavrakis, A.; Billi, F.; Cho, J.S.; Kremen, T.J.; Simon, S. (2010): A mouse model of post-arthroplasty *Staphylococcus aureus* joint infection to evaluate in vivo the efficacy of antimicrobial implant coatings. In: *PLoS One* 5 (9), S. e12580.
- Blomgren, G.; Lindgren, U. (1981): Late hematogenous infection in total joint replacement: studies of gentamicin and bone cement in the rabbit. In: *Clin Orthop Relat Res* (155), S. 244–248.
- Borkow, G.; Gabbay, J. (2004): Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. In: *The FASEB Journal* 18, S. 1728–1730.
- Boy, O.; Dabisch I. (2008a): Hüft-Totalendoprothesen-Wechsel. In: BQS-Qualitätsreport 2008.
- Boy, O.; Dabisch I. (2008b): Knie-Totalendoprothesen-Wechsel. In: BQS-Qualitätsreport 2008.
- Bozic, K.J.; Kurtz, S.M.; Lau, E.; Ong, K.; Vail, T.P.; Berry, D.J. (2009): The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the United States. In: *J Bone Joint Surg Am* 91 (1), S. 128–133.
- Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C.R. (2006): The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. In: *Biomaterials* 27 (11), S. 2331–2339.
- Campoccia, D.; Montanaro, L.; Pirini, V.; Ravaioli, S.; Arciola, C.R. (2009): Prevalence of genes for aminoglycoside-modifying enzymes in *Staphylococcus epidermidis* isolates from orthopedic postsurgical and implant-related infections. In: *J Biomed Mater Res A* 88 (3), S. 654–663.
- Cierny, G3rd; DiPasquale, D. (2002): Periprosthetic total joint infections: staging, treatment, and outcomes. In: *Clin Orthop Relat Res* (403), S. 23–28.
- Collinge, C. A.; Goll, G.; Seligson, D.; Easley, K. J. (1994): Pin tract infections: silver vs uncoated pins. In: *Orthopedics* 17 (5), S. 445–448.
- Cooney, T.E. (1995): Bactericidal activity of copper and noncopper paints. In: *Infection Control and Hospital Epidemiology* 16 (8), S. 444–450.
- Cremieux, A.C.; Carbon, C. (1997): Experimental models of bone and prosthetic joint infections. In: *Clin Infect Dis* 25 (6), S. 1295–1302.
- Darouiche, RabihO.; Farmer, J.; Chaput, C.; Mansouri, M.; Saleh, G.; Landon, G. C. (1998): Anti-infective efficacy of antiseptic-coated intramedullary nails. In: *J Bone Joint Surg Am* 80 (9), S. 1336–1340.
- Darouiche, RabihO (2003): Antimicrobial approaches for preventing infections associated with surgical implants. In: *Clin Infect Dis* 36 (10), S. 1284–1289.
- Darouiche, RabihO (2004): Treatment of infections associated with surgical implants. In: *N Engl J Med* 350 (14), S. 1422–1429.
- Darouiche, RabihO; Mansouri, M.D; Zakarevicz, D.; Alsharif, A.; Landon, G.C. (2007): In vivo efficacy of antimicrobial-coated devices. In: *J Bone Joint Surg Am* 89 (4), S. 792–797.
- DeJong, E. S.; DeBerardino, T. M.; Brooks, D. E.; Nelson, B. J.; Campbell, A. A.; Bottoni, C. R. (2001): Antimicrobial efficacy of external fixator pins coated with a lipid stabilized hydroxyapatite/chlorhexidine complex to prevent pin tract infection in a goat model. In: *J Trauma* 50 (6), S. 1008–1014.

- Dekant, W.; Vamvakas, S. (2005): Metalle. Eigenschaften, Wirkungsmöglichkeiten. Allgemeine und spezielle Pharmakologie. 9. Auflage. München: Elsevir GmbH, S. 1011–1012.
- Del Pozo J.L.; Patel, R. (2009): Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. In: *N Engl J Med* 361 (8), S. 787–794.
- Dollwett, H.H.A. (1985): Historic use of copper compounds in medicine. In: *Trace elements in medicine* 2 (2), S. 80–87.
- ECDC (2010a): Susceptibility of *Enterococcus faecium* isolates to High level gentamicin in Germany in 2005 - 2010. EARS-Net Database. European Centre for Disease Prevention and Control.
- ECDC (2010b): Susceptibility of *Enterococcus faecium* isolates to Vancomycin in Germany in 2000 - 2010. EARS-Net Database. European Centre for Disease Prevention and Control.
- ECDC (2010c): Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates to Methicillin in Germany in 2010. EARS-Net Database. European Centre for Disease Prevention and Control.
- Elek, S.D.; Conen, P.E. (1957): The virulence of *Staphylococcus pyogenes* for man; a study of the problems of wound infection. In: *Br J Exp Pathol* 38 (6), S. 573–586.
- Engelhard Arzneimittel (2007): Fachinformation Chlorhexidindugluconat-Lösung 2%;. Stand 11/2007.
- Engesæter, L.B; Lie, S.A.; Espehaug, B.; Furnes, O.; Vollset, S.E.; Havelin, L. (2003): Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. In: *Acta Orthop Scand* 74 (6), S. 644–651.
- Epstein, L.; Bassein, S. (2001): Pesticide Applications of copper on perennial crops in California. 1993 to 1998. In: *Journal of Environ. Qual.* 30, S. 1844–1847.
- Europäische Union (2010): Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere
- Finke, B.; Polak, M.; Hempel, F.; Rebl H.; Zietz, C.; Stranak, V.; Lukowski, G.; Hippler, R.; Bader, R.; Nebe, J.B.; Weltmann K.D.; Schröder, K.(2012): Antimicrobial Potential of Copper-Containing Titanium Surfaces Generated by Ion Implantation and Dual High Power Impulse Magnetron Sputtering. In: *Advanced Engineering Materials*. 14 (5) S. 224 - 230
- Fitzgerald, R. H., JR (1983): Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. In: *J Bone Joint Surg Am* 65 (3), S. 371–380.
- Frommelt, L. (2004): Prinzipien der Antibiotikabehandlung bei periprothetischen Infektionen. In: *Orthopade* 33 (7), S. 822–828.
- Fuchs, T.; Stange, R.; Schmidmaier, G.; Raschke, M.J. (2011): The use of gentamicin-coated nails in the tibia: preliminary results of a prospective study. In: *Arch Orthop Trauma Surg* 131 (10), S. 1419–1425.

- Gabbay, J.; Borkow, G.; Mishal, J.; Magen, E.; Zatcoff, R.; Shemer-Avni, Y. (2006): Copper oxide impregnated textiles with potent biocidal activities. In: *Journal of Industrial Textiles* 35 (4), S. 323–335.
- Gandhi, R.; Razak, F.; Pathy, R.; Davey, JR.; Syed, K.; Mahomed, N.N (2009): Antibiotic bone cement and the incidence of deep infection after total knee arthroplasty. In: *J Arthroplasty* 24 (7), S. 1015–1018.
- Garvin, K. L.; Hinrichs, S. H.; Urban, J. A. (1999): Emerging antibiotic-resistant bacteria. Their treatment in total joint arthroplasty. In: *Clin Orthop Relat Res* (369), S. 110–123.
- Geipel, U.; Herrmann, M. (2004): Das infizierte Implantat. Teil 1. Bakteriologie. In: *Orthopade* 33 (12), S. 1411-26; 1427-8.
- Glaxo Smith Kline (2007): Fachinformation Clorhexamed alkoholfrei. Stand 08/2007.
- Gollwitzer, H.; Diehl, P.; Gerdesmeyer, L.; Mittelmeier, W. (2006a): Diagnostische Strategien bei Verdacht auf periprothetische Infektion einer Kniegelenkttotalendoprothese. Literaturübersicht und aktuelle Empfehlungen. In: *Orthopade* 35 (9), S. 904, 906-8, 910-6.
- Gollwitzer H., Gerdesmeyer L. (2006b): Oberflächenbeschichtungen. Antiiinfektiöse Oberflächenbeschichtung. In: *Ossäre Integration*; Hrsg.: Grading, R; Gollwitzer, H.; Springer, S. 62–68.
- Gracia, E.; Lacleriga, A.; Monzon, M.; Leiva, J.; Oteiza, C.; Amorena, B. (1998): Application of a rat osteomyelitis model to compare in vivo and in vitro the antibiotic efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms. In: *J Surg Res* 79 (2), S. 146–153. doi:10.1006/jsre.1998.5416.
- Grading, R.; Gollwitzer, H. (2006): *Ossäre Integration*. Mit 28 Tabellen. Heidelberg: Springer.
- Gristina, A. G.; Costerton, J. W. (1985): Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. In: *J Bone Joint Surg Am* 67 (2), S. 264–273.
- Gristina, A. G. (1987): Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. In: *Science* 237 (4822), S. 1588–1595.
- Gristina, A. G.; Naylor, P. T.; Myrvik, Q. N. (1991): Mechanisms of musculoskeletal sepsis. In: *Orthop Clin North Am* 22 (3), S. 363–371.
- Gristina, A. G. (1994): Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. In: *Clin Orthop Relat Res* (298), S. 106–118.
- Habash, M.; Reid, G. (1999): Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. In: *J Clin Pharmacol* 39 (9), S. 887–898.
- Haenle, M.; Fritsche, A.; Zietz, C.; Bader, R.; Heidenau, F.; Mittelmeier, W.; Gollwitzer, H. (2011): An extended spectrum bactericidal titanium dioxide (TiO₂) coating for metallic implants: in vitro effectiveness against MRSA and mechanical properties. In: *J Mater Sci Mater Med* 22 (2), S. 381–387.

- Haenle, M. (2008): Mikrobiologische Untersuchung zur antibakteriellen Potenz von Metallionen sowie einer neuartigen antiinfektiösen Titan(V)-oxid Oberflächenbeschichtung für medizinische Implantate. Dissertation. Technische Universität München, München. Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München.
- Harris, L. G.; Mead, L.; Muller-Oberlander, E.; Richards, R. G. (2006): Bacteria and cell cytocompatibility studies on coated medical grade titanium surfaces. In: *J Biomed Mater Res A* 78 (1), S. 50–58. doi:10.1002/jbm.a.30611.
- Heidenau, F.; Stenzel, F.; Schmidt, H.; Ziegler, G. (2001): Offenporige, bioaktive Oberflächenbeschichtungen auf Titan. In: *Biomaterials* 2 (1), S. 19–24.
- Heidenau, F.; Mittelmeier, W.; Detsch, R.; Haenle, M.; Stenzel, F.; Ziegler, G.; Gollwitzer, H. (2005): A novel antibacterial titania coating: metal ion toxicity and in vitro surface colonization. In: *J Mater Sci Mater Med* 16 (10), S. 883–888.
- Heraeus GmbH (2006): Informationsbroschüre Technovit 9100.
- Illingworth, B.L.; Tweden, K.; Schroeder, R.F.; Cameron, J.D. (1998): In vivo efficacy of silver-coated (Silzone) infection-resistant polyester fabric against a biofilm-producing bacteria, *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Heart Valve Dis* 7 (5), S. 524–530.
- Ionescu, A.; Payne, N.; Fraser, A.G.; Giddings, J.; Grunkemeier, G.L.; Butchart, E.G. (2003): Incidence of embolism and paravalvar leak after St Jude Silzone valve implantation: experience from the Cardiff Embolic Risk Factor Study. In: *Heart* 89 (9), S. 1055–1061.
- Jiranek, W.A.; Hanssen, A.D.; Greenwald, A.S. (2006): Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. In: *J Bone Joint Surg Am* 88 (11), S. 2487–2500.
- Källicke, T.; Schlegel, U.; Kraft, C.; Wingenfeld, C.; Muhr, G.; Arens, S. (2004): Tierexperimentelle Osteitismodelle. In: *Orthopade* 33 (3), S. 260–266.
- Källicke, T.; Schierholz, J.; Schlegel, U.; Frangen, T.M.; Koller, M.; Printzen, G. et al. (2006): Effect on infection resistance of a local antiseptic and antibiotic coating on osteosynthesis implants: an in vitro and in vivo study. In: *J Orthop Res* 24 (8), S. 1622–1640.
- Kirschner S. (2008): Versagensursachen primärer Implantationen. Septische Lockerung und Behandlungsstrategien. In: *Revisionsendoprothetik der Hüftpfanne*; Hrsg.: Wirtz, D.C.; Rader, C.; Reichel, H.; Springer, S. 41–53.
- Krentz, Helga (2005): Statistische Analysen mit SPSS in der Medizin. Band 2: Schließende Statistische Analysen. Shaker Verlag. Aachen.
- Kurtz, S.; Ong, K.; Lau, E.; Mowat, F.; Halpern, M. (2007): Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. In: *J Bone Joint Surg Am* 89 (4), S. 780–785.
- Laffer, R.; Ruef, C. (2006): Diagnose und Therapie von Gelenkprotheseninfektionen. In: *Z Rheumatol* 65 (1), S. 12, 14-7.

- Li, D.; Gromov, K.; Soballe, K.; Puzas, J.E.; O'Keefe, R.J.; Awad, H. et al. (2008): Quantitative mouse model of implant-associated osteomyelitis and the kinetics of microbial growth, osteolysis, and humoral immunity. In: *J Orthop Res* 26 (1), S. 96–105.
- Lidgren, L. (2001): Joint prosthetic infections: a success story. In: *Acta Orthop Scand* 72 (6), S. 553–556.
- Lindsey, B.A.; Clovis, N.B.; Smith, E.S.; Salihi, S.; Hubbard, D.F. (2010): An animal model for open femur fracture and osteomyelitis: Part I. In: *J Orthop Res* 28 (1), S. 38–42. doi:10.1002/jor.20960.
- Lohmann C.H., Nuechtern J.V Zustin J. Fuerst M. Ruether W. (2008): Versagenursachen primärer Implantationen. Lockerungsursache Low-Grade-Infekt oder Implantatallergie. In: Revisionsendoprothetik der Hüftpfanne; Hrsg. Wirtz, D.C.; Rader, C.; Reichel, H.; Springer, S. 32–40.
- Lucke, M.; Schmidmaier, G.; Sadoni, S.; Wildemann, B.; Schiller, R.; Stemberger, A. et al. (2003a): A new model of implant-related osteomyelitis in rats. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 67 (1), S. 593–602.
- Lucke, M.; Schmidmaier, G.; Sadoni, S.; Wildemann, B.; Schiller, R.; Haas, N. P.; Raschke, M. (2003b): Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. In: *Bone* 32 (5), S. 521–531.
- Lucke, M.; Wildemann, B.; Sadoni, S.; Surke, C.; Schiller, R.; Stemberger, A. et al. (2005): Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. In: *Bone* 36 (5), S. 770–778. doi:10.1016/j.bone.2005.01.008.
- Marculescu, C.E.; Cantey, J.R. (2008): Polymicrobial prosthetic joint infections: risk factors and outcome. In: *Clin Orthop Relat Res* 466 (6), S. 1397–1404.
- Massè, A.; Bruno, A.; Bosetti, M.; Biasibetti, A.; Cannas, M.; Gallinaro, P. (2000): Prevention of pin track infection in external fixation with silver coated pins: clinical and microbiological results. In: *J Biomed Mater Res* 53 (5), S. 600–604.
- McPherson, E.J.; Woodson, C.; Holtom, P.; Roidis, N.; Shufelt, C.; Patzakis, M. (2002): Periprosthetic total hip infection: outcomes using a staging system. In: *Clin Orthop Relat Res* (403), S. 8–15.
- Melcher, G.A.; Claudi, B.; Schlegel, U.; Perren, S.M.; Printzen, G.; Munzinger, J. (1994): Influence of type of medullary nail on the development of local infection. An experimental study of solid and slotted nails in rabbits. In: *J Bone Joint Surg Br* 76 (6), S. 955–959.
- Michels H.T.; Wilks, S.A.; Noyce, J.O.; Keevil, C.W. (2005): Copper alloys for human infectious disease control. In: Materials Science and Technology Conference, Pittsburg, Copper for the 21st Century Symposium, 2005.
- Militz, M.; Bühren, V. (2010): Wechsel infizierter Knie- und Hüftendoprothesen. In: *Chirurg* 81 (4), S. 310–320.
- Montali, A. (2006): Antibacterial coating systems. In: *Injury* 37 Suppl 2, S. S81-6. doi:10.1016/j.injury.2006.04.013.

- Monzón, M.; Garcia-Alvarez, F.; Lacleriga, A.; Gracia, E.; Leiva, J.; Oteiza, C.; Amorena, B. (2001): A simple infection model using pre-colonized implants to reproduce rat chronic *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and study antibiotic treatment. In: *J Orthop Res* 19 (5), S. 820–826. doi:10.1016/S0736-0266(00)00076-0.
- Monzón, M.; Garcia-Alvarez, F.; Lacleriga, A.; Amorena, B. (2002): Evaluation of four experimental osteomyelitis infection models by using precolonized implants and bacterial suspensions. In: *Acta Orthop Scand* 73 (1), S. 11–19. doi:10.1080/000164702317281341.
- Moskowitz, J.S.; Blaisse, M.R.; Samuel, R.E.; Hsu, H.P.; Harris, M.B.; Martin, S.D. et al. (2010): The effectiveness of the controlled release of gentamicin from polyelectrolyte multilayers in the treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a rabbit bone model. In: *Biomaterials*. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.011.
- Namba, R.S.; Chen, Y.; Paxton, E.W.; Slipchenko, T.; Fithian, D.C (2009): Outcomes of routine use of antibiotic-loaded cement in primary total knee arthroplasty. In: *J Arthroplasty* 24 (6 Suppl), S. 44–47.
- Nelson, D.R.; Buxton, T.B.; Luu, Q.N.; Rissing, J.P. (1990): The promotional effect of bone wax on experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. In: *J Thorac Cardiovasc Surg* 99 (6), S. 977–980.
- Norden, C.W. (1970): Experimental osteomyelitis. I. A description of the model. In: *J Infect Dis* 122 (5), S. 410–418.
- Patel, M.; Rojavin, Y.; Jamali, A. A.; Wasielewski, S. J.; Salgado, C. J. (2009): Animal models for the study of osteomyelitis. In: *Semin Plast Surg* 23 (2), S. 148–154. doi:10.1055/s-0029-1214167.
- Patenge, N.; Arndt, K.; Eggert, T.; Zietz, C.; Kreikemeyer, B.; Bader, R. et al. (2012): Evaluation of antimicrobial effects of novel implant materials by testing the prevention of biofilm formation using a simple small scale medium-throughput growth inhibition assay. In: *Biofouling* 28 (3), S. 267–277.
- Petrides P. (2003): Spurenelemente. Kupfer. Biochemie und Pathobiochemie. 7. Auflage. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, S. 709–712.
- Petty, W.; Spanier, S.; Shuster, J.J.; Silverthorne, C. (1985): The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. In: *J Bone Joint Surg Am* 67 (8), S. 1236–1244.
- Podbielski, A.; Pahncke, D.; Mittelmeier, W. (2009): Infektionsprophylaxe für Gelenkprothesenträger bei zahnärztlichen Behandlungen--ein Diskussionsbeitrag. In: *Z Orthop Unfall* 147 (3), S. 350–355.
- Pommer, A.; Muhr, G.; David, A. (2002): Hydroxyapatite-coated Schanz pins in external fixators used for distraction osteogenesis. A randomized, controlled trial. In: *J Bone Joint Surg Am* 84 (7), S. 1162–1166.
- Price, J.S.; Tencer, A.F.; Arm, D.M.; Bohach, G.A. (1996): Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. In: *J Biomed Mater Res* 30 (3), S. 281–286.
- Rammelt, S.; Schulze, E.; Bernhardt, R.; Hanisch, U.; Scharnweber, D.; Worch, H. et al. (2004): Coating of titanium implants with type-I collagen. In: *J Orthop Res* 22 (5), S. 1025–1034.

- Rammelt, S.; Heck, C.; Bernhardt, R.; Bierbaum, S.; Scharnweber, D.; Goebbels, J. et al. (2007): In vivo effects of coating loaded and unloaded Ti implants with collagen, chondroitin sulfate, and hydroxyapatite in the sheep tibia. In: *J Orthop Res* 25 (8), S. 1052–1061.
- Raschke, M. J.; Schmidmaier, G. (2004): Biologisierung von Implantaten in der Chirurgie des Stütz- und Bewegungsapparates. In: *Unfallchirurg* 107 (8), S. 653–663.
- Rissing, J.P.; Buxton, T.B.; Weinstein, R.S.; Shockley, R.K. (1985): Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. In: *Infect Immun* 47 (3), S. 581–586.
- Robert Koch-Institut (2012): ARS. Antibiotika Resistenz Surveillance. <https://ars.rki.de>, Stand 21.03.2012.
- SARI (2011): Antibiotikaresistenzen auf den an SARI beteiligten Intensivstationen. Hg. v. U. Benjamin Franklin FU Berlin/ZB Krankenhaushygiene und Infektionsprävention UL Charité HU Berlin/K Institut für Hygiene. Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen. www.antibiotika-sari.de.
- Schaff, H.V.; Carrel, T.P.; Jamieson, W.R.; Jones, K.W.; Ruffilanchas, J.J.; Cooley, D.A. et al. (2002): Paravalvular leak and other events in silzone-coated mechanical heart valves: a report from AVERT. In: *Ann Thorac Surg* 73 (3), S. 785–792.
- Scharnweber, D.; Flossel, M.; Born, R.; Worch, H. (2007): Adjusting the chlorhexidine content of calcium phosphate coatings by electrochemically assisted co-deposition from aqueous solutions. In: *J Mater Sci Mater Med* 18 (2), S. 391–397. doi:10.1007/s10856-006-0704-7.
- Scheman L. (1941): The production of experimental osteomyelitis: preliminary report. In: *Journal of the American Medical Association* 117, S. 1525–1529.
- Schmidmaier G.; Wildemann B. (2006a): Oberflächenbeschichtung. Bioaktive Oberflächenbeschichtung. In: *Ossäre Integration*; Hrsg: Grading, R; Gollwitzer, H.; Springer.
- Schmidmaier, G.; Lucke, M.; Wildemann, B.; Haas, N. P.; Raschke, M. (2006b): Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. In: *Injury* 37 Suppl 2, S. S105-12. doi:10.1016/j.injury.2006.04.016.
- Schülke & Mayr (2008): Fachinformation Octenisept®. Stand 11/2008.
- Schulz, S.; Steinhart, H.; Mutters, R. (2001): Chronic osteomyelitis in a new rabbit model. In: *J Invest Surg* 14 (2), S. 121–131.
- Schurman, D. J.; Trindade, C.; Hirshman, H. P.; Moser, K.; Kajiyama, G.; Stevens, P. (1978): Antibiotic-acrylic bone cement composites. Studies of gentamicin and Palacos. In: *J Bone Joint Surg Am* 60 (7), S. 978–984.
- Shirai, T.; Tsuchiya, H.; Shimizu, T.; Ohtani, K.; Zen, Y.; Tomita, K. (2009): Prevention of pin tract infection with titanium-copper alloys. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91 (1), S. 373–380. doi:10.1002/jbm.b.31412.

- Statistisches Bundesamt (Wiesbaden 2011): Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern - Ausführliche Darstellung - 2010.
- Stranak, V.; Wulff, H.; Rebl, H.; Zietz, C.; Arndt, K.; Bogdanowicz, R. et al. (2011): Deposition of thin titanium–copper films with antimicrobial effect by advanced magnetron sputtering methods. In: *Materials Science and Engineering C* 31 (2011), S. 1512–1519
- Thurmann, R.B. (1989): The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. In: *Critical Reviews in Environmental Control* 18 (4), S. 295–315.
- Trampuz, A.; Piper, K.E; Jacobson, M.J; Hanssen, A.D; Unni, K.K; Osmon, D.R et al. (2007): Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. In: *N Engl J Med* 357 (7), S. 654–663.
- Vester, H.; Wildemann, B.; Schmidmaier, G.; Stockle, U.; Lucke, M. (2010): Gentamycin delivered from a PDLLA coating of metallic implants In vivo and in vitro characterisation for local prophylaxis of implant-related osteomyelitis. In: *Injury*. doi:10.1016/j.injury.2010.05.010.
- Wagner, C.; Hansch, G. M.; Wentzensen, A.; Heppert, V. (2006): Die implantatassoziierte posttraumatische Osteitis. Bakterielle Biofilme und Infektabwehr als Protagonisten der lokalen Entzündungsreaktion. In: *Unfallchirurg* 109 (9), S. 761–769.
- Weber, D.J.; Rutala, W.A. (2001): Use of metals as microbicides in preventing infections in healthcare. Disinfection, Sterilization, and Preservation. fifth edition. New York: Lippincott Williams and Wilkins., S. 415–430.
- Wellisz, T.; An, Y.H; Wen, X.; Kang, Q.; Hill, C.M; Armstrong, J.K (2008): Infection rates and healing using bone wax and a soluble polymer material. In: *Clin Orthop Relat Res* 466 (2), S. 481–486.
- Wirtz, D.C.; Rader, C.; Reichel, H. (2008): Revisionsendoprothetik der Hüftpfanne. Heidelberg: Springer Medizin.
- Wodtke, J.; Lohr, J.F. (2008): Das infizierte Implantat. In: *Orthopade* 37 (3), S. 257-67; quiz 268-9.
- Zimmerli, W.; Lew, P.D.; Waldvogel, F.A. (1984): Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. In: *J Clin Invest* 73 (4), S. 1191–1200.
- Zimmerli, W.; Ochsner, P. E. (2003): Management of infection associated with prosthetic joints. In: *Infection* 31 (2), S. 99–108.
- Zucker C., Michel M. (2008): Sozioökonomische Aspekte der Hüft-Revisionsendoprothetik im Zeitalter der DRGs. In: Revisionsendoprothetik der Hüftpfanne; Hrsg. Wirtz D.C., Rader C., Reichel H., S. 255–270.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pin aus TiAl6V4 zur intramedullären Implantation in die Tibia nach Inokulation einer Bakteriensuspension in den Markraum. Die Pinoberfläche kann mit unterschiedlichen Beschichtungen versehen werden.....	30
Abbildung 2: a) Sterile Abdeckung des linken Hinterbeines mit selbstklebendem OP-Abdeckmaterial nach Rasur und Desinfektion der Haut. b) Hautschnitt entlang der Tibia mit einem Skalpell; die knöcherne Tibiavorderkante schimmert als weiße, strichförmige Struktur zwischen den umgebenden Muskeln durch.	33
Abbildung 3: a) Aufbohren der Kortikalis mit einer sterilen Kanüle (20G) und b) Eröffnung des Markraums sowie Aufbohrung in antegrader Richtung für etwa 20 mm mit einem Kirschner-Draht (1 mm Durchmesser).....	34
Abbildung 4: a) Injektion von 10 µl der Bakteriensuspension in die Tiefe des aufgebohrten Markraumes mit einer Hamilton®-Spritze. b) Anschließend wird der Pin in die Markhöhle eingebracht und nach distal vorgeschoben.	34
Abbildung 5: a) Zu sehen ist die exartikulierte Tibia, der Weichteilmantel wurde entfernt, der Pin wird mit Hilfe einer Pinzette aus dem Marklager gezogen. Abbildung b) zeigt die Präparate, wie sie weiter untersucht werden: der Pin ist mit einer sterilen Zange halbiert worden, um sowohl mikrobiologisch als auch rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden zu können.	36
Abbildung 6: Darstellung der Regionen R 1-3.....	38
Abbildung 7: a) Neu entwickeltes Implantat aus TiAl6V4 zur metaphysären Verankerung in der proximalen Tibia (gemäß Abbildung b). Der zentrale Kanal (Pfeil) dient der Injektion der Bakteriensuspension in den periimplantären Raum, welcher in Abbildung b in schematischer Weise hellgrau dargestellt ist.	40
Abbildung 8: Technische Bauzeichnung des Implantats	41
Abbildung 9: a) Aufbohren der Kortikalis der proximalen Metaphyse mit einem elektrischen Handbohrer und b) anschließendem Einbringen des Implantates in den Knochen mittels Press-Fit-Methode mit einem speziell für das Implantat entwickelten Einsatzstab.	43
Abbildung 10: Darstellung des Implantats von zwei Seiten; im Hintergrund ist das Implantat mit dem Einsatzstab über eine Schraubverbindung konnektiert.	44
Abbildung 11: a) Das Implantat ist in die proximale Metaphyse eingebracht und schließt mit der Kortikalis ab. b) Über den zentralen Kanal wird die Bakteriensuspension in den periimplantären Raum mit Hilfe einer Hamilton®-Spritze injiziert.....	44
Abbildung 12: a) Großzügiger Hautschnitt entlang der Tibiavorderkante, die Oberseite des Implantates schimmert bereits als runde, gräuliche Struktur durch dünne Weichteilstrukturen hindurch. b) Von der Implantatoberseite werden Abstriche mit befeuchteten Wattetupfern entnommen.	46
Abbildung 13: a) Exartikulierter Knochen, die Weichteilstrukturen sind entfernt, das Implantat befindet sich im Knochenbett b) Entfernung des Implantates aus dem Knochenlager mit Hilfe des Einsatzstabes.....	46

- Abbildung 14: Wundheilungsstörung am linken Hinterbein oberhalb der Implantationsstelle mit großem Hautdefekt; das Nahtmaterial wurde vom Tier entfernt. 51
- Abbildung 15: Grafische Darstellung des Temperaturverlaufes über den gesamten Beobachtungszeitraum (abgebildet als Mittelwert je Versuchsgruppe)..... 51
- Abbildung 16: Ergebnis der mikrobiologischen Analysen; grafisch dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen in KBE/ml im Knochengewebe (blau), am Pin nach Ultraschallbehandlung (rot) sowie im Sediment (grün)..... 54
- Abbildung 17: a) Postoperative Lagekontrolle; dargestellt ist eine korrekte, zentral intramedulläre Lage des Pins; b) Postoperative Lagekontrolle; inkorrekte Lage des Pins, da er diagonal die Tibia durchbricht; c) Kontrollaufnahme nach drei Wochen: zu sehen ist eine Fraktur der Tibia und Fibula im Bereich der Pinmitte / Region R2; die Knochenstrukturen sind deutlich aufgelockert, am lateralen Rand ist eine Weichteilschwellung angedeutet (Pfeil); d) Kontrolle nach sechs Wochen: es sind Entzündungszeichen in Form periostaler Reaktionen (blaue Pfeile) und Sequesterbildungen (roter Pfeil) in der Region R2 erkennbar. 56
- Abbildung 18: a) Histologische Darstellung eines Knochenpräparates der Kontrollgruppe I in vierfacher Vergrößerung; zu sehen ist das distale Ende des Bohrkanals mit einer neugebildeten feinen Knochenlamelle, die die Form der Pinspitze wiedergibt (grün; mit Pfeil markiert). Abbildung b) zeigt den zentralen Verlauf des Pinkanals in einer Knochenprobe der Versuchsgruppe II; es ist ebenfalls eine feine Knochenlamelle (grün) zu erkennen, welche den Pinkanal weitgehend auskleidet. Abbildung c) zeigt das distale Ende des Bohrkanals einer Probe der Versuchsgruppe II, eine frische Knochenlamelle ist ebenfalls erkennbar (Pfeil); d) Abbildung des distalen Bohrkanals mit gut sichtbarer Knochenlamelle (Pfeil) in einem Präparat der Versuchsgruppe III. 57
- Abbildung 19: REM-Darstellungen in 5000facher Vergrößerung. Abbildung a) zeigt eine Pin-Oberfläche der Gruppe II, es sind keine Bakterien erkennbar. Auf der Abbildung b) sind vereinzelte Bakterienkolonien (Pfeile) auf einer Pinoberfläche aus der Gruppe IV zu erkennen. Deutliche Biofilmbildungen konnten in den untersuchten Proben nicht festgestellt werden. 58
- Abbildung 20: Histologische Darstellungen in vierfacher Vergrößerung, nach Masson-Goldner gefärbt. In Abbildung a) ist ein zentraler Abschnitt des Pinkanals in einer Probe der Gruppe VI zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Kanal mit einer dünnen Lamelle, neu gebildeten Knochens ausgekleidet ist (grüne Struktur lumenseitig; siehe Pfeile). Abbildung b) zeigt ein distales Ende des Pinkanals der Gruppe IX. Auch hier ist der Kanal mit Knochengewebe ausgekleidet, welches noch nicht vollständig kalzifiziert ist (Pfeil, hellgrüne Strukturen lumenseitig). 60
- Abbildung 21: Veränderungen der Körpertemperatur (rektal) während des Beobachtungszeitraumes von 42 Tagen, die grafische Darstellung zeigt, dass eine überwiegende Anzahl an Messdaten im mittleren Bereich zwischen 36,6 und 37,8 °C liegen und keine deutlichen Abweichungen einzelner Gruppen zu erkennen sind. Die Daten sind als Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen in °C angegeben. 63

- Abbildung 22: a) Ansicht eines Unterschenkels der Gruppe I während der Freipräparation des Knochens von umgebenden Weichteilstrukturen mit Blick von dorsomedial auf die Tibiarückfläche. Es ist zu erkennen, dass das Implantat dorsal nicht von Knochengewebe umgeben ist. b) Hautschnitt über der Implantationsstelle; eine circa 5 mm messende Schwellung ist oberhalb der Implantatoberfläche erkennbar (Pfeil) 64
- Abbildung 23: a) Körperliche Untersuchung nach 21 Tagen in Narkose; zu erkennen ist ein etwa erbsgroßer Tumor (Pfeil) über der Implantationsstelle. b) zeigt eine Röntgenkontrolle nach 21 Tagen des Beckens sowie der unteren Extremitäten beidseits in anterior-posteriorem Strahlengang 65
- Abbildung 24: a) Zu erkennen ist der freipräparierte Knochen mit dem Implantat, um welches Lysesäume deutlich erkennbar sind (Pfeile), das Implantat war nicht fest in den Knochen integriert. b) Darstellung während der Explantation, das Implantat war lose im Knochenbett lokalisiert und ohne aufwändige Maßnahmen zu entfernen. In den Weichteilen zeigten sich keine offensichtlichen Entzündungszeichen. 66
- Abbildung 25: a) Darstellung während der Explantation. Nach dem Hautschnitt erscheint eine tumoröse Schwellung über dem Implantat, welche allseits von feinen Weichteilstrukturen umkapselt ist. b) Bei leichtem Druck auf die Kapsel eröffnet sich diese an der Oberseite und eitrige Masse entleert sich. Die tumoröse Struktur präsentiert sich als eine Abszesshöhle oberhalb der Implantatlokalisierung. 67
- Abbildung 26: Darstellungen nach Exartikulation des Knochens und Entfernung der Weichteilstrukturen. a) Sicht von medial auf die proximale Tibia, die Form des Kniegelenkes (Tibiaplateau) ist kaum abzugrenzen, das Knochengewebe ist weich, aufgelockert, Osteolysen sind deutlich erkennbar. b) Darstellung der proximalen Tibia, Aufsicht von medial auf die ursprüngliche Implantationsstelle. Das Gewebe ist nekrotisch, Osteolysen sind deutlich zu erkennen 68
- Abbildung 27: Darstellung während der Explantation nachdem die Haut über dem Kniegelenk und der Tibia großzügig eröffnet wurde. a) Lokale, umschriebene Schwellung oberhalb der Implantatstelle; leichte Entzündungszeichen sind erkennbar. b) Bei weiterer Eröffnung der Schwellung präsentiert sich ein wachsähnlicher Stöpsel auf der Implantatoberseite; möglicherweise ein Anhalt für Knochenwachs als Ursprung der Schwellung. 68
- Abbildung 28: Grafische Darstellung der mikrobiologischen Ergebnisse im Überblick. Dargestellt sind jeweils die Mediane der Keimkonzentrationen in KBE/ml in den Untersuchungsmaterialien Knochen (grün) und Implantat (blau). 72
- Abbildung 29: Histologische Schnitte durch das Implantat (Färbung: Giemsa-Toluidin) a) Abbildung eines Implantates der Gruppe I (steril). Der zentrale Injektionskanal ist nicht mittig angeschnitten. Die Knochentrabekel (hellblau) sind allseits bis an das Implantat herangewachsen. b) Darstellung eines Implantates aus der Versuchsgruppe VII (10^7 KBE). Um das Implantat herum ist ein hellblauer Saum nicht ossifizierten Gewebes erkennbar (Pfeile), es hat keine Osteointegration stattgefunden. Der zentrale Kanal ist nicht angeschnitten. 88

Abbildung 30: REM Fotografie einer Oberfläche aus der Versuchsgruppe VII (10^7 KBE); deutlich erkennbare Erythrozyten (Pfeile rot), die von einem Bakterienrasen überzogen sind (Pfeile blau); 2000fache Vergrößerung.....	89
---	----

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erregerspektrum bei Gelenkinfektionen (Geipel et al. 2004)	11
Tabelle 2: Anzahl der in die Versuche eingeschlossenen Tiere	49
Tabelle 3: Gewichtsverhalten der einzelnen Untersuchungsgruppen;.....	50
Tabelle 4: Anzahl der in die mikrobiologischen Analysen eingeschlossenen Versuchstiere pro Untersuchungsgruppe.....	52
Tabelle 5: Mikrobiologischer Nachweis von <i>S. aureus</i> im Wundabstrich und in der Blutkultur.	52
Tabelle 6: Keimnachweis im Knochenpräparat;.....	53
Tabelle 7: Keimnachweis am Pin nach Ultraschallbehandlung;	53
Tabelle 8: Keimnachweis am Pin nach Sedimentation;	54
Tabelle 9: Röntgenscore;	55
Tabelle 10: Einteilung der Versuchsgruppen und Anzahl der untersuchten Tiere.....	59
Tabelle 11: Gruppeneinteilung und Anzahl der Tiere des metaphysären Infektmodells	61
Tabelle 12: Gewichtsverhalten innerhalb des Untersuchungszeitraumes;	62
Tabelle 13: Kontrolle der eingesetzten Bakterienkonzentrationen;.....	69
Tabelle 14: Positiver Nachweis des ursprünglich verwendeten <i>S. aureus</i> – Stammes	70
Tabelle 15: Mikrobiologische Ergebnisse der Knochen- und Implantatanalysen.	72

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist aus Datenschutzgründen in der online-Version dieser Dissertationsschrift nicht enthalten.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Anika Vetter, erkläre, dass ich die hier vorliegende Dissertationsarbeit mit dem Thema „Optimierung eines ossären Infektmodells zur tierexperimentellen Untersuchung antimikrobieller Oberflächen in der Prophylaxe Implantat-assoziiertes Infektionen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet habe.

Traunstein, den 03.07.2013

Anika Vetter

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Rainer Bader, der es mir ermöglichte, diese Dissertation zu schreiben und mit viel Anregung und Kritik zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt Dipl.-Ing. Carmen Zietz, die mir als Betreuerin ständig zur Seite stand und kaum eine Frage oder Bitte unbeantwortet lies.

Ein weiterer Dank geht an die Arbeitsgruppe aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Rostock, für die tolle Zusammenarbeit und Hilfe: Dipl.-Ing. Tobias Lindner, Dr. med. Maximilian Haenle und Lars Middelborg.

Des Weiteren möchte ich mich ausdrücklich bei Dipl.-Ing. Kathleen Arndt sowie Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock, für die gute Zusammenarbeit sowie die Herstellung und Analyse der mikrobiologischen Proben und die Hilfe bei allen mikrobiologischen Fragestellungen bedanken. Zudem bedanke ich mich auch bei den MTA der mikrobiologischen Routinediagnostik für die Auswertung der Proben.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Universitätsmedizin Rostock, Fr. Gütschow, Hr. Wolter und Fr. Dr. Lenz für die histologische Aufbereitung der Proben, sowie Dipl.-Ing. Gerhard Fulda aus dem Elektronenmikroskopischen Zentrum, Universitätsmedizin Rostock, für die Bearbeitung der Proben und Erstellung der REM-Bilder.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Versuchsdaten möchte ich mich bei Prof. Dr. Günther Kundt, Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung, Universitätsmedizin Rostock, bedanken.

Ferner möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling für die Bereitstellung der Räumlichkeiten im Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Universitätsmedizin Rostock, sowie bei seinen Mitarbeitern, insbesondere bei Fr. Porath, für die große Hilfe bei der Tierpflege bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Dipl.-Chem. Frank Heidenau und das Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien in Bayreuth für die Beschichtung der Pins.

Mein letzter und sehr herzlicher Dank geht an meine Eltern, die mir über die ganze Zeit mit Rat und Kraft zur Seite standen.

Thesen

1. Jährlich werden bundesweit etwa 370.000 Hüft- und Knieendoprothesen implantiert, sowie über 60.000 Revisionsoperationen dieser Endoprothesen durchgeführt. Aufgrund des demographischen Wandels ist von steigenden Zahlen sowohl der Primärimplantationen, als auch der Revisionsoperationen auszugehen.
2. Eine schwerwiegende Komplikation dieser Operationen stellt die Implantat-assoziierte Infektion dar, welche sich als Frühinfektion, verzögerte oder Spätinfektion manifestieren kann und zu erheblichen physischen und psychischen Belastungen des Patienten, sowie zu hohen Kosten für das Gesundheitssystem führt.
3. Unmittelbar nach Kontakt mit Implantatoberflächen, beispielsweise von Endoprothesen, findet ein Wettkampf um die Besiedelung der Oberfläche zwischen körpereigenen Zellen und Bakterien statt, das sogenannte „race for the surface“. Der Ausgang des Wettkampfes ist mitbestimmend für eine Integration in das umgebende Gewebe oder eine bakterielle Besiedelung. Vor allem biofilmbildende Staphylokokken wie *S. aureus* und *S. epidermidis* sind hierbei häufig beteiligt.
4. Durch antimikrobiell wirkende Oberflächenbeschichtungen auf Endoprothesen soll die Implantatoberfläche gegen Bakterien geschützt werden, ohne die mechanischen Eigenschaften an sich zu verändern. Eine fehlende Gewebetoxizität ist eine Voraussetzung für antimikrobielle Oberflächenbeschichtungen in der Endoprothetik, da eine feste Integration in den Organismus durch die Beschichtung nicht behindert werden darf. Als antibakteriell wirkende Substanzen können Antiseptika, Antibiotika oder antimikrobiell wirkende Metalle in die Beschichtungen integriert werden.
5. Antiseptika haben bisher in *in vitro* Untersuchungen gute antibakterielle Ergebnisse gezeigt, ausführliche Daten über Toxizität und Gewebeverträglichkeit stehen allerdings noch aus. Antibiotikabeschichtungen werden nach überzeugenden *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen bereits im Rahmen klinischer Studien am Menschen angewandt, jedoch limitieren zunehmende Antibiotika-Resistenzen den breiten prophylaktischen Einsatz. Unter den antimikrobiell wirkenden Metallen haben sich Kupferionen in gewissen Konzentrationen als Substanz mit guten antibakteriellen Eigenschaften bei gleichzeitig geringer Gewebetoxizität *in vitro* erwiesen.
6. Mit einem bestehenden Infektionsmodell nach Lucke et al. (2003a) sollten in der vorliegenden Arbeit diese Eigenschaften *in vivo* überprüft werden, indem *S. aureus* – Kolonien zusammen mit einem Titanpin in den Markraum der Rattentibia eingebracht werden. Nach einem sechswöchigen Beobachtungszeitraum konnten jedoch keine Implantat-assoziierten Infektionen durch *S. aureus* oder *S. epidermidis* sicher ausgelöst und mikrobiologisch, radiologisch oder histologisch nachgewiesen werden.
7. Probleme und mögliche Ursachen dafür lagen sowohl im Versuchsaufbau, als auch in den Analysemethoden. Durch Einblutung in den Bohrkanal nach Eröffnung des Markraumes kam es beim Versuch, den Pin in diesen einzubringen, zu einem Herausfließen der Bakteriensuspension aus dem Kanal. Die definitiv in den Kanal eingebrachte Bakterienmenge

ist somit unbekannt, es ist jedoch davon auszugehen, dass eine Verdünnung durch die Einblutung stattgefunden hat. Des Weiteren ist nicht sichergestellt, dass die eingebrachten Bakterien nach dem Auftauprozess noch vital und vermehrungsfähig waren. Bei der mikrobiologischen Nachweismethodik erwies sich insbesondere das Auflösen des Knochens in einer Kugelmühle, sowie das komplette Entfernen der Knochenmasse aus dem Behälter für analytische Zwecke als problematisch und stellte eine Fehlerquelle in der Analyse der Knochenmasse dar.

8. Die Ergebnisse dieser Versuche veranlassten zu einer Optimierung des primären Versuchsaufbaus, in welcher sowohl das Versuchsdesign, als auch die mikrobiellen Nachweismethoden angepasst wurden. Durch eine Verlagerung der Infektionslokalisierung von intramedullär in die Metaphyse wird eher eine endoprothetische, anstatt osteosynthetische Situation abgebildet. Primäres Ziel war es, die beste einzubringende Erregermenge zu bestimmen, um sicher Implantat-assoziierte Infektionen auszulösen und mit den optimierten mikrobiologischen Nachweismethoden in annähernd 100 % der Fälle nachzuweisen.
9. Es wurde ein kegelförmiges Titan-Implantat entwickelt, welches durch Press-Fit in die Metaphyse der Tibia einzubringen ist und mit dieser kortikal abschließt. Durch einen zentral im Implantat lokalisierten Kanal wird die Bakteriensuspension in das Knochenlager eingebracht und dieser anschließend mit Knochenwachs verschlossen. Durch den festen Abschluss mit dem umgebenden Knochengewebe wird ein Herausfließen der Bakteriensuspension verhindert.
10. Die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit, sowie eine Konzentrationskonstanz der Bakteriensuspension wurden durch neue, parallel zu den Implantationen stattfindende Untersuchungen der Suspension überprüft und gewährleistet. Des Weiteren erfolgte die Analyse der Bakterienkonzentrationen im Knochengewebe durch eine Schüttlerbehandlung (Vortex®-Schüttler) und anschließende Bestimmung der Lebendkeimzahl der so in Lösung gegangener Bakterien, anstelle der Analyse unter Zuhilfenahme der Kugelmühle.
11. Mit diesem metaphysären Modell gelang es, an der Ratte zuverlässig Infektionen auszulösen und mikrobiologisch *S. aureus* – Kolonien sowohl im Knochengewebe, als auch auf der Implantatoberfläche nach sechs Wochen in signifikanten Mengen nachzuweisen.
12. 10^3 KBE erwiesen sich als optimal in den Knochen einzubringende Bakterienmenge, da in 100 % der Fälle Infektionen im Knochen und am Pin ausgelöst und mikrobiologisch nachgewiesen werden konnten. Überschießende Infektionen waren nicht erkennbar. Diese Bakterienkonzentration ließ sich zudem sicher herstellen. Höhere Konzentrationen führten zu überschießenden Reaktionen mit klinisch deutlich erkennbarem Krankheitsbild, Bildung prominenter Weichteilabszesse und Deformationen der Knochenstrukturen, sowie Verlagerung der Implantate aus dem Knochenbett in umgebende Weichteilstrukturen. Eine Verdünnung der Bakteriensuspension auf 10^2 KBE/15µl erwies sich als schwierig und inkonstant.
13. In nachfolgenden Untersuchungen soll überprüft werden, ob die so erzeugten Implantat-assoziierten Infektionen auch bildgebend radiologisch und histologisch darstellbar sind und sich mittels Rasterelektronenmikroskopie eine Biofilmbildung auf beschichteten Implantatoberflächen nachweisen lässt.