Diplomarbeit

Mikrobiologische und mechanische Vergleichsuntersuchungen an PMMA-Zementen nach manueller Antibiotikazumischung

eingereicht von

Michael Alois Eder-Halbedl

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinik für Orthopädie und orthopädische Chirurgie

Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin

unter der Anleitung von

Univ.-Prof. Dr. Klaus-Dieter Kühn

Mag.rer.nat. Dr. Clemens Kittinger

Graz, am 11.12.2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 11.12.2015 *Unterschrift*

Michael Alois Eder-Halbedl eh.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei meiner Diplomarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern. Vielen Dank an Dr. Clemens Kittinger für die umfassende Unterstützung, ständige Erreichbarkeit und Hilfestellungen beim Erstellen dieser Arbeit. Für die Bereitstellung der Versuchszemente und des Versuchslabors sowie für die fachliche Beratung danke ich Univ.-Prof. Dr. Klaus-Dieter Kühn. Herzlichen Dank auch an das Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin sowie an das Laborteam von Dr. Kittinger, die stets hilfsbereit waren und mich bei den Versuchen und Auswertungen unterstützt haben.

Ein herzlicher Dank an meine Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und immer hinter mir standen.

Zuletzt geht mein größter Dank an meine Freundin Andrea, die mich in jeder Phase meines Studiums unterstützt hat, für Fragen stets offen war und immer einen guten Rat für mich hatte.

Inhalt

Glossar und Abkürzungen V
Abbildungsverzeichnis VI
Tabbellenverzeichnis VIII
Zusammenfassung IX
Abstract XI

1 Einleitung 1
2 Protheseninfektionen in der Orthopädie 3

2.1 Prävalenz periprothetischer Infektionen 3
2.2 Pathogenese periprothetischer Infektionen – Biofilm 4
2.3 Erreger periprothetischer Infektionen 7
2.4 Therapie von Implantat assoziierter Infektionen 8

3 Knochenzemente 11

3.1 Bestandteile herkömmlicher PMMA-Knochenzemente 11
3.2 Polymerisationsvorgang 12
3.3 Antibiotikahaltige Knochenzemente 13

3.3.1 Klinische Verwendung von antibiotikahaltigen Knochenzementen 13
3.3.2 Selbstherstellung antibiotikahaltige Knochenzemente 14
3.3.3 Die Wahl des Antibiotikum 16
3.3.4 Die richtige Dosis 18
3.3.5 Mechanische Eigenschaften Antibiotikahaltiger Knochenzemente 18
3.3.6 Die Verwendung mehrerer Antibiotika 19
3.3.7 Resistenzentwicklungen 20
3.3.8 Toxische Wirkung von Antibiotika 21

4 Material und Methoden 22

4.1 Knochenzemente 22
4.2 Herstellung von Formkörper 22

4.2.1 Formkörper 24

4.3 Elutionsversuch 24

4.3.1 Herstellung der Elution 24

4.4 Agardiffusionstest 25

4.4.1 Verwendete Bakterien 26
4.4.2 Durchführung des Agardiffusionstest 26

4.5 Mechanische Testung 27
4.6 Externe Elutionsversuch Labor Deutschland 28

5 Ergebnisse 29

5.1 Manuelle Beimengung von Vancomycin und mögliche Limitationen 29
5.2 Agardiffusionstest 29

5.2.1 Agardiffusionstest 1 Stunde bis 24 Stunden mit Gentamicin und Vancomycin gegen den sensiblen *Staphylococcus aureus* 30
5.2.2 Langzeit Agardiffusionstest mit Gentamicin und Vancomycin gegen den sensiblen *Staphylococcus aureus* 31
5.2.3 Wirksamkeit vonVancomycin gegen verschiedeneklinisch relevante *MRSA*-Stämme 32

5.3 Mechanische Messung 34

5.3.1 Ergebnisse der mechanischen Messung des Biegemodul und Biegefestigkeit nach ISO 5833 34

5.4 Elutionsversuch Labor Deutschland 35

5.4.1 Langzeitfreisetzungsversuch von Gentamicin und Tobramycin 1 bis 28 Tage 35

6 Diskussion 37
Literaturverzeichnis 43

Glossar und Abkürzungen

Agar: Nährboden zur Kultivierung von Mikroorganismen

Agardiffusionstest: Mikrobiologisches Testverfahren um die Diffusion von Reganzien in einem Nährboden zu untersuchen

Biofilm: ist eine Schleimschicht in denen Mikroorganismen (z.B. Bakterien, Pilze, Algen) organisiert vorliegen und bemerkenswerte Wiederstände aufweisen.

Debridement: Wundtoilette, Entfernung von nekrotischem oder infiziertem Gewebe, um Wundheilung zu fördern

Elution: Herauslösen einer Substanz aus dem Knochenzement

Eradikation: vollständige Eliminierung von Krankheitserregern

Hemmhof: durch Antibiotkium verursachte Zone, in der kein Erregerwachstum sichtbar ist

Inkubation: Anzüchtung oder Bebrütung von Zellkulturen oder Bakterien in einem Brutschrank

ISO-5833: Internationale Organisation für Normung, Norm für Knochenzemente auf Acrylbasis

MHK: Minimale Hemmkonzentration

MMA: Methylmethacrylat

MPa: Megapascal, Einheit für Druck

Müller-Hinton-Agar: mikrobiologisches Nährmedium zur Bestimmung von Antibiotika-Resistenzen

N: Newton

PMMA: Polymethylmethacrylat

Spacer: Anstelle einer Prothese implantierter Platzhalter, Interimsprothese

V: Vancomycin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einzelner Entwicklungsstufen des Biofilms 5

Abbildung 2: Verteilung der häufigsten Erreger aus der Therapie von Implantat assoziierter Infektionen 7

Abbildung 3: Anleitung zur zusätzlichen Antibiotika Beimengung zum PMMA-Pulver 16

Abbildung 4: Manuelle Herstellung der antibiotikahaltigen Formkörper 23

Abbildung 5: Formkörper für Biegetestung und Elutionsversuch 24

Abbildung 6: Symbolfoto Formkörper in Pufferlösung 25

Abbildung 7: Inkubierte Agarplatten mit Hemmhöfen 27

Abbildung 8 Mechanische Testung nach ISO 5833:2002 28

Abbildung 9a/b: a: PMMA Zement mit AB-Pulver; b: an der Spitze des Messers des fertigen Formkörper weiße AB-Partikel ersichtlich 29

Abbildung 10: Verlaufswerte der Hemmhofdurchmesser der untersuchten Gentamicin- und Vancomycin-haltigen Zemente bis 24 Stunden. Testbakterium: *Staphylococcus aureus* 30

Abbildung 11: Verlaufskurven der Hemmhofdurchmesser der untersuchten Zemente 1 bis 42 Tage. Testbakterium: *Staphylococcus aureus* .. 31

Abbildung 12: Hemmhofdurchmesser der 24 Stunden Eluate gegen verschiedene MRSA-Stämme 32

Abbildung 13: Werte der Biegefestigkeit, 6 Versuche pro Zement 34

Abbildung 14: Werte der Biegemodule, 6 Versuche pro Zement 35

Abbildung 15: Langzeitfreisetzungsversuch von Gentamicin bestimmt durch HPLC. 36

Abbildung 16: Langzeitfreisetzungsversuch von Vancomycin bestimmt durch HPLC 36

Tabbellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation und Behandlung von Infektionen 8

Tabelle 2 Gewöhnliche Zusammensetzung von Knochenzementen 11

Tabelle 3: In den Tests verwendete Knochenzemente..... 22

Tabelle 4: Resistenzen verschiedener MRSA-Stämme gegen Gentamicin und Vancomycin..... 32

Zusammenfassung

Mit zunehmender Lebenserwartung steigen auch die Anzahl der Hüft- und Knieimplantate sowie die damit verbundenen Risikofaktoren einer Protheseninfektion. Trotz strenger hygienischer Richtlinien ist die periprothetische Infektion eine der bedeutsamsten Komplikationen in der orthopädischen Chirurgie. Die Folgen sind vielfältig und oft mit einem Verlust an Lebensqualität sowie ökonomischen Kosten verbunden. Mithilfe von antibiotikahaltigen Knochenzementen können diese Infektionen prophylaktisch oder gezielt im Rahmen einer chirurgischen Therapie behandelt werden. Die häufigste Maßnahme ist die zweizeitige Revisionsoperation, bei der ein antibiotikahaltiger Spacer zeitweilig im Körper des Patienten implantiert wird. Dadurch können Höchstdosen an Antibiotikum lokal erreicht werden, die der Verhinderung einer Rekolonisation des Keimes dienen.

Das Ziel der Studie bestand darin, mit Antibiotika versetzte Knochenzemente, die industriell oder manuell hergestellt wurden, hinsichtlich ihrer Freisetzung und mechanischen Belastbarkeit zu vergleichen.

Insgesamt wurden vier verschiedene Knochenzemente, die mit dem Antibiotikum Vancomycin versetzt sind, untersucht. Bei zwei Knochenzementen (SmartSet® GHV und Antibiotic Simplex® P mit Tobramycin) wurden 2 g Vancomycin manuell zugemischt, als Referenz dienten zwei handelsübliche Vancomycin haltige PMMA-Zemente, die industriell Vancomycin enthalten (Copal® G+V und VancoGenx®). Dazu wurden Formkörper für den Agardiffusionstest sowie für die mechanische Testung hergestellt. Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden die Formkörper in Pufferlösungen gelagert und die resultierenden Eluate auf Agar-Hinton Platten pipettiert, auf denen sich MRSA- und *Staphylococcus aureus* Keime befanden. Nach 24-stündiger Inkubation wurde der Hemmhofdurchmesser abgelesen und Rückschlüsse auf die Freisetzungskinetik des Antibiotikums gezogen. Ebenso wurde mithilfe des 4-Punkt Biegemoduls der ISO-Norm 5833:2002 die Messung der Biegefestigkeit durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen in der Initialphase bei allen Knochenzementen eine hohe Antibiotikum Freisetzung auf. Bei den Test-Zementen Smartset® GHV und Antibiotic Simplex® P mit Tobramycin sowie dem Referenzprodukt Copal® G+V findet sich bis zum 42. Tag

annähernd vergleichbare Freisetzungen, wohingegen bei der anderen Referenz VancoGenx® ab dem 21. Tag keine Antibiotikamengen mehr freigesetzt werden. Im ISO-Versuch zur Biegefestigkeit zeigt die manuelle Vancomycinzugabe im Vergleich zur industriellen Zugabe von Vancomycin eine Reduzierung von 20% auf.

Industriell hergestellte Zemente sind daher manuell veränderten Zementen vorzuziehen. Allerdings sind bei der Behandlung von multiresistenten Keimen oftmals keine industriellen, mit Antibiotikum versetzten Knochenzemente mit der richtigen Dosis verfügbar. Nur in diesem Fall wird in der Praxis die intraoperative Eigenanfertigung für die Behandlung der Infektion empfohlen.

Abstract

Due to increasing life expectancy, the number of hip and knee protheses and associated risk factors for infections of protheses are growing. In spite of strict hygienic rules, periprothetic infections are one of the most significant complications in orthopaedic surgery. They can lead to variety consequences, such as high economic costs, and a reduction in the quality of life. Antibiotic loaded cement can treat this infection prophylactically, or be used as a targeted therapy in the surgical management. The most popular treatment is the two-staged total hip revision by implanting temporary antibiotic-impregnated interim spacers in the patient´s body. When using this technique, highest concentration of antibiotics can be achieved locally, which can prevent a recolonisation of germs.

The aim of this study was to compare antibiotic loaded cements, which are mixed either industrially or manually, in terms of release and mechanical load. Overall, four different cements with Vancomycin had been tested. Two of the bone cements (SmartSet® and Simplex®) had been manually added with 2 g Vancomycin and two commercial PMMA-cements, which contained industrial Vancomycin (Copal® G+V and VancoGenx®), served as reference. First, PMMA mouds were made for agar diffusion and mechanical testing. For the following microbiological examination, the mouds were embedded in powder, and the resulting eluates were transferred onto Hinton plates that were prepared with *MRSA*- and *staphylococcus aureus* germs. After 24 hours of incubation, the diameters of inhibition areas were measured and conclusions were drawn about the release kinetic behaviour of antibiotics. Furthermore, the measurement on bending strength was done according to the four-point bending modulus of ISO-norm 5833:2002.

The outcomes show a high antibiotic release of all bone cements in the initial period. Especially the experimental cements Smartset® G+V, Antibiotic Simplex® P with Trombomycin and the reference cement Copal® G+V released a comparable amount until day 42, whereas the other reference VancoGenx® did not release any antibiotics after day 21. Considering the ISO-trials for bending strength, the manually added Vancomycin showed a reduction of 20 % when compared to industrial ones.

Therefore, industrial cements should be preferred over manually mixed cements. But for the treatment of multi-resistant germs, it is often the case that no antibiotic loaded bone cements with adequate dosage is available. Only for this case intraoperative in-house production of bone cements are recommended for the treatment of infections.

1 Einleitung

Die Endoprothetik stellt in der heutigen Zeit eine nicht mehr wegzudenkende Maßnahme in der orthopädischen Chirurgie dar. Dabei handelt es sich um einen massiven Eingriff am menschlichen Körper, welcher mit erheblichen Risiken verbunden ist. Trotz perioperativer Antibiotikaprophylaxe und strengen hygienischen Richtlinien ist die Protheseninfektion ein seltenes, aber nicht vermeidbares Ereignis. Somit ist die Protheseninfektion in der Orthopädie auch in der heutigen Zeit eine große medizinische Herausforderung, welche nur durch multidisziplinäre Zusammenarbeit zu bewältigen ist. Die steigende Anzahl der Hüftimplantate und die zusätzliche Multimorbidität lassen vermuten, dass in Zukunft die Infektionsrate weiter steigen wird. Vor allem das erhöhte Alter der Patienten und begleitende internistische Erkrankungen werden zu einer zunehmenden Herausforderung. Die Folgen von Protheseninfektionen sind vielfältig. Sie können über Schmerzen unterschiedlicher Grade, Folgeoperationen bis zu einem dauerhaften Prothesenverlust und einer reduzierten Lebensqualität reichen.

Die wichtigste Hauptkomponente in der heutigen Revisionsoperation ist sowohl die systemische als auch die lokale Antibiotikatherapie. Eine Reihe von Publikationen und Studien bezüglich Therapieoptionen und Infektionsmanagement existieren, jedoch variieren die einzelnen Möglichkeiten der optimalen Therapie mit lokalen Antibiotikadosen stark (1,2).

In der folgenden Studie werden handelsübliche antibiotikahaltige Knochenzemente mit PMMA Zementen nach manueller Antibiotika Beimengung verglichen. Dabei wird untersucht, welchen Einfluss das Zumischen der verschiedenen Antibiotika auf die mechanischen Kenngrößen der Zementmischungen hat, um einschätzen zu können, ob solche Mischungen im zweizeitigen Wechsel als Spacer eingesetzt werden können. Diese selbst hergestellten Interimsprothesen aus Knochenzement verbleiben je nach Operateur 4-6 Wochen im Körper, dienen der lokalen Therapie der Infektion und werden nach Ausheilung der Infektion wieder entfernt.

Solche Spacer können, wenn die Wirkstoffkonzentration zu niedrig ist oder die PMMA Matrix keine gute Wirkstofffreisetzung zulässt, möglicherweise frühzeitig von Keimen rekolonisiert werden.

Ziel der Arbeit war es daher zu evaluieren, ob industriell hergestellte antibiotikahaltige Zemente den Zementen überlegen sind, bei denen manuell Antibiotika zugesetzt wurden. Am Beispiel von Vancomycin wurden daher zwei handelsübliche vancomycinhaltige PMMA-Zemente als Referenz und zwei weitere handelsübliche PMMA Zemente ohne Vancomycinzusatz nach manueller Zugabe von 2 g Vancomycin vergleichend untersucht. Als Parameter diente die mikrobiologische Freisetzung, die Effektivität und die mechanische Stabilität.

Fragestellungen

- Wird eine ausreichende Konzentration an Antibiotika aus der Zementmatrix nach manueller Zumischung von 2 g Vancomycin freigesetzt, um das Bakterienwachstum bestimmter Leitkeime zu hemmen?

- Wie lange wird das manuell zugemischte Vancomycin noch in wirksamen Konzentrationen freigesetzt und wie ist der Verlauf der Freisetzung über die Zeit (temporale Freisetzungsverlauf)?

- Welchen Einfluss hat das Zumischen von 2 g Vancomycin auf die mechanischen Kenngrößen der PMMA Zementmischungen zur Einschätzung, ob solche Mischungen im zweizeitigen Wechsel als Spacer eingesetzt werden können?

2 Protheseninfektionen in der Orthopädie

Bakteriell verursachte Protheseninfektionen stellen schwerwiegende Komplikationen in der orthopädischen Chirurgie dar. Sie sind nur durch eine Revisionsoperation mit einem radikalen Debridement des Wundbettes sowie begleitender systemischer aber auch lokaler Antibiotikatherapie behandelbar (3).

2.1 Prävalenz periprothetischer Infektionen

Prostheseninfektionen in der orthopädischen Chirurgie sind seltene, aber nicht vermeidbare Ereignisse und stellen den behandelnden Chirurgen vor einer enormen medizinischen Herausforderung. Trotz strengen hygienisch-antibakteriellen Richtlinien, prophylaktischer Antibiotikagabe sowie die Verwendung von Laminar-Airflow ist die Prävalenz weiterhin hoch (4). In Deutschland werden jährlich über 170.000 Hüftprothesen. Davon treten postoperative Infektionen in 1-2% der primären und bis zu 5% in der Revisionsoperation auf, was bedeutet, dass jährlich 1.000 – 2.500 Personen an einen Infekt erkranken (5). Ökonomisch bedeutet das pro septischen TEP-Wechsel ca. 40.000 – 50.000 Euro, wobei der größte Kostenanteil durch Verdienstausfall des Patienten, den teuren Revisionsoperationen und langandauernden Antibiotikatherapien verursacht wird (6).

Auch die Anzahl der gesamten primären Knietotalendoprothesen hat weiter zugenommen. Gleichzeitig erhöht sich die Häufigkeit der Gelenkinfektionen, wobei die Inzidenz zwischen 1-4 % variiert (7).

2.2 Pathogenese periprothetischer Infektionen – Biofilm

Biofilme gelten als bemerkenswerte Lebensgemeinschaften, in der ein oder mehrere mikrobiologische Keime miteinander verbunden sind. Als Zellverbände organisiert, liegen sie ummantelt in einer selbstproduzierten Matrix vor. Die Bestandteile der Biofilm-Matrix sind exopolymere Substanzen (Exopolysaccharide), Proteine, Teichonsäure, Lipide und extrazelluläre DNA. Antibiotika weisen eine mangelnde Wirksamkeit gegen Keime im Biofilme auf, weil die antiinfektiven Substanzen die Biofilme nicht vollständig durchdringen können und die darin befindlichen Bakterien mit veränderten Stoffwechseleigenschaften weniger empfindlich sind. Dem zufolge sind Eigenschaften, wie die Existenz langsam- oder nicht-wachsender Zellen innerhalb eines Biofilms, die Anwesenheit einer bakteriellen Subpopulation mit unterschiedlichen phänotypischen Resistenzgraden und die Überexpression von Genen und Stressreaktionen gegen feindliche Umweltbedingungen für die Resistenzentstehung bei Biofilmen zu beobachten (8).

Die Herkunft pathogener Keime entspricht einer vielseitigen Natur. Einerseits kann eine Übertragung aerogen im Operationssaal, über die OP-Ausrüstung, Kleidung des Personals und Bakterien der Hautflora erfolgen; andererseits kann dieser auch bereits im Körper des Patienten vorliegen (9).

Grundsätzlich können Infektionen während einer Operation durch die direkte Kontamination erfolgen, jedoch sind die meisten Infektionen nicht chirurgischen Ursprungs (10). Dabei werden die hämatogenen Streuungen der Mikroorganismen als häufigste Ursache angesehen. In diesem Fall transportiert das Blut die pathogenen Mikroorganismen von anderen Infektionsherden wie Entzündungen des Zahnfleischs oder der Harnwege, einfachen Kratzern und Schnitten der Haut zum Implantat, was zu Spätinfektionen führt (3).

Die Biofilm Entstehung auf einem orthopädischen Implantat kann in 4 Prozesse eingeteilt werden (Abbildung 1).

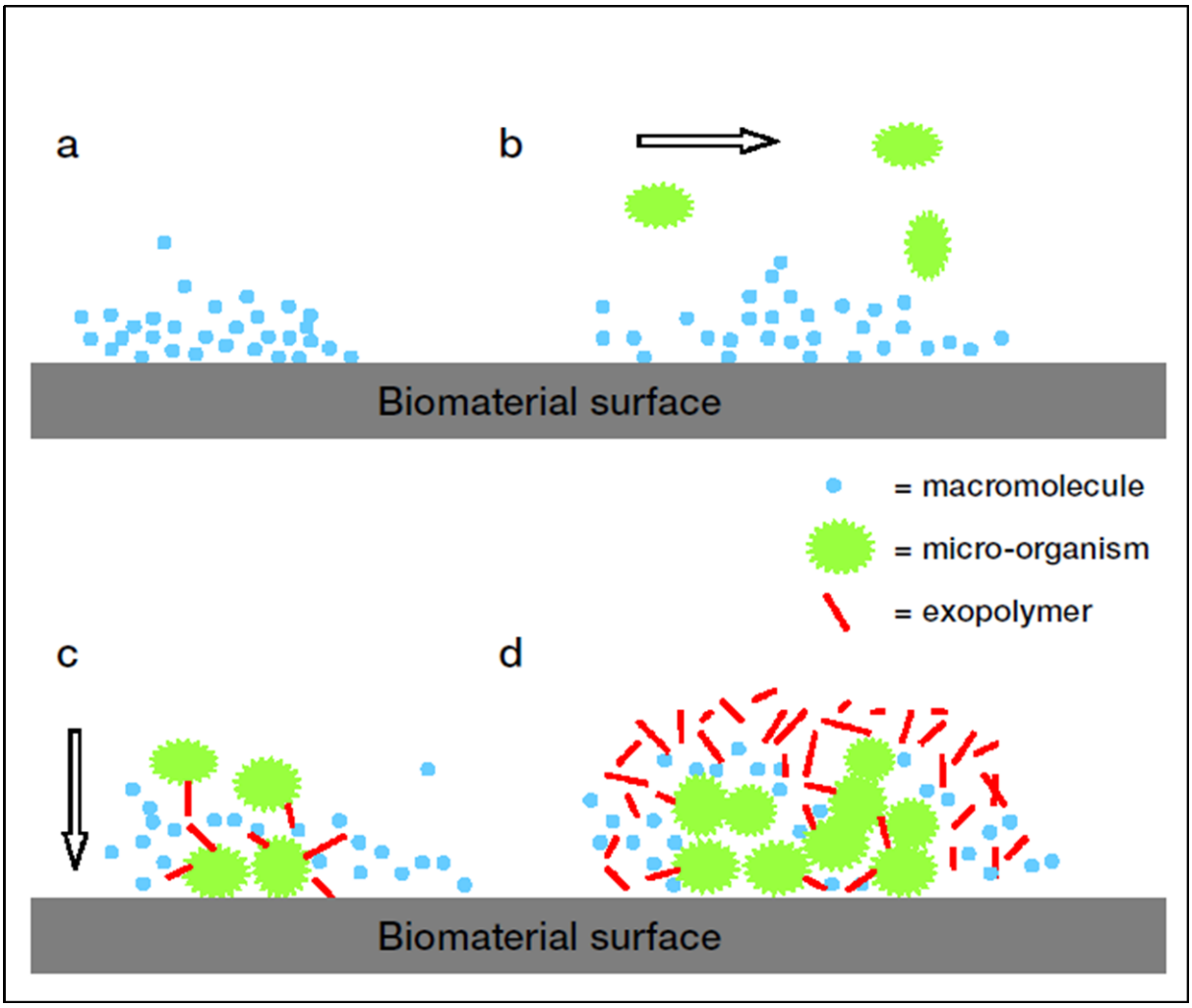


Abbildung 1: Schematische Darstellung einzelner Entwicklungsstufen des Biofilms (3,65).

a. Bildung eines Films
b. Anhäufung von Mikroorganismen
c. Beginnende Anbindung und Verwachsung von Mikroorganismen durch Exopolymere
d. Wachstum der verwachsenen Mikroorganismen

Die aus dem umliegenden Gewebe stammenden Makromoleküle bilden die erste Schicht, einen sogenannten „Conditioning film“. Dieser Prozess läuft innerhalb weniger Sekunden bis sechs Stunden postoperativ ab. Entscheidend für die Vermeidung der Filmbildung ist, dass das umliegende körperliche Gewebe sich zuerst an der Oberfläche des Biomaterials anhaftet und die erste Schicht bildet, bevor es zu einer bakteriellen Anhaftung kommt.

Andernfalls ist das Immunsystem nicht mehr in der Lage, die Keim-Kolonisation zu verhindern und es bildet sich in weiterer Folge ein bakterieller Biofilmaus (9). Orthopädische Biomaterialien wie PMMA-Zementeschließen meist an knöcherne Strukturen an und gelangen dadurch in direktem Kontakt mit Blut. Folglich können Plasmaproteine aus dem Blut rasch einen dünnen Film bilden. Diese geschaffene Oberfläche verbessert die bakterielle Besiedelung durch Wechselwirkungen zwischen bakteriellen Proteinen und Wirtsproteinen und es kommt zu einer sogenannten hämatogenen Infektion (3,8).

Nur in seltenen Fällen gelingt die direkte Anhaftung von Bakterien an die Implantat-Oberfläche (Abbildung 1a). Durch verschiedene Transportmechanismen wie Diffusion, Konvektion und Sedimentation gelangen die Mikroorganismen auf die Oberfläche. Es folgt eine Bildung von mehrschichtigen Zelllagen, sowie Zelladhäsionen überlagert durch Mikrokolonien. Schließlich wird die organisierte Struktur von einer extrazellulären Matrix umgeben (8). Die anfänglichen Anhaftungen sind unter Umständen reversibel und in Abhängigkeit von verschiedensten Faktoren wie physikochemischen Eigenschaften der mikrobiellen Zelloberfläche, die Biomaterial-Oberfläche und die biologische Umgebungsflüssigkeit zu betrachten (Abbildung 1b).

Irreversibel wird es jedoch bei Ausbildung von extrazellulären polymeren Substanzen, wodurch feste Verankerungen mit Mikroorganismen entstehen und ein Biofilm resultiert (Abbildung1c).

Dieser Biofilm, eingebettet in extrazellulärer Substanz, bildet die Glykokalix, welche eine Resistenz gegen Antibiotika und umweltbezogenen Aspekte besitzt. Weiteres führen Co-Adhäsionen anderer Erreger zu Zellschichtanhäufung, die ein zusätzliches Wachstum bewirken. Zuletzt kann sich der gebildete Biofilmtrennen oder lösen. Dieses Szenario spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von septischen Prozessen (3,8) (Abbildung 1d).

2.3 Erreger periprothetischer Infektionen

Im Rahmen periprothetischer Infektionen können eine Reihe verschiedener Erreger auftreten. Den größten Anteil nehmen gram-positive *Staphylokokken* ein, wobei seit 1980 der *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* für 60% der Infektionen in der Hüftendoprothetik verantwortlich sind. Infektionen, verursacht durch den *S. aureus*, verlaufen meist schneller und schwerwiegender als durch *S. epidermidis*. Eine besonders günstige Lage verschafft sich der Keim *S. epidermidis*, welcher auf der Hautoberfläche vorzufinden ist. Auch die verschiedenen physikalischen und chemischen Oberflächeneigenschaften der Materialien sind für den Keim relevant. So findet sich der *S. epidermidis* häufig bei Infektionen mit Polymer-Materialien, wohingegen *S. aureus* meistens für Infektionen von metallischen Implantaten oder bei abgestorbenen Knochen verantwortlich ist (3,11).

Zusätzlich können auch noch gram-negative Keime wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, jene der Proteus Gruppe (*Proteus mirabilis* und *Proteus vulgaris*) sowie viele andere Erreger Infektionen hervorrufen (9).

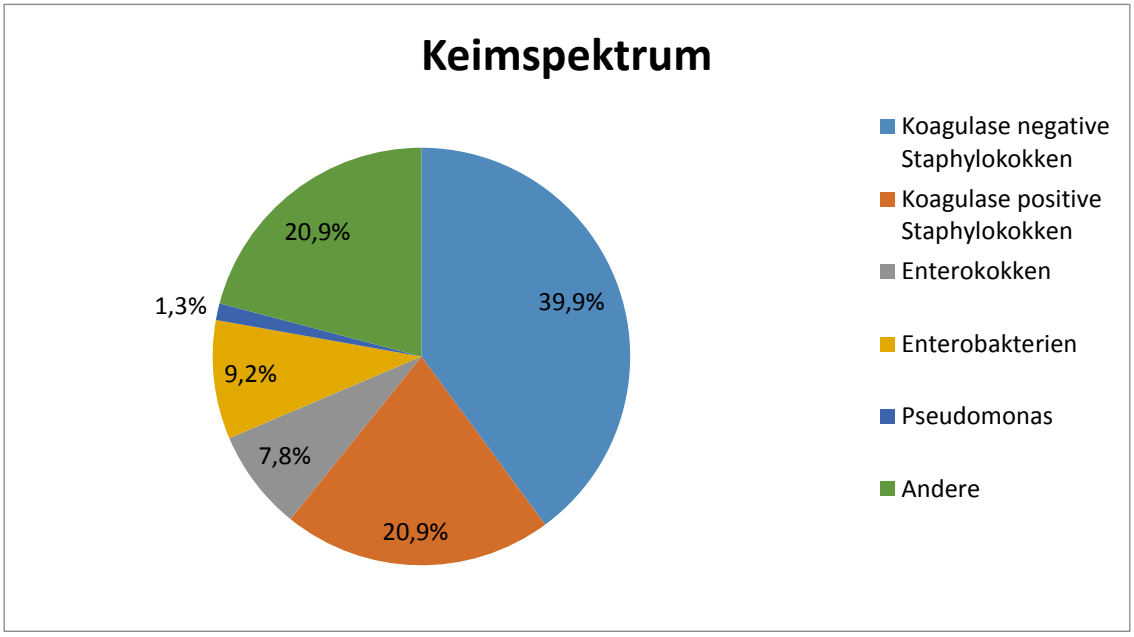


Abbildung 2: Verteilung der häufigsten Erreger aus der Therapie von Implantat assoziierter Infektionen (Grisold 2012, Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin Medizinische Universität Graz) (12)

2.4 Therapie von Implantat assoziierter Infektionen

Grundlage für eine erfolgreiche Revisionsoperation und geeigneten Antibiose ist die mikrobiologische Bestimmung des Bakteriums, welches für den jeweiligen Infekt verantwortlich ist (13).

Das Ziel der Behandlung periprothetischer Infektionen besteht nicht nur in der Eradikation des Keimes, sondern auch in der Reduzierung der Infektionsdauer, der Erreichung eines schmerzfreien Intervalls sowie den Erhalt eines funktionstüchtigen Gelenkes. Um diese Ziel zu erreichen, ist eine Kombination aus chirurgischer Intervention mit begleitender antimikrobieller Therapie notwendig (13).

Verschiedene Methoden können zum Management der Protheseninfektion eingesetzt werden, wobei diese vom jeweiligen Infektionszeitpunkt abhängig sind.

Klassifikation und Behandlung von Infektionen einer Hüft- oder Knie-Totalendoprothese			
Typ	**Präsentation**	**Definition**	**Behandlung**
1	Akute postoperative Infektion	Akute Infektion innerhalb 4 Wochen nach der Operation	Debridement mit Belassen der Prothese, intravenöse Antibiotikatherapie
2	Späte chronische Infektion	Chronische schmerzfreie Infektion, $\geq$ 4 Wochen nach der Operation	Zweizeitige Revision
3	Akute hämatogene Infektion	Akutes Einsetzen einer Infektion im Rahmen eines früheren gut funktionierenden Gelenkswechsel	Debridement mit Belassen der Prothese, intravenöse Antibiotika
4	Positive intraoperative Kultur	$\geq$ 2 positive intraoperative Kulturen	Einen entsprechenden Antibiotika Verlauf

Tabelle 1: Klassifikation und Behandlung von Infektionen (14)

Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen, kann eine Prothese im Körper beibehalten bleiben, sofern die Implantat-Infektion innerhalb von vier Wochen postoperativ aufgetreten ist. Spätinfektionen (> 4 Wochen postoperativ) können hingegen nur durcheinen Prothesenwechsel erfolgreich behandelt werden (7).

In Hinblick eines Prothesenwechsels ist zwischen einem ein- und zweizeitigem Wechsel zu unterscheiden. Der Vorteil eines einzeitigem Prothesenwechsels liegt darin, die Ex- und Implantation der Prothese sowie die Sanierung des Wundbetts und die Entfernung nekrotischer, fibröser Beläge in einer Operation zu vereinbaren. Nachteile finden sich jedoch in einem nur einmaligen Debridement des Wundbettes und im Fehlen einer implantatfreien Zeit. Der zweizeitige Wechsel gilt hingegen als Goldstandard in der Therapie periprothetischer Infektionen. Angewandt wird dieses Verfahren sogar auch bei fehlender Identität des Keimes, bei Chronifizierung und Nicht-Durchführbarkeit der einzeitigen Methode. Zudem ist die Durchführung eines zweimaligen chirurgischen Debridement in Kombination mit einer Antibiotikatherapie positiv hervorzuheben (15-18). Ein wesentlicher Faktor für den Erfolg einer Revision sowohl bei einzeitigem als auch bei zweizeitigem Wechsel ist die begleitende lokal-hohe antibiotische Therapie. Im Rahmen des zweizeitigen Wechsels wird nach Entfernung des Implantats ein Spacer (=Platzhalter) eingesetzt, welcher je nach Schwere der Infektion 6 bis 12 Wochen im ehemaligen Prothesenlager verweilt (19). Die Aufgabe des Spacers besteht darin, als Interimsprothese eine lokal hohe Antibiotikamenge freizusetzen sowie die Weichteilspannung aufrechtzuerhalten, um Kontrakturen bis zur Reimplantation zu verhindern (18). Einige Autoren konnten mit Hilfe der zweizeitigen Wechselstrategie Erfolgsraten von über 90% Infektionsfreiheit nachweisen (20,21). Im Rahmen des zweizeitigen Wechsels ist es auch möglich, eine Girdlestone-Situation zu belassen, bei dem kein Gelenksersatz implantiert wird (19).

Je nach Defektsituation und Knochenqualität stehen unterschiedliche Spacerarten zur Verfügung, wobei zwischen Monoblockspacer, zweiteilige Spacer, vorgefertigte Spacer und intraoperativ angepasste Spacer differenziert werden kann.

Der Nachteil von Monoblockspacern ist der Spacerbruch und die Knochenresorption, wohingegen der Knochenabrieb als Schwäche des zweiteiligen Spacer anzusehen ist. Zur Prophylaxe von Spacerbrüchen ist deswegen die zweiteilige Variante vorzuziehen. Dabei wird ein mit Antibiotikum versetzter Zement klumpenförmig in das Acetabulum als Interimspfanne eingesetzt. Zusätzlich wird schaftseitig ebenfalls eine selbst geformte bzw. mit Antibiotikazement ummantelte Monoblockprothese implantiert, wobei eine Verbindung durch einen Metallkopf hergestellt wird. Die durch die Spacerexplantation und Implantat Wiedereinbau gewonnene Synovialis kann Zirkoniumdioxidpartikel enthalten, welche Abriebprodukte eines zirkonhaltigen Zementes oder einer zirkonhaltigen metallischen Prothese sind. Diese können eventuell zu Weichteilschäden, Dreikörperverschleiß sowie zu einer verkürzten Lebensdauer des Neuimplantates nach einem zweizeitigen Prothesenwechsel führen. Als weitere Therapiemöglichkeiten gilt die Einbringung von Antibiotika-Ketten oder Kollagenschwämmen (16,19).

3 Knochenzemente

Polymethylmethacrylat (PMMA) Knochenzemente sind thermoplastische polymerisierende Kunststoffe, die bereits seit einem halben Jahrhundert als erfolgreiche Verankerungssysteme zum Einsatz kommen. Es handelt sich dabei um einen glasartigen, festen und harten Stoff, der durch den Chemiker Otto Röhm im Jahr 1902 bekannt wurde und heute unter den Namen Plexiglas® vertreten ist (22).

Anfangs dienten die Zemente der Zahnheilkunde (1941) und erst wenig später (1946) wurde sie in der orthopädischen Chirurgie eingesetzt. So waren es Scales&Herschell und die Brüder Judet, die für die Behandlung der Coxarthrose eine PMMA Endoprothese produzierten. 1960 stabilisierte Charnley erstmals einen zuvor implantierten Metallhüftkopf. Im selben Jahr berichteten Buchholz und Engelbrecht über die Antibiotikaeinbringung in Knochenzementen und die damit massive Reduzierung von Infekten in der Hüftendoprothetik. Somit konnten lokale Höchstdosenerreicht werden, die mit einer systemischen Therapie bislang nicht möglich waren (23).

3.1 Bestandteile herkömmlicher PMMA-Knochenzemente

Knochenzemente bestehen grundsätzlich aus zwei Komponenten; einer Pulverkomponente und einer flüssigen Komponente.

Pulver 40g		**Flüssigkeit 20 ml**	
Polymethylmethacrylat	90 % w/w	Methylmethacrylat	98 % w/w
Röntgenkontrastmittel	9 % w/w	N-N Dimethyl-p-toluidin	2 % w/w
Benzoylperoxid	1 % w/w	Hydrochinon	25–100 ppm

Tabelle 2: Gewöhnliche Zusammensetzung von Knochenzementen (24)

Die Polymerkomponente enthält entweder PMMA oder MMA Copolymere oder eine Mischung aus beiden.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist die Aktivatorsubstanz Benzoylperoxid. Um zusätzlich als Röntgenkontrastmittel zu wirken, werden dem Knochenzement Zirkondioxid oder Bariumsulfat zugesetzt. Diese Bestandteile liegen gleichmäßig verteilt in der Polymermatrix vor. Nachteile könnten hierzu die toxische Freisetzung von Bariumionen oder bei lockeren Prothesen der gesteigerte Zementabrieb bei Zirkondioxid, welcher in weiterer Folge in den Gelenkszwischenraum gelangt, darstellen (22).

In der flüssigen Komponente befindet sich als Hauptbestandteil des Monomers MMA (Methylmethacrylat) bzw. Butylmethacrylat. Als Aktivator dient dabei ein aromatisches Amin wie z.B. N,N-Dimethyl-ptoluidin. Zusätzlich kann die flüssige Komponente einen Farbstoff (zB. Chlorophyll) enthalten. Um eine vorzeitige Polymerisation durch Licht oder Wärme zu verhindern wird Hydrochinon als Stabilisatorzugesetzt. Durch das Zusammenmischen beider Komponenten entsteht eine Redoxreaktion, wobei Benzoylperoxid als Initiator und Dimethyl-ptoluidin als Aktivator tätig sind (22).

3.2 Polymerisationsvorgang

Bereits bei Raumtemperatur werden durch den Redoxprozess Radikale erzeugt, welche die Polymerisation in Gang setzen. In der Anfangsphase des Vermischens ist die Masse noch zähflüssig, später teigig und verformbar bis diese (Masse) schließlich aushärtet. Dieser Aushärteprozess dauert in der Regel 8-10 Minuten und ist extrem temperaturabhängig. Am Ende dieses Prozesses entsteht eine große Anzahl an Polymerketten (22). Der Polymerisationsvorgang ist eine exothermische Reaktion, welche durch die zunehmende Teigviskosität die Temperatur ansteigen lässt. Der maximale Temperaturanstieg kann bei 80-90°C im Zement liegen. Diese kurzzeitigen Temperaturspitzen wurden lange Zeit als Ursache für aseptische Prothesenlockerungen durch Hitzenekrosen assoziiert(25). Klinische Untersuchungen zeigten jedoch erheblich niedrigere intraoperative Temperaturmaxima von 40-46°C im Grenzschichtbereich zwischen Knochen und Zement (22).

3.3 Antibiotikahaltige Knochenzemente

In antibiotikahaltigen Knochenzementen werden spezifische Antibiotika wie beispielsweise Vancomycin, Gentamycin oder Tobramycin direkt mit dem Zement vermengt und im Zuge der primären Fixation einer Prothese oder einer Revisionsoperation verwendet (26). Knochenzemente fungieren dabei als Trägermatrix und können als Verhinderungsstrategie in einer Infektion zur Prophylaxe eingesetzt werden. Es darf aber nicht nur auf die Freisetzungskinetik der Antibiotika ein Augenmerk gelegt werden, sondern es handelt sich um ein multifaktorielles Verfahren (18). Jedes Verfahren, dass die mögliche Anhaftung und bakterielle Besiedelung reduziert, ist ein willkommener Faktor in der Orthopädie. Entscheidend ist aber, dass der aus der Matrix freigesetzte Wirkstoff deutlich über der minimalen Hemmkonzentration für relevante Keime liegen muss, um die bakterizide Wirkung zu erfüllen und die Anlegung eines Biofilms zu verhindern (12,22).

3.3.1 Klinische Verwendung von antibiotikahaltigen Knochenzementen

Wie bereits im Punkt 3.3 erwähnt, werden antibiotikahaltige Knochenzemente auch zur Prophylaxe gegen Protheseninfektionen eingesetzt oder aber im Rahmen therapeutischer Behandlungenbei Wechseloperationen verwendet.
Jiranek et al. (2006) sprechen sich jedoch gegen deren primären Verwendung aus mit der Begründung, dass antibiotikahaltige Knochenzemente mit verringerten mechanischen Eigenschaften assoziiert sind (27). Aus diesem Grund wird die primäre therapeutische Intervention von antibiotika-beladenen Knochenzementen genauestens überprüft und diese nur bei folgenden Patientengruppen von einigen Autoren empfohlen: Patienten im höherem Lebensalter, Patienten mit allgemein gesundheitlichen Beschwerden wie Immunschwäche oder Diabetes Mellitus, Patienten mit einer prothetischen oder periprothetischen Infektions-Vorgeschichte, an Rheumatoider Arthritis oder Systemischer Lupus Erythematodes Erkrankten sowie an Mangelernährung Leidenden (3,28,29).

3.3.2 Selbstherstellung antibiotikahaltige Knochenzemente

Das Herstellungsverfahren kann einen wesentlichen Einfluss auf den Effekt der Antibiotikafreisetzung sowie der mechanischen Stabilität haben. Haftungsrechtlich ist im Falle einer manuellen Herstellung stets der Operateur Hersteller im Sinne des Gesetzes, weil er durch die Antibiotika-Zumischung das zugelassene Medizinprodukt nachhaltig verändert.

Hinsichtlich der Zumischung des Antibiotikums zum Zement ist zwischen einer industriellen und einer durch den Chirurgen intraoperativ manuellen Mischung zu unterscheiden (30,31). Grundsätzlich sollte das Antibiotikum in Pulverform vorliegen, um eine bestmögliche Zusammenführung mit dem Zement zu erzielen und in weiterer Folge eine homogene Substanz zu schaffen. Zudem müssen alle Substanzen inkl. AB-Pulver steril sein.

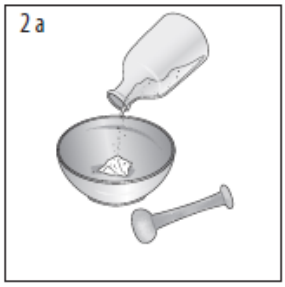
In der folgenden Abbildung 3 wird die manuelle AB-Beimengung veranschaulicht. Im ersten Schritt des Herstellungsprozesses wird das sterile AB-Pulver in eine zuvor steril bereitgestellte Schale transferiert und mithilfe eines Spatels gründlich zerkleinert. Danach wird dieselbe Menge PMMA Pulver hinzugefügt und miteinander vermischt. Anschließend gilt es, dieselbe Menge wie in der Schüssel an PMMA Pulver hinzuzufügen und wieder gründlich zu vermengen. Dieser Vorgang wiederholt sich so oft, bis das gesamte Zementpulver untergemischt ist. Zusammen mit der Monomerflüssigkeit wird das entsprechende Polymerpulver angemischt. Dieser Prozess gewährleistet eine maximale Homogenität (32). Die Mixtur kann durch eine erhöhte Mikroporosität eine verbesserte Freisetzung aufweisen. Zu hohe Porosität dagegen schwächt die Struktur des Zementes (18).
Nicht außer Acht zu lassen ist der exothermische Polimerisationsprozess, bei dem Temperaturspitzen von bis zu 60-80°C im Knochenzement erreicht werden können. Deshalb sollte das zugemischte Antibiotikum chemisch und thermisch stabil sein, um seinen antimikrobiellen Effekt zu gewährleisten (12,33). Manuelle Zumischung antiinfektiver Substanzen zu PMMA Zementen sind aber immer dann induziert, wenn industriell AB beladenen Zementen nicht zur Verfügung stehenden oder bei Behandlung von Knocheninfektion (32,34).

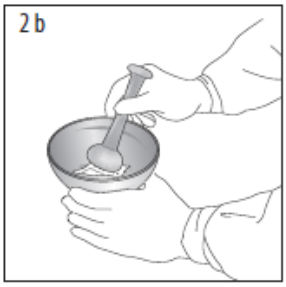
Zumischen von zusätzlichen Antibiotika zu Knochenzementen

1. Bereitstellung

Auf einem Steriltisch werden ein Mörser mit Stößel und das Polymerpulver vorbereitet. Die zur Zugabe geplanten Antibiotika werden bereitgehalten.

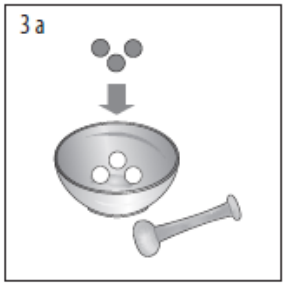
2. Vorbereiten der körnigen Antibiotika

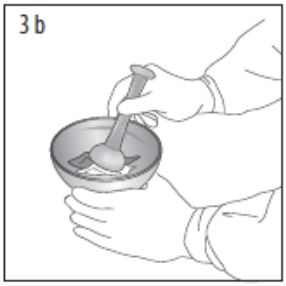




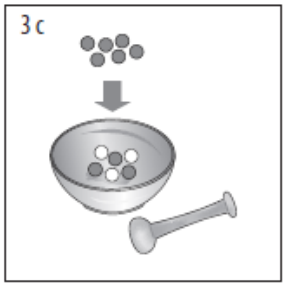
Körnige/lyophilisierte Antibiotika werden von außen durch eine Zweitperson in den sterilen Mörser geschüttet und zu feinem Pulver zerrieben.

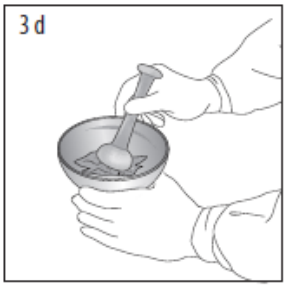
3. Schrittweise Zumengung von Polymerpulver





Die gleiche Menge Polymerpulver (grau) wird zum Antibiotikapulver (weiß) gegeben und mit dem Stößel gleichmäßig vermischt.





Gleiche Menge PMMA-Zement zu der bereits vorgelegten Antibiotika-Zement-Mischung zugeben und mit dem Stößel gleichmäßig vermischen.

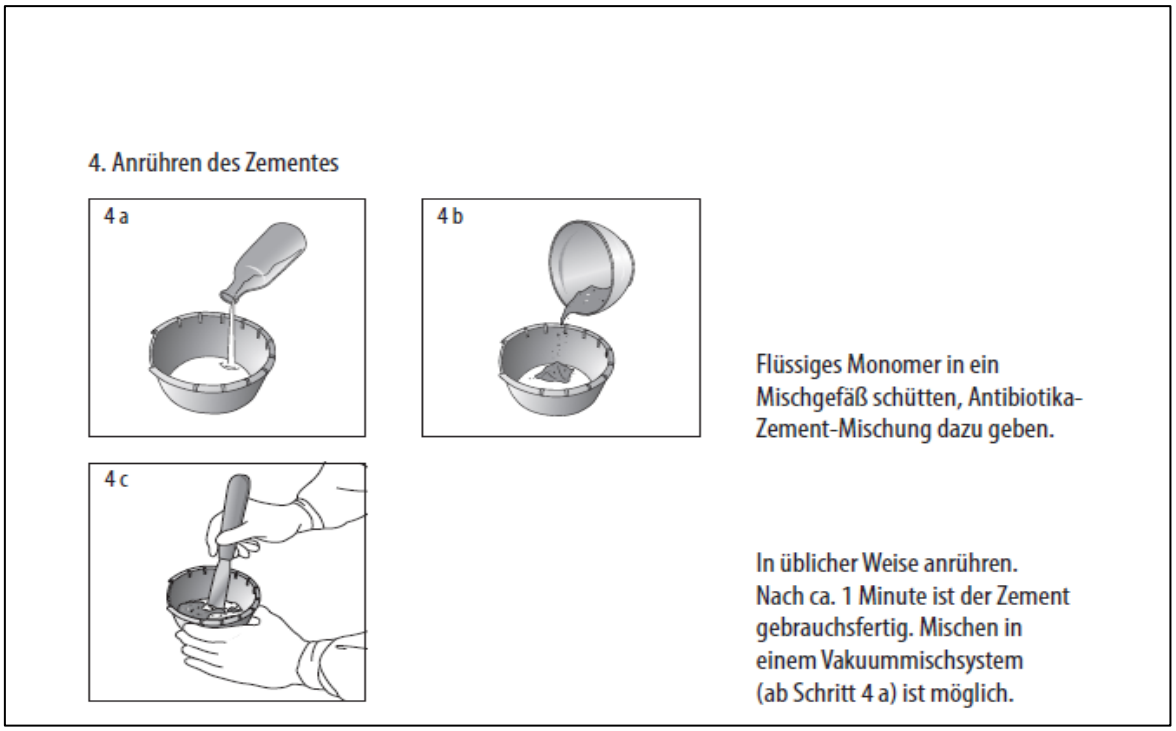


Abbildung 3: Anleitung zur zusätzlichen Antibiotika Beimengung zum PMMA-Pulver (12)

3.3.3 Die Wahl des Antibiotikum

Die im Biofilmen befindlichen Bakterien bilden relativ schnell eine schützende Schleimschicht und reduzieren folglich ihren Stoffwechselhaushalt auf das Minimalste. Daraus resultierend reduziert sich Sensitivität der Antibiotika signifikant, weshalb höhere Antibiotikamengen erforderlich sind, um eine Schädigung der Bakterien zu erreichen (12). Weiteres ist der Erfolg, von der pharmakokinetischen Freisetzungspotenz des jeweiligen Antibiotikums abhängig. Das verwendete Antibiotikum muss in diesem Kontext in der Lage sein, die Empfindlichkeitsgrenze der Erreger zu durchbrechen. In der Chirurgie wird eine Vielzahl von Antibiotika angeboten, jedoch nur wenige erweisen sich als geeignet. Diese sollten folgende Eigenschaften aufweisen:

- Wasserlöslichkeit
- sterilisierbar durch Gamma-Bestrahlung oder Begasung mit Ehylenoxid
- ohne oder mit geringem Einfluss auf die mechanische Stabilität des Knochenzementes

- gute Freisetzung auf dem gehärteten Knochenzement
- haltbar während der Lagerung des fertigen Zementpulvers bis zur Verwendung
- chemische und thermische Stabilität (3,12,35,36)

Zusätzlich zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften sollten auch folgende biologischen Faktoren beinhalten (12):

- breites antibakterielles Wirkspektrum inkl. gram positive und gram negative Bakterien
- eine ausreichende bakterizide Wirkung
- eine geringe Resistenzrate
- geringe Anzahl primärer Resistenzen
- ein geringes Sensibilisierungspotential
- geringe Proteinbindung
- geringes allergisches Potential
- gute Knochendurchdringung
- Zelldurchdringung (3,12,35,36)

Das am häufigsten verwendete Antibiotikum im Knochenzement ist das Aminoglykosid Gentamicin. Es besitzt ein breites antibakterielles Spektrum sowie gute physikochemischen Eigenschaften. Ein Nachteil besteht jedoch im nephrotoxischen und ototoxischen Potential, dass aber im Bereich der Totalendoprothetik aufgrund des postoperativ niedrigen Serumspiegels außer Acht gelassen werden kann (12).

Ebenso zur Gruppe der Aminoglykoside gehört das Antibiotikum Tobramycin welches gleichfalls gegen gram-negative Bakterienstämme wirkt (18). Wie Gentamicin kann auch Tobramycin wegen seiner hohen Hydrophilie nicht oral, sondern nur lokal oder parenteral verabreicht werden. In der Infektionsbekämpfung gegen MRSA nimmt Vanocmycin eine zentrale Bedeutung ein. Es wirkt über die Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese und gilt nach wie vor als Reserveantibiotikum gegen multiresistente gram-positive Erreger wie zum Beispiel *Staphylokokken* (v.a. *methicilin-resistenter Staphylococcus aureus* – MRSA).

Aufgrund der schlechten Knochengängigkeit gelangt nur unzureichend Vancomycin an den Infektionsort, weshalb sich eine lokale Antibiotikum-Verabreichung empfiehlt.

3.3.4 Die richtige Dosis

Die Dosis von Antibiotika variiert je nach Verwendungszweck des Knochenzementes, wobei zwischen einem geringen- und hochdosierten Antibiotikazusatz differenziert wird. Für die prophylaktische Fixation einer Primärimplantation sollten pro 40 g Zement weniger als 2g Antibiotika eingesetzt werden. Bei Implantat-assoziierten Infekten empfehlen Wissenschaftler und Experten jedoch eine hochdosierte Behandlung. Das Minimum sollte hier bei 2g liegen und kann auf 6-8g pro 40g Zement erhöht werden (3,26,27,35).

3.3.5 Mechanische Eigenschaften Antibiotikahaltiger Knochenzemente

Die Hauptaufgabe des Knochenzementes liegt darin, die Kraftübertragung vom Implantat zum Knochen und umgekehrt sicherzustellen. Wesentlicher Faktor ist dabei eine adäquate Verzahnung zwischen Zement und Knochen zu schaffen, um eine Langzeitstabilität des Implantats zu gewährleisten (37).

Durch die Vermengung von Antibiotika und Zement kann es zu einer verminderten mechanischen Stabilität und in weiterer Folge zu einer Schwächung der Strukturkommen. Grund dafür ist, dass die Antibiotikapartikel nicht in der Polymermatrix eingebaut werden und somit als Fremdkörper im Zement vorliegen (12,38). In der industriellen Fertigung liegt der Antibiotikagehalt jedoch relativ niedrig und beträgt zwischen 1,25 – 2,5 Gewichtsprozent. Die Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften ist jedoch so gering und daher im klinischen Setting zu vernachlässigen. Wohingegen die Mischung des Antibiotikums mit dem Knochenzementpulver durch den Chirurgen als kritisch zu betrachten ist. Im Vergleich zu industriell hergestelltem AB-Zement kann die Selbstherstellung zu Inhomogenität der Mischung sowie schlechten mechanischen Eigenschaften führen (38).

Erfahrungsberichte aus der Endo Prothetik Klinik aus Hamburg empfehlen daher eine 10% Beimengungsregel. Das heißt eine maximale AB-Beimengung von 10% zu 40g Polymerpulver (39).

Die Gesamtbelastung der Zementschicht setzt sich aus Druckbelastungen sowie Biege-, Torsions- und Scherkräften zusammen. Eine in vitro Simulation dieser Kombinationskräfte ist im Labor äußerst schwierig .Als standardisierten Test für Knochenzemente wird die ISO-Norm 5833 aus dem Jahr 2002 verwendet, welche zwei mechanische Tests beinhaltet. Darunter fallen der Kompressions- und Vier-Punkt-Biegetest, welche die Kompressionskraft, Biegekraft und das Biegemodul veranschaulichen (12).

3.3.6 Die Verwendung mehrerer Antibiotika

Die Idee, mehr als nur ein Antibiotikum einzusetzen, entstand nach erstmaligem Auftreten resistenter Bakterien und einer möglichen synergistischen Kombination zweier Antibiotika. Bereits seit den 1970 Jahren ist bekannt, dass ß-Laktam Antibiotika mit Aminoglykosiden kombiniert werden können (18).

Theoretisch betrachtet, hat die Vancomycin-Gentamicin Kombination einen dreifachen Vorteil:

1.) eine synergistische Wirkung zwischen Vancomycin und Gentamicin gegen gram-positive Bakterien
2.) eine verbesserte Antibiotikum-Elution aus dem Spacer
3.) ein durch Antibiotika-Kombination reduziertes Bakterienwachstum auf Spaceroberflächen und damit verbundene Heilungsförderung (40)

Im Rahmen eines in vitro Versuches wurden Antibiotika Kombination gegen die häufigsten spezifischen Bakterien (*S. aureus, S. epidermidis, Enterococcus faecalis* und *MRSA)* in einem Spacer untersucht. Dabei wurde der Palacos-R Zement mit drei verschiedenen Antibiotika (Gentamicin, Vancomycin und Teicoplanin), welche entweder alleine oder in Kombination (Gentamicin+Vancomycin oder Teicoplanin+Vancomycin) getestet wurden, untersucht. Es zeigte sich, dass die Kombination von zwei Antibiotika in einem Spacer eine längere bakterizide Wirkung aufweist als ein einzelnes.

Im Gegensatz zu Gentamicin und Vancomycin besitzt die Kombination Teicoplanin und Gentamicin eine höhere bakterizide Wirkung. Außerdem wirkt die Kombination von Glycopeptiden und Aminoglykosiden sowohl auf gram-negative als auch auf gram-positive Bakterien (18).

3.3.7 Resistenzentwicklungen

Der Begriff Resistenz beschreibt die Eigenschaft von Mikroorganismen, die Wirkung von antimikrobiellen Substanzen wie Antibiotikum zu reduzieren oder zu neutralisieren (12). Befindet sich die Wirkungsdosis des Antibiotikums für einen längeren Zeitraumunterhalb der hemmenden Wirkungsschwelle(MHK), kann es zur Bildung von Resistenzen gegenüber dem Antibiotikum kommen (41,42). In einer Studie konnte Hope et al. (1989) bei Gentamicin-haltigen Knochenzementen in der Primärimplantation ein enormes Auftreten resistenter Keime nachweisen. Von insgesamt 34 Hüftprothesen bei Revisionsoperationen, in denen zuvor Gentamicin imprägnierter Zement verwendet wurde, wurde in 30 (88%) mindestens ein Stamm an Gentamicinresistenten Koagulase negative *Staphylokokken* nachgewiesen. Im Gegensatz dazu traten bei 57 Hüftendoprothesen bei Revisionsoperationen, indem kein Gentamicin versetzter Zement verwendet wurde, in nur 9 (16%) der Fälle ein Koagulase negativer *Staphylokokkus* auf (43). Aus diesem Grund sollte vor prophylaktischer Verwendung von antibiotikabeladenen Knochenzementen der Zweck sorgfältig bestimmt werden (18).

Infektionen, welche durch den Keim *Staphylococcus aureus* verursacht werden, treten am häufigsten im Skelettsystem auf (44,45). Ungefähr 20% der in Europa berichteten Fälle sind mit Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (*MRSA*) infiziert, wobei eine kontinuierlich steigernde Prävalenz verzeichnet wird. Dementsprechend zeigt sich in den USA eine Erhöhung der Infektionsrate von anfänglichen 33% auf 55% (46,47). Aufgrund der Resistenz des *MRSA*-Keims gegen alle Beta-Lactam Antibiotika, sowie Cephalosporine und Penicillinderivate kommt in der Chirurgie oftmals Vancomcyin zum Einsatz.

3.3.8 Toxische Wirkung von Antibiotika

Die lokale Toxizität wurde bereits in einigen Studien untersucht, jedoch gilt das Forschungsfeld der systemischen Komplikationen in diesem Kontext als wenig erforscht. Grundsätzlich können Aminoglykosid-Antibiotika eine Schädigung des Gehör- und Nierenorgans verursachen. Allerdings sind die Serum-Konzentrationen bei lokaler Verwendung von antibiotikahaltigen Knochenzementen über die gesamte Freisetzungsdauer äußerst gering und somit vernachlässigbar (12).

Rathboneet al. (2011) stellten aufgrund der hohen lokalen Antibiotikadosen eine verringerte Lebensfähigkeit und Aktivität der umliegenden Zellen fest. Mit Ausnahme von Vancomycin wurde bei allen übrigen Antibiotika eine >50% Reduktion der Zellzahl nachgewiesen. Bei einer Konzentration von <200 mg/ml konnte bei Gentamicin eine deutlich sinkende Osteoblastenzahl sowie verringerte Funktion der alkalischen Phosphatase beobachtet werden. Bereits ab 100mg/ml konnten bei den Antibiotikum Tetracyclin und Ciprofloxacin eine 75%ige Reduktion der Zellzahl nachgewiesen werden (48).

4 Material und Methoden

4.1 Knochenzemente

Im Labor wurden insgesamt vier Knochenzemente untersucht, wobei zwei der handelsüblichen Zemente VancoGenx® sowie Copal® G+V bereits das Antibiotikum Vancomycin industriell vorgemischt enthielten. Um eine vergleichende Antibiotikamenge auch bei den anderen zwei Knochenzementen zu gewährleisten, wurden diese jeweils mit 2g Vancomycin HEXAL® vermengt. Demzufolge entspricht die Ausgangsbasis der Versuche jeweils 2g Vancomycin bei 40g bzw. bei VancoGenx®1g bei 40gKnochenzement.

Zement	Firma	Menge 40g Pulver + Antibiotikum	Gesamt AB-Menge
SmartSet® GHV	Depuy/JJ	1g Gentamicin + **2g** Vancomycin* Hexal®	**3g**
Simplex® P with Tobramycin	Stryker	1g Tobramycin + **2g** Vancomycin* Hexal®	**3g**
VancoGenx®	Tecres	1g Gentamicin + 1g Vancomycin	**2g**
Copal® G+V	Heraeus	0,5g Gentamicin + 2g Vancomycin	**2,5g**
* **manuelle Zumischung von** 2g **Vancomycin Hexal®**			

Tabelle 3: In den Tests verwendete Knochenzemente

4.2 Herstellung von Formkörper

Die in Tabelle 3. angeführten Knochenzemente wurden im Labor bei 23°C und einer Luftfeuchtigkeit von 39,5% mit Hilfe des Palamix® Systems angerührt. Dazu wurden original verpackte Zemente verwendet und je nach Hersteller entweder die Pulverkomponente der Flüssigkeit zugegeben oder die Flüssigkeit der Pulverkomponente. Durch gleichmäßige Auf- und Abwärtsbewegungen in der Kartusche (30 Sekunden) wurde der Knochenzement mit der flüssigen Komponente (N,N-Dimethyl-p-toluidin) gemischt.

Nach einer Wartezeit von exakt zwei Minuten wurde das Polymerisat mithilfe einer Zementspritzpistole und eines kurzen Schnorchels in die dafür vorgesehenen Schablonen gefüllt und mit einem Metallspatel das überschüssige Material entfernt. Anschließend wurde mit einer Kunststofffolie abgedeckt und 30 Minuten bei einer dauerhaften Belastung von 1,3t gepresst. Bei jenen Knochenzementen, bei denen zusätzlich das Antibiotikapulver Vancomycin HEXAL® beigemischt wurde, war es zuvor notwendig diese gründlich mit Hilfe eines Mörsers in einem Gefäß zu zerkleinern, um ein möglichst homogenes Gemisch zu erzielen.

Die ausgehärteten Formkörper wurden aus den Schablonen entnommen und bis zu weiteren Verwendung bei 23 °Celsius gelagert.

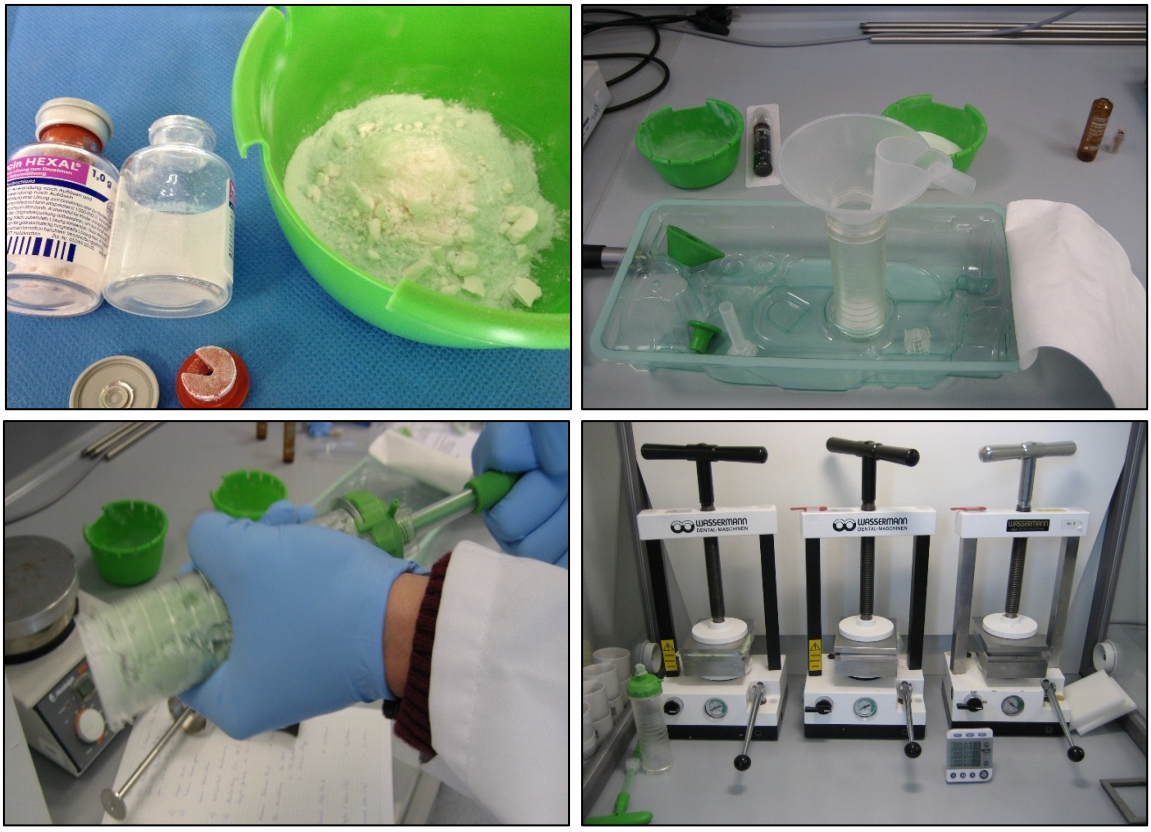


Abbildung 4: Manuelle Herstellung der antibiotikahaltigen Formkörper

4.2.1 Formkörper

Bei der Herstellung der Formkörper wurden zwei verschiedene Arten von Metallschablonen verwendet die in Abbildung 5 rechts für den Elutions-freisetzungsversuch, die in Abbildung 5 links für den Biegefestigkeitstest. Dazu wurden Dynstat® Formkörper verwendet.

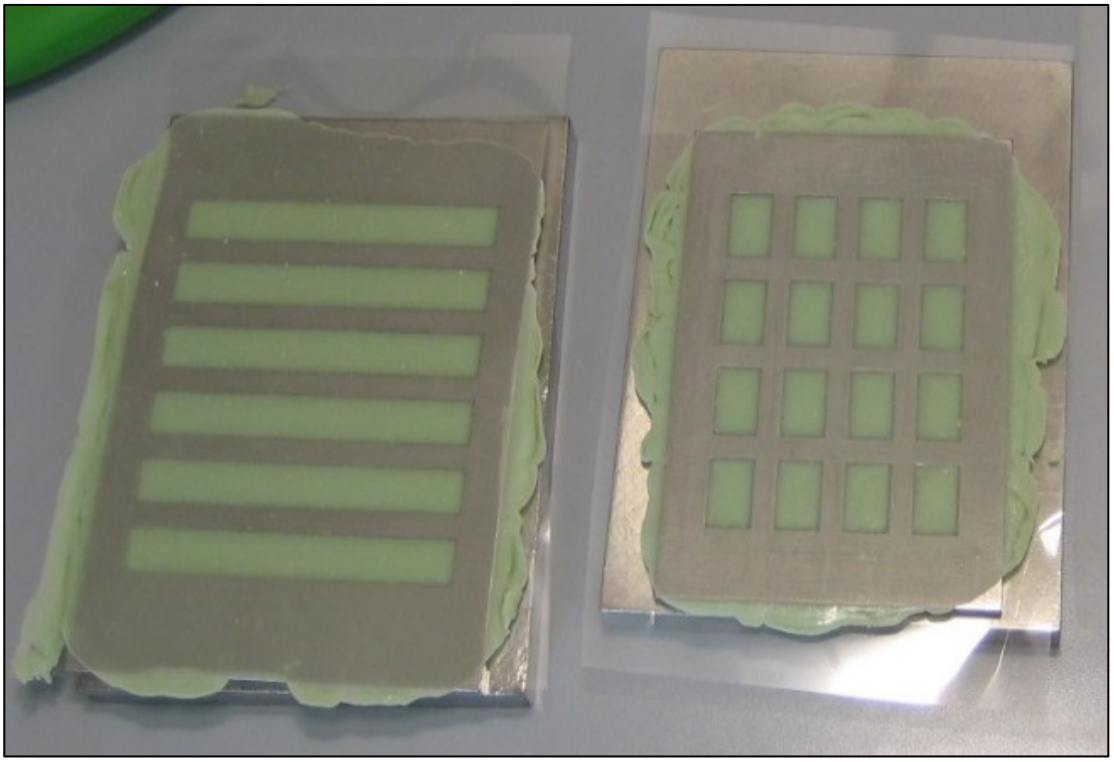


Abbildung 5: Formkörper für Biegetestung und Elutionsversuch

4.3 Elutionsversuch

4.3.1 Herstellung der Elution

Für den Elutionsversuch wurden die Formkörper in einem Reagenzgefäß mit 10 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, Biochrom AG, Austria) bei Raumtemperatur für die entsprechenden Zeiten inkubiert. Damit waren die Prüfzylinder in ausreichender Flüssigkeit getaucht.

Die Zeitpunkte der Zementplättchen-Übertragung betrugen:

1h 6h 24h 3d 7d 14d 21d 28d 35d 42d

Dabei wurden die Formkörper aus der Pufferlösung mit Hilfe einer langen Pinzette entnommen, auf einem Papier abgetrocknet und in ein neues Reaktionsgefäß mit Pufferlösung übertragen. Damit sollte oberflächliches, bereits gelöstes, Antibiotikum entfernt werden. Die einzelnen Reaktionsgefäße wurden verschlossen und bis zur weiteren Verwendung in einem Kühlschrank bei 4°C gelagert.

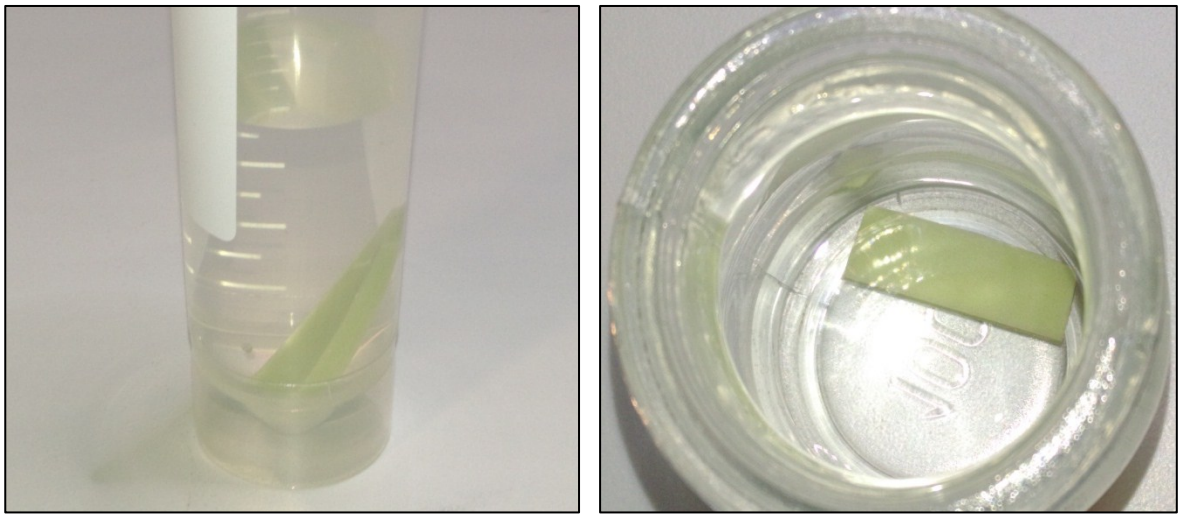


Abbildung 6: Symbolfoto Formkörper in Pufferlösung

4.4 Agardiffusionstest

Bei diesem Standardverfahren wird das Resistenzverhalten von bestimmten Erregern gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum untersucht.

Dabei wird das vorgefertigte Eluat auf eine mit einem Testkeimbeimpften Agarplatte aufgebracht. Das Antibiotikum diffundiert in den Nährboden und je nach Sensitivität kann der Keim anwachsen oder es bildet sich ein sogenannter „Hemmhof“. Der entstehende Hemmhofdurchmesser korreliert mit der Konzentration, der Sensibilität des Keimes und der Geschwindigkeit der Diffusion (49).

4.4.1 Verwendete Bakterien

Für den Agardiffusionstest wurden folgende Keime verwendet:

- *Staphylococcus aureus* DSM 799
- *Staphylococcus epidermidis* DSM 1798
- *MRSA* 02/39*
- *MRSA* 02/260*
- *MRSA* 02/221*
- *MRSA* 03/08*

4.4.2 Durchführung des Agardiffusionstest

Zur Durchführung des Agardiffusionstests wurde eine Bakteriensuspension von 0,5 basierend auf Trübungsstandards von McFarland hergestellt. Dieser entspricht einer Zellzahl von 1,5 x 10^8 Bakterien pro ml. Diese Bakteriensuspension wurde durch Verwendung von sterilen Wattestäbchen auf sogenannten „Müller-Hinton-Agar-Platten“ aufgetragen, wobei ein Drehtisch die gleichmäßige Verteilung gewährleistete. Bei den Platten handelt es sich um ein spezielles mikrobiologisches Nährmedium, welches zur Testung von Antibiotikaresistenzen genutzt wird (Testung entsprechend EUCAST). Mit einer Pasteurpipette wurde im Zentrum der Agarplatte ein Loch mit 6 mm Durchmesser herausgestanzt, in welches 50 µl der Testeluate pipettiert wurden. Jede Probe wurde in drei Agarplatten gefüllt (dreifach Bestimmung).

Nach 24 Stunden Inkubation bei 37° Celsius im Brutschrank erfolgte die Abmessung der Größe der Hemmhöfe. Bei jeder Agarplatte wurde zweimal der Durchmesser (senkrecht aufeinander) gemessen und der Mittelwert der beiden Werte berechnet. Die Angabe erfolgte in Millimeter (mm).

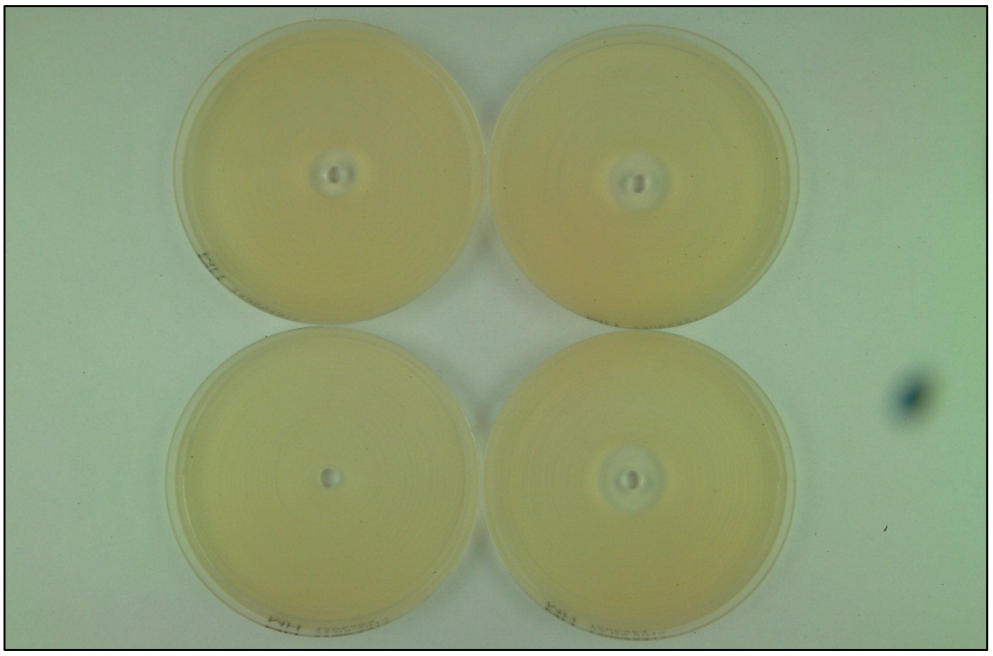


Abbildung 7: Inkubierte Agarplatten mit Hemmhöfen

4.5 Mechanische Testung

Die mechanische Testung der Biegefestigkeit und des Biegemoduls erfolgte nach der ISO-Norm 5833 aus dem Jahr 2002. Wobei folgende Parameter ermittelt werden: Dicke, Breite und Fläche der Formkörper in mm; Biegemodul und Biegefestigkeit in MPa; Durchbiegung bei Bruch und maximaler Kraft in mm; maximal einwirkende Kraft sowie Krafteinwirkung bei Bruch in N.

Die Prüfung erfolgte 24h nach Herstellung der Formkörper bei einer Raumtemperatur von 23°C +-1°C. Der vier-Punkt Biegetest hat bei der äußeren Auflagefläche einen Abstand von 60 mm und bei der inneren Auflagefläche einen Abstand von 20 mm. Die zuvor abgemessenen rechteckigen Formkörper mit den Standardmaßen (3,3 mm x 75 mm x 10 mm) wurden dabei ins Messgerät eingespannt und bis zum Durchbruch ständig belastet.

Folgende Einstellungen wurden verwendet:

- Vorkraft: 2 N
- Geschwindigkeit E-Modul: 5 mm/min
- Prüfgeschwindigkeit: 5 mm/min

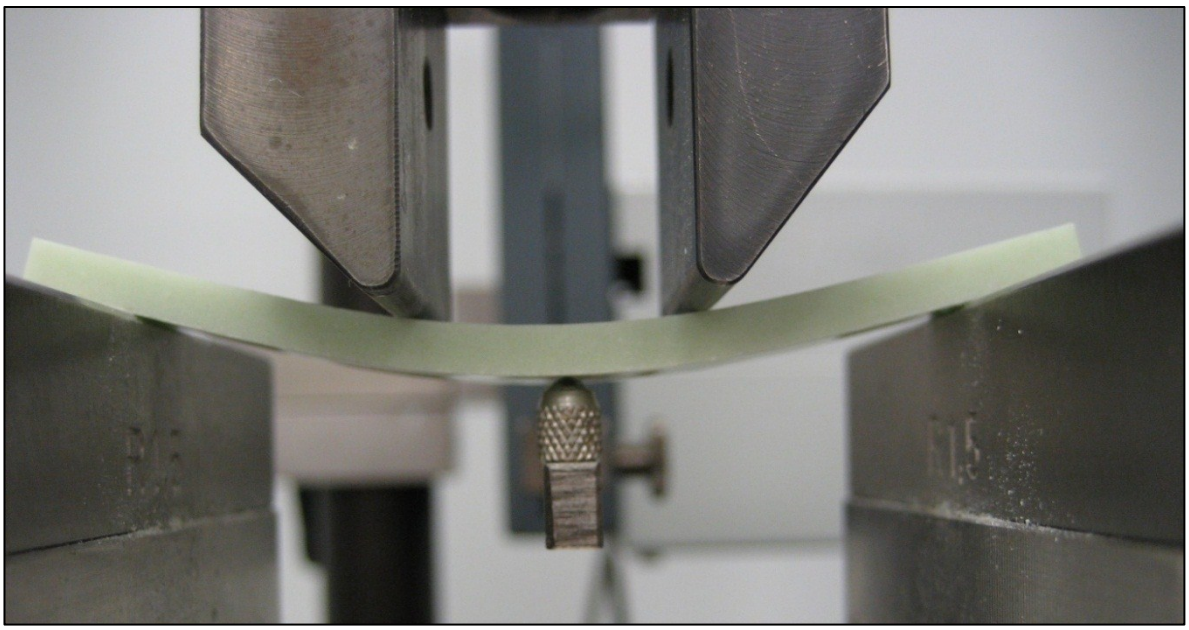


Abbildung 8: Mechanische Testung nach ISO 5833:2002

4.6 Externe Elutionsversuch Labor Deutschland

Zusätzlich zu den mikrobiologischen Freisetzungsversuchen am Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin in Graz wurden Dynstat® Formkörper der vier Knochenzemente in Deutschland geprüft. Die Formkörperproben wurden in einem Lösungsmedium (0,1 M Phosphatpuffer) bei 37°C und einem pH von 7,4 inkubiert. Die Versuche wurden an denselben Zeitpunkten (1h, 6h, 24h, 3d, 7d, 14d, 21d, 28d, 35d, 42d) wie sie in Graz durchgeführt wurden, ausgeführt. Abhängig von der Größe der Formkörper war die Menge des Lösungs Mediums zu beachten, um eine vollständige bedecken der Probe zu gewährleisten. Nach Herstellung der Standardlösung von Vancomycin und Gentamicin wurde die Konzentrationsbestimmung über die LC-MS/MS-Bedingungen die chromatographische Trennung auf einem modularen HPLC Serie 1200 durchgeführt (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Anschließend mit Excel (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) berechnet und ausgewertet. Alle Ergebnisse werden in g / cm² (Bericht AZB 13-053, 2013) angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Manuelle Beimengung von Vancomycin und mögliche Limitationen

Die Abbildung 9a links veranschaulicht eine nicht korrekt durchgeführte manuelle Beimengung von Antibiotikum. Deutlich ersichtlich sind klumpen-förmige Antibiotika Partikel durch unzureichende Zerkleinerung mit Hilfe des Mörsers.

Abbildung 9b rechts zeigt einen bereits fertigen Formkörper für die ISO-Biegetestung, der nach unkorrekter Antibiotikum Beimengung hergestellt wurde. Die Folge des manuell zugemischten Antibiotikums ist eine inhomogene Verteilung des Antibiotikums in der Zementmatrix.

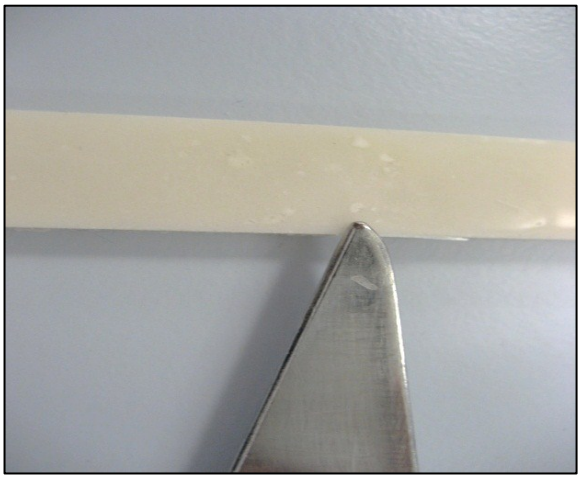


Abbildung 9a/b: a: PMMA Zement mit AB-Pulver; b: an der Spitze des Messers des fertigen Formkörper weiße AB-Partikel ersichtlich

5.2 Agardiffusionstest

Um einen Vergleich zwischen den vier verwendeten Knochenzementen zu erhalten, wurden Plattendiffusionsversuche mit folgenden Zeiten durchgeführt:

1h 6h 24h 3d 7d 14d 21d 28d 35d 42d

Die industriell hergestellten Knochenzemente mit 1 oder 2g Vancomycin wurden mit Knochenzementen nach Antibiotika Beimengung verglichen.

5.2.1 Agardiffusionstest 1 Stunde bis 24 Stunden mit Gentamicin und Vancomycin gegen den sensiblen *Staphylococcus aureus*

In Abbildung 10 wurden die Zemente auf ihre rasche Freisetzungsfähigkeit sowie Verfügbarkeit der einzelnen Antibiotika untersucht. Getestet wurden Zemente mit dem Antibiotikum Gentamycin, Vancomycin sowie Tobramycin. Die Werte der y-Achse stellen die mittleren Hemmhofdurchmesser in Bezug zu den Zeitpunkten der Eluat-Entnahme der x-Achse dar. Pro Eluat wurden drei Müller-Hinton-Agar Platten gegen *Staphylococcus aureus* 799 angefertigt und der Mittelwert der Hemmhofgrößen berechnet.

Die Ergebnisse des Agardiffusionstest zeigen bei den untersuchten Zementen nach einer Stunde Freisetzung vergleichbar große Hemmhöfe. Die Hemmhof-durchmesser betragen zwischen 23 und 26 mm, woraus sich kein signifikanter Unterschied (p-Wert 0,7918 one-way ANOVAtest) ergibt. Weiterführend reduzieren sich die Hemmhöfe der Zemente innerhalb der ersten 24 Stunden minimal mit Ausnahme von VancoGenx®. Dieses Produkt weist mit einem Hemmhofdurchmesser von 14mm die größte Reduktion und damit verminderte Freisetzung auf.

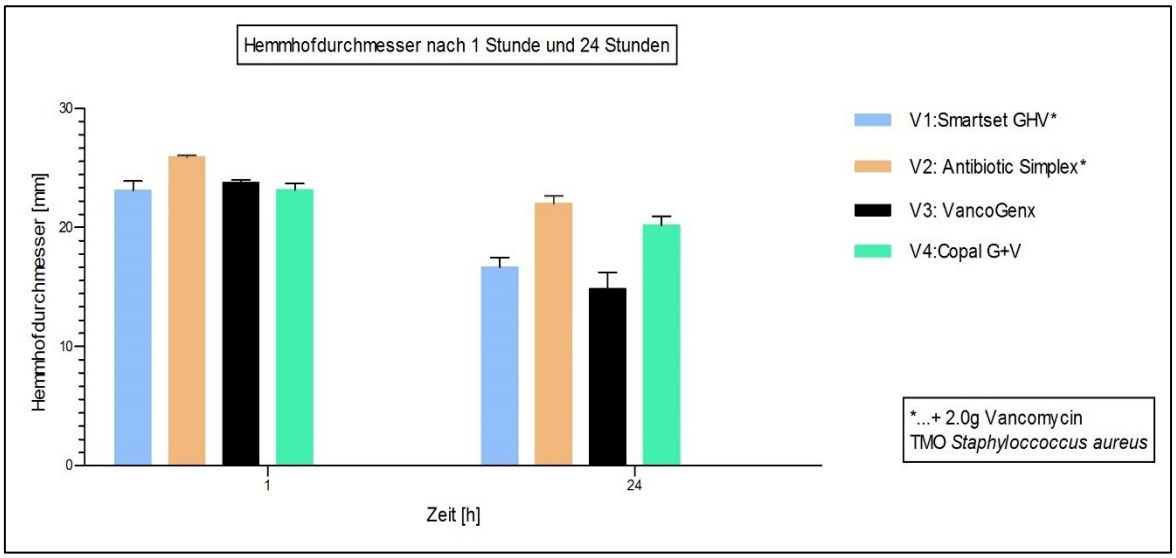


Abbildung 10: Verlaufswerte der Hemmhofdurchmesser der untersuchten Gentamicin- und Vancomycin-haltigen Zemente bis 24 Stunden. Testbakterium: *Staphylococcus aureus.* Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angeführt.

5.2.2 Langzeit Agardiffusionstest mit Gentamicin und Vancomycin gegen den sensiblen *Staphylococcus aureus*

Zusätzlich zu den 24 Stunden Werten ist der Langzeit Agardiffusionstest ein sehr relevanter Punkt.

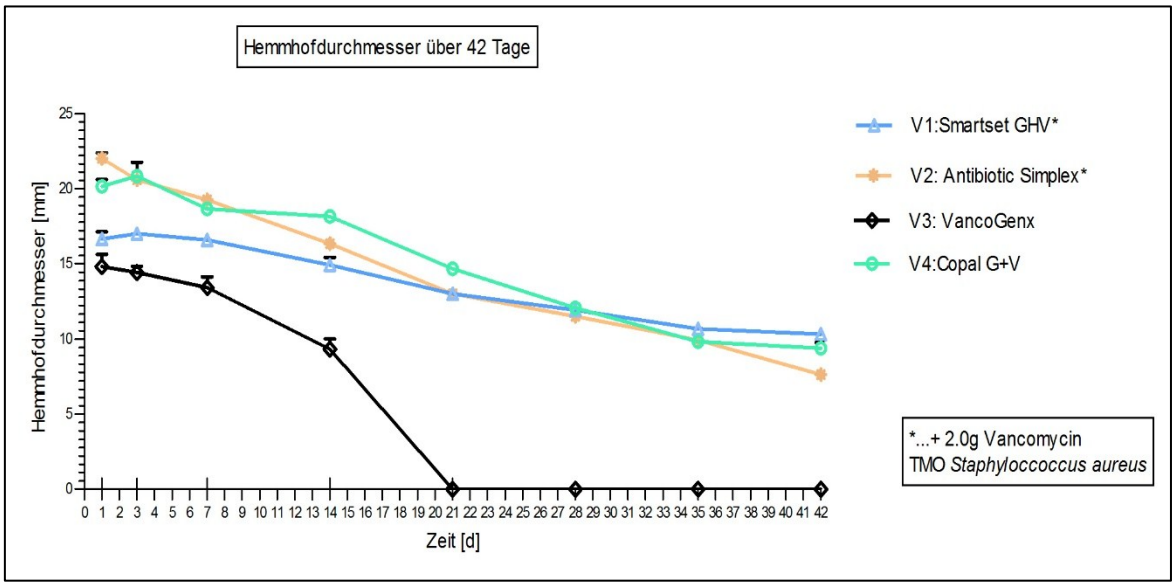


Abbildung 11: Verlaufskurven der Hemmhofdurchmesser der untersuchten Zemente 1 bis 42 Tage. Testbakterium: *Staphylococcus aureus.* Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angeführt.

Die Langzeitintervall Ergebnisse bis 42 Tage der Knochenzemente Smartset® GHV (plus 2g V manuell), Antibiotic Simplex® P mit Tobramycin (plus 2 g V manuell), VancoGenx® (Referenz) sowie Copal® G+V (Referenz) sind in Abbildung 11 dargestellt. Auf der y-Achse sind die mittleren Hemmhofdurchmesser von jeweils 3 Formkörper der getesteten Zemente aufgetragen, auf der x-Achse deren Verlauf über die Testdauer von 42 Tagen. Pro Eluat wurden drei Müller-Hinton-Agar Platten gegen *Staphylococcus aureus* 799 angefertigt und der Mittelwert der Hemmhofgrößen berechnet.

Wie in Abbildung 10 ersichtlich, zeigt das Referenz-Produkt VancoGenx® den geringsten Hemmhofdurchmesser innerhalb eines 24-stündigen Beobachtungszeitraumes, wobei in den weiteren Beobachtungstagen von 3, 7 und 14 Tagen eine signifikante Abnahme (p-Wert 0,02) zu verzeichnen ist.

Zwischen Beginn der zweiten und dritten Woche reduziert sich die Verfügbarkeit des Antibiotikums von VancoGenx® mit einem Durchmesser von 9 mm auf ihren Nullpunkt.

Die Test-Zemente Smartset® GHV, Antibiotic Simplex® P mit Tobramycin sowie die Referenz Copal® G+V zeigen einen annähernd gleichen Verlauf über die 42 Tage. Der Zement Antibiotic Simplex® P mit Tobramycin besitzt bis zum 14. Tag ein besseres Freisetzungsverhalten als Smartset® GHV, weist jedoch ab dem 28. bis zum 42. Tag eine Verschlechterung auf.

5.2.3 Wirksamkeit von Vancomycin gegen verschiedene klinisch relevante *MRSA*-Stämme

Um die Wirkung eines Antibiotikums in den Knochenzementen zu testen, die verschiedene Antibiotika enthalten, wurden Versuche mit mehreren klinisch relevanten *MRSA* Stämmen durchgeführt. Jeder dieser verwendeten Stämme zeigt ein unterschiedliches Resistenzverhalten gegen Antibiotika auf. Mit Hilfe des Epsilometertests wurden Minimalhemmhofkonzentration gegenüber Gentamicin und Vancomycin durchgeführt dessen Ergebnisse in Tabelle 4 ersichtlich sind.

Antibiotika	MRSA 02/39	MRSA 02/260	MRSA 02/221	MRSA 03/08
Gentamicin	>256	64	48	32
Vancomycin	0,75	1	1	1

Tabelle 4: Resistenzen verschiedener MRSA-Stämme gegen Gentamicin und Vancomycin. Die Werte geben die MHK in µg/ml an.

In der folgenden Abbildung 12 wurden 24-Stunden Eluate der vier Knochenzemente auf unterschiedliche MRSA-Stämme aufgetragen. Zur zielgerichteten Testung des Antibiotikums Vancomycin wurden Stämme verwendet, die gegen Gentamicin und Tobramycin resistent sind.

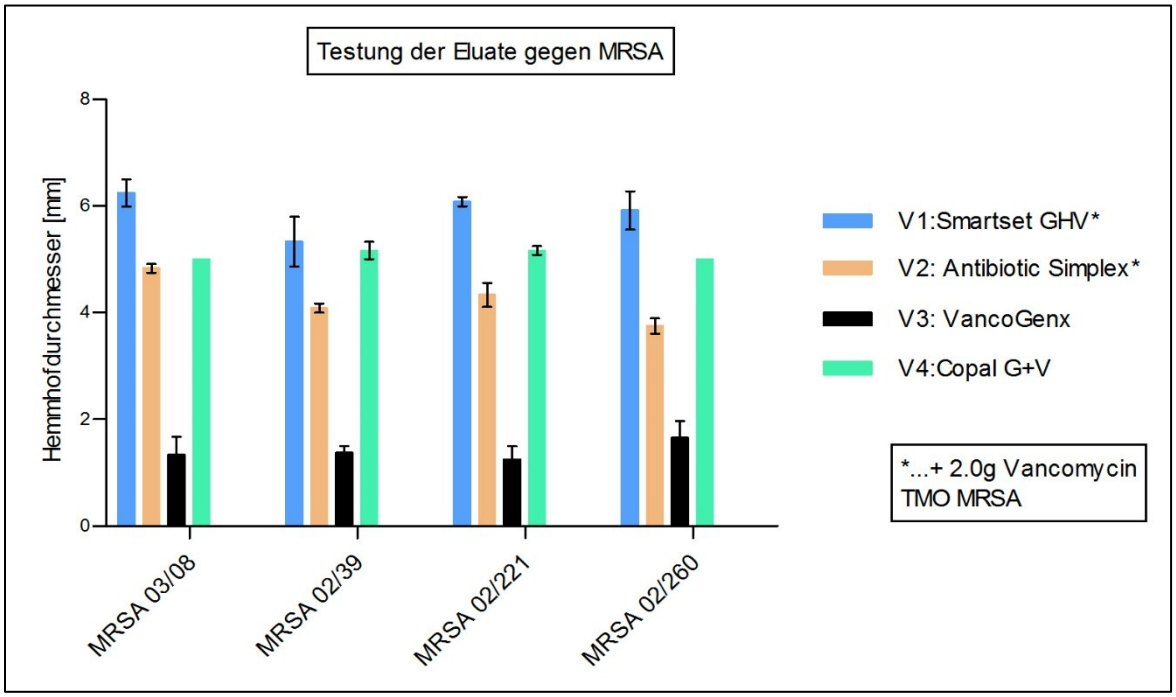


Abbildung 12: Hemmhofdurchmesser der 24 Stunden Eluate gegen verschiedene MRSA-Stämme

Auf der y-Achse sind die mittleren Hemmhofdurchmesser in Bezug zu den Zeitpunkten der Eluat-Entnahme auf der x-Achse dargestellt. Alle Vancomycin versetzten Knochenzemente sind sensibel gegenüber den verwendeten MRSA-Stämmen und bilden verschieden große Hemmhofdurchmesser in 24h aus.

Smartset® GHV und Copal® G+V bilden die größten Hemmhöfe, VancoGenx® den niedrigsten. Beim Antibiotic Simplex® P mit Tobramycin ergeben sich bei allen MRSA-Keimen annähernd gleiche Hemmhöfe, wobei ihre Werte unter denen von Smartset® GHV und Copal® G+V liegen.

5.3 Mechanische Messung

5.3.1 Ergebnisse der mechanischen Messung des Biegemodul und Biegefestigkeit nach ISO 5833

Alle der vorgefertigten Formkörper umfassten >3,4 mm bis max. 3,5 mm. Die durchschnittliche maximal verwendete Kraft beträgt 116 N. Die Krafteinwirkung beim Bruch weist einen Mittelwert von 114 N auf.

Von den jeweiligen Zementen wurden 6 Versuche auf der x-Achse und die MPa des Biegemoduls auf der y-Achse aufgetragen. Im Versuch der Biegefestigkeit in der Abbildung 13 erreichte der Zement Smartset® GHV nach manueller Zumischung von 2 g V die vorgeschriebene ISO-Norm von 50 MPa nicht. Die Zemente Antibiotic Simplex® P mit Tobramycin, VancoGenx® sowie Copal® G+V erzielten Werte zwischen 55 und 65 MPa. Im Vergleich zu den industriell hergestellten Referenzzementen VancoGenx® und Copal® G+V kann eine nahezu 20%-ig reduzierte Biegefestigkeit bei Smartset® und Antibiotic Simplex® P mit Tobramycin festgestellt werden.

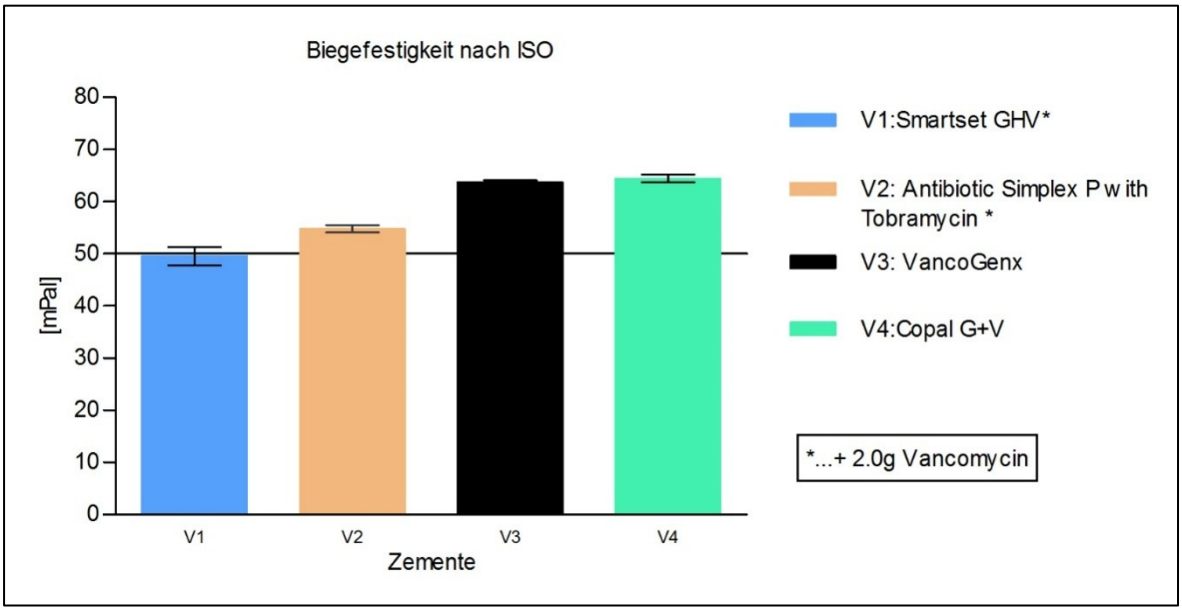


Abbildung 13: Werte der Biegefestigkeit, 6 Versuche pro Zement
Methode: 4-Punkt Biegetest nach ISO 5833

Wie im Biegemodul der Abbildung 14 ersichtlich, wurde von allen Zementen die Mindestanforderung von 1800 MPa erreicht und vergleichbare Ergebnisse erzielt.

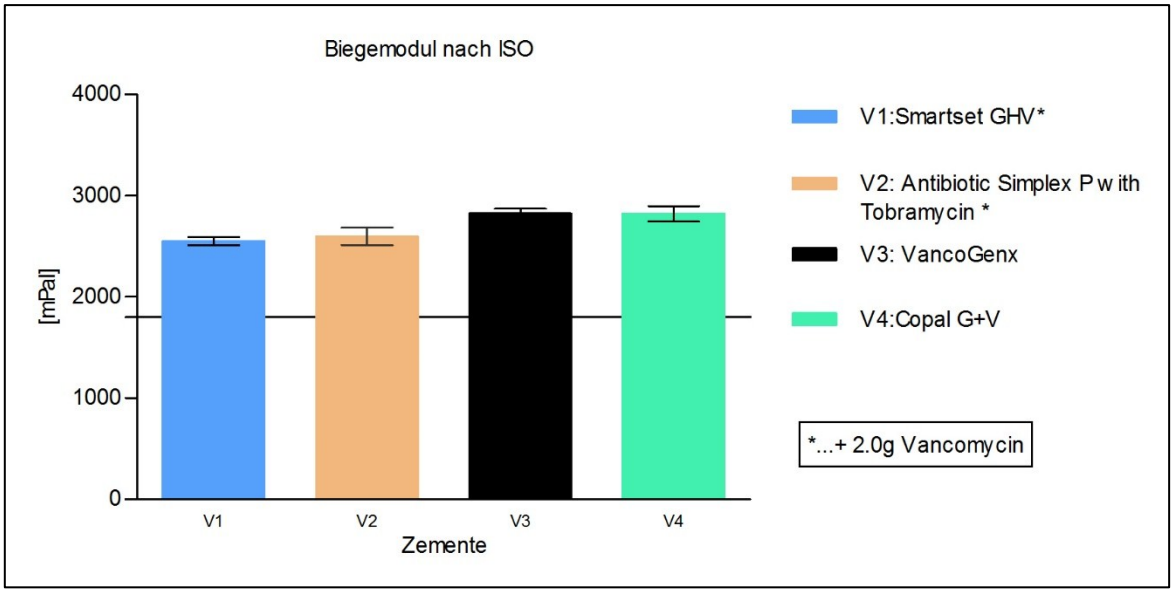


Abbildung 14: Werte der Biegemodule, 6 Versuche pro Zement
Methode: 4-Punkt Biegetest nach ISO 5833

5.4 Elutionsversuch Labor Deutschland

5.4.1 Langzeitfreisetzungsversuch von Gentamicin und Tobramycin 1 bis 28 Tage

Die Freisetzungsversuche, die im externen Labor in Deutschland durchgeführt wurden, zeigten einen signifikanten Unterschied in der Gentamycinfreisetzung. Copal® G+V mit 1.25% G im Polymerpulver konnte mit über 100 µg/cm² die Höchstwerte erzielen. Auch VancoGenx® (mit 2.5% G) und Smartset® GHV* (mit 2.5% G) setzten innerhalb der ersten 24 Stunden hohe Mengen frei, wobei sich diese ab dem 3. Tag auf Werte unter 20 µg/cm² reduzierten.

Die Freisetzung von Tobramycin vom Zement Antibiotic Simplex® P mit Tobramycin (mit 2.5% T) und manueller Beimengung von 2g Vancomycin ist zu allen Messzeitpunkten auffällig niedrig.

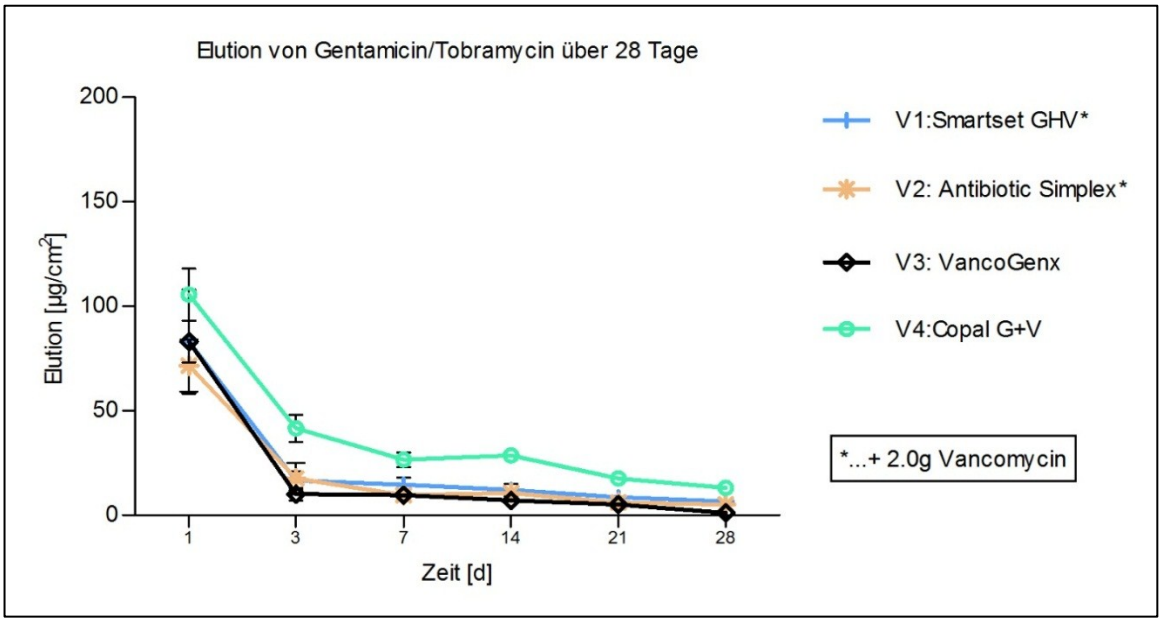


Abbildung 15: Langzeitfreisetzungsversuch von Gentamicin bestimmt durch HPLC. Die y-Achse zeigt µg/cm²Gentamicin, die x-Achse die Zeitpunkte der Proben in Tagen.

Dieselben Freisetzungsversuche der vier Zemente wurden mit Vancomycin durchgeführt. Smartset® GHV (manuell 2g V) sowie Copal® G+V (industriell 2g V) erreichten die höchsten Werte. Auch in diesem Versuch zeigt der Zement VancoGenx® am Beginn höhere Werte, ab dem 3. Tag die Niedrigsten.

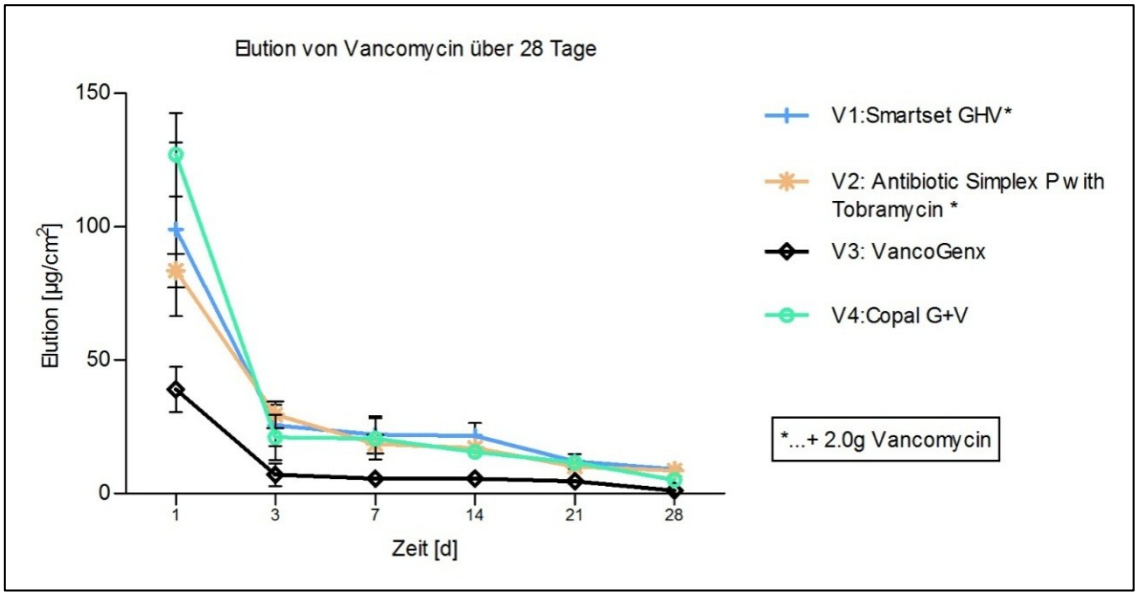


Abbildung 16: Langzeitfreisetzungsversuch von Vancomycin bestimmt durch HPLC. Die y-Achse zeigt µg/cm²Gentamicin, die x-Achse die Zeitpunkte der Proben in Tagen.

6 Diskussion

Seit langem werden antibiotikahaltige Knochenzemente zur Prophylaxe oder als Behandlung von chirurgischen Infektionen eingesetzt. Abhängig vom Keim und Infektionsdauer ist die zweizeitige Revision mit Hilfe von antibiotikahaltigen Revisionszementen ohne Zweifel Goldstandard in der Revisionschirurgie geworden (50). Aus diesen Zementen können über Wochen hohe lokale Antibiotikamengen ins Gewebe freigesetzt werden und somit der Behandlung von Protheseninfektion dienen. Entscheidend für den Revisionszement sollte ein gutes Freisetzungsprofil, mechanische Stabilität und Effizienz in seiner Wirkung sein.

Um diese Depotwirkung in vitro zu simulieren, wurde am Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der Agardiffusionstest verwendet. Mit Hilfe dieses Standardverfahrens lässt sich das Freisetzungsverhalten der einzelnen antibiotikahaltigen Knochenzemente bestimmen und durch die gemessenen Hemmhofdurchmesser Rückschluss auf deren antibakteriellen Wirkung ziehen. Ein möglicher Nachteil dieses Verfahrens ist die Nichtbestimmbarkeit der freigesetzten Menge. Daher wurden zusätzliche Untersuchungen in einem externen Labor in Deutschland durchgeführt. Das Ziel der Studie bestand darin, Antibiotikum versetzten Knochenzementen, die industriell oder manuell hergestellt wurden, hinsichtlich ihrer Freisetzung und mechanischen Belastbarkeit untereinander zu vergleichen.

Manuelle Herstellung

Grundsätzlich sollte immer ein industriell angefertigter antibiotikahaltiger Knochenzement verwendet werden und nur bei nicht zur Verfügung stehenden, eine manuelle Beimengung durch den Chirurgen selbst erfolgen. Allerdings ist auf einen korrekten Vorgang zu achten und sollte nach einer Mischungsanleitung von Frommelt (2007) (32) und Ochsner (2015) (51) erfolgen.

Wie in Abbildung 9a und 9b zu sehen ist, wurde eine nicht korrekte Vermengung durchgeführt. Bei genauer Betrachtung sind kleine klumpenförmige Strukturen zu erkennen.

Solche Inhomogenitäten können in weiterer Folge zu einer Verminderung der mechanischen Stabilität führen bzw. im schlimmsten Fall einen Spacerbruch verursachen.

Agardiffusionstest

Im Agardiffusionstest erreichten die getesteten Zemente Smartset® GHV mit manuell zugesetzten 2 g V, Antibiotic Simplex® P mit Tobramycin mit manuell 2 g V, VancoGenx® (industriell 1 g V) und Copal® G+V (industriell 2 g V) innerhalb der ersten 24 Stunde eine hohe Wirkstoff-Verfügbarkeit. Dabei zeigt sich, dass die manuelle Beimengung von Vancomycin bei den Zementen Smartset® GHV und Antibiotic Simplex® eine gleichermaßen hohe Freisetzung bewirkt. Dieses Ergebnis hängt aber stark davon ab, ob die manuelle Zumischung korrekt erfolgt. Nur dann können solch gute Ergebnisse erzielt werden. Inhomogenität durch unsachgemäße Zumischung führen zu nicht reproduzierbaren Resultaten. Eine initial hohe Freisetzungsverhalten wird auch von einigen anderen Studien bestätigt (52-54). Zudem reduzieren sich die Hemmhöfe der Zemente innerhalb der ersten 3 Tage nur minimal und erzielen somit bessere Ergebnisse als die Studie von Squire (2008). Dieser beschreibt nämlich eine bis zu 70%ige Reduktion bis zum 3. Tag (55).

Bei Betrachtung der weiteren Verlaufskurve zeigt sich, dass die untersuchten Zemente bis zum 42. Tag ein annähernd gleiches Freisetzungspotential besitzen, mit Ausnahme von VancoGenx®**.** Dieser Zement weist zwischen Beginn der 2. und 3. Woche einen rapiden Abfall der antibakteriellen Wirkung auf, wodurch keine Hemmung des Bakterienwachstums mehr messbar ist. Ein möglicher Grund könnte die hydrophobe Polymermatrix des VancoGenx® darstellen (18,56). Diese bewirkt eine verminderte Flüssigkeitsaufnahme während des Diffusionsprozesses und führen folglich zu einer reduzierten Elution von Antibiotikum aus der Zementmatrix. Allerdings enthält auch der Zement Antibiotic Simplex® P mit Tobramycin hydrophobe Polymere, der jedoch ein besseres Freisetzungsverhalten zeigt. Ein anderer Erklärungsansatz für die verminderten Hemmhöfe von VancoGenx® könnte der geringere Antibiotikum-Zusatz sein. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Zementen beinhaltet der Revisionszement VancoGenx® mit 0,5g AB bzw. 1g AB weniger als die anderen Zemente.

Dies sollte allerdings nur für das Vancomycin gelten, da VancoGenx® wie die beiden Testzemente Simplex® und Smartset® jeweils 2.5 % G enthält.

Ab dem 42. Tag wurden keine weiteren Freisetzungsversuche durchgeführt, begründet durch die durchschnittliche Verweildauer des Spacers von 6 Wochen. Einer Langzeitstudie zufolge am Palacos® R+G kann das Gentamicin allerdings nach mehr als 5-jähriger Implantation immer noch oberhalb der MHK im umliegenden Gewebe nachgewiesen werden (36). Dies ist allerdings nicht auf andere Zemente übertragbar und eine langandauernde Freisetzung unterhalb der MHK könnte in ungünstigen Fällen kritisch in Bezug auf eine mögliche Resistenzbildung angesehen werden.

Antibiotikumkombinationen

Um ein möglichst breites Spektrum der Erreger abdecken zu können, beinhalten Revisionzemente eine Kombination aus zwei Antibiotika. Zusätzlich begünstigen Antibiotikakombinationen wie Gentamicin und Vancomycin das Freisetzungsverhalten beider Antibiotika aus dem Zement. Die Kombination von Gentamicin mit Vancomycin gilt als die bestwirksamste gegen Bakterienkolonisation wie *Staphylococus aureus* (57,58). Penner et al. (1996) konnte mit der Kombination 1g Vancomycin und 2,4g Tobramyicn im Vergleich zur Kontrollgruppe (1g Vancomycin) sogar eine 103% erhöhte Freisetzung nachweisen. Dieses Phänomen wird als „passiver Opportunismus“ bezeichnet, wobei ein zweites Antibiotikum als passiver löslicher Zusatz wirkt(2). Andere ausschlaggebende Faktoren sind die Viskosität des Zements, der Oberflächenaustausch, das Mischungsverhältnis, die Menge und Eigenschaften des Antibiotikums, das Molekulargewicht sowie die Stabilität der Moleküle in Gegenwart von biologischen Flüssigkeiten (18,59,60). Außerdem zeigen Studien einen direkt proportionalen Zusammenhang zur Oberflächenrauheit in der Initalphase der Freisetzung, wobei das Prinzip: „Je höher die Rauheit, desto höher die Freisetzung“ gilt (54,61).

Agardiffusionstest MRSA

Multiresistente Keime sind weltweit steigend, jedoch gibt es oft keine industriell hergestellten antibiotikahaltigen Knochenzemente mit der geeigneten Dosis. In diesem Fall ist die manuelle Mischung zur Behandlung der Protheseninfektion unumgänglich (38). Um gezielt die antibakterielle Wirksamkeit gegen multiresistente Keime von manuell und industriell zugemischten Vancomycin PMMA Zementen darzustellen, wurden im Elutionsversuch vier verschiedene MRSA-Stämme mit unterschiedlicher Resistenz gegen Vancomycin und Gentamicin untersucht.

Im 24h-Stunden Vergleich ist zu beobachten, dass alle vier verwendeten Zemente eine Wirkung gegen die isolierten MRSA-Stämme aufweisen. Die besten Ergebnisse erzielten hier die Zemente Copal® G+V und Smartset® GHV, wobei Smartset® eine geringfügig bessere Wirksamkeiten aufweist, bedingt durch einen Gesamtwirkstoffgehaltes von 3g/40g Pulver im Vergleich zu 2.5g/40g beim Copal® G+V. Die niedrigste Wirksamkeit konnte bei VancoGenx® mit 1g Gentamicin und 1g Vancomycin beobachtet werden, wobei dessen Hemmhofdurchmesser nur ein Viertel der Größe im Vergleich zu den anderen Zementen aufweist. Dieser signifikante Unterschied lässt sich aufgrund der niedrigen Dosierung von 1g Vancomycin jedoch nicht alleine erklären, da der 2,5%ige Gentamicingehalt von Vangogenx® im Vergleich zu Copal® G+V (1,25%) eine synergistische Wirkung auf die Freisetzung zeigen müsste. Das heißt, dass das Eindringen von Flüssigkeit in die Matrix insbesondere durch das hydrophile Gentamicin begünstigt wird und sogar zu einer deutlich besseren Elution von Vancomycin führt. Ein anderer positiver Grund für größere Hemmhöfe bei Copal® G+V könnte der höhere Vancomycin Gehalt in der hydrophilen Polymermatrix darstellen.

Über die Menge und Dauer der Antibiotikum Freisetzung wird von Autoren nach wie vor viel diskutiert (14). Wie schon im Punkt 3.3.7 beschrieben, erfordert die prophylaktische Anwendung im Gegensatz zur therapeutischen Behandlung nur geringe Mengen an Antibiotika um ungünstige Mechanismen zu vermeiden. Eine geringe Menge von 0,5-1,0g Antibiotikum pro 40g Zement beeinflusst nur minimal die mechanischen Eigenschaften. Zu diesen Ergebnissen gelangten auch Davies et al. (1989) und Kühn (2000), die diese Aussagen bestätigen (12,62).

Zudem wird die geringe mechanische Minderung durch AB-Beimengung auch akzeptiert, da alle industriell hergestellten Zemente die weltweite ISO 5833:2002 Bestimmung erfüllen.

Einige Autoren kritisieren jedoch eine hohe Beimengung, da diese zur mechanischen Qualitätsminderung und folglich zu Defekten führen kann (12,63). Allerdings macht es vom klinischen Aspekt her durchaus Sinn, eine hohe Dosis speziell in der Revisionschirurgie anzuwenden. Dieser Meinung ist auch Penner et al. (1996), der höher als 3,6 g Antibiotikum als wünschenswert beschreibt (2). Zudem sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für den industriell verfügbaren Revisionszement, welche eine ausgezeichnete bakterizide Wirkung über 42 Tagen sowie entsprechender mechanischen Qualität unterstreichen. Vorsicht ist dennoch bei höheren Dosen von 6-8 g geboten. Diese können zwar nierentoxische Wirkungen hervorrufen, werden aber als klinisch sicher angesehen (1).

Mechanische Testung

In bestimmten klinischen Fällen, speziell in der Revisionschirurgie, gilt eine hohe Antibiotikadosis als sinnvoll. Dennoch ist darauf hinzuweisen, dass AB Partikel in der Matrix zu einer Verminderung der mechanischen Stabilität führen können (38). Laut einer Studie von De Luise (2004) reduziert sich die mechanische Festigkeit des Zementes bei manueller Zumischung von Tobramycin um 36% im Vergleich zum industriell hergestellten handelsüblichen antibiotischen Knochenzement(64).

Aufgrund dessen sollte die manuelle Zumischung antinfektiver Substanzen zu PMMA Zementen nur bei nicht verfügbaren handelsüblichen AB beladenen Zementen oder bei Behandlung von Knocheninfektion erfolgen (32).

Im Rahmen des ISO-Biegemoduls konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den manuell hergestellten und industriell angefertigten Knochenzementen gefunden werden. Hingegen wurden bei der Untersuchung der ISO-Biegefestigkeit unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Diese zeigen, dass eine manuelle Herstellung im Vergleich zur Industriellen zu deutlichen Verlusten der Biegefestigkeit führt. Mit einer 20%igen Reduktion wird im Versuch ein wichtiger Schwachpunkt manuell hergestellter Antibiotika aufgezeigt.

Auch Kühn (2014), welcher kohärente Ergebnisse bei manueller Beimengung von 2g Antibiotikapulver erzielt, bestätigt diese Aussage. In weiteren Versuchen legt der Autor ebenso Resultate dar, die die verminderte Biegefestigkeit belegen. So reduziert das Antibiotikum Cefamandol die Biegefestigkeit ungefähr um 7%, Daptomycin um 20% und Vancomycin um 32%. Einen noch höheren Verlust der Biegefestigkeit wurde mit 5g Antibiotikum erreicht, dieser liegt bei ca. 38%(12).

Neben revisionschirurgischen Eingriffen werden mit Antibiotikum beladene Zemente auch für die prophylaktische Verankerung von Endoprothesen z.B. Hüftprothesen oder Knieprothesen verwendet. In diesem Fall ist eine dauerhafte Fixierung zwischen Knochen und Prothese durch den Zement vorhanden und einer großen Krafteinwirkung ausgesetzt, weshalb die Selbstherstellung durch den Chirurgen kritisch zu betrachten ist.

Freisetzungsversuch Deutschland

Die HPLC Freisetzungsversuche von Deutschland lieferten vergleichbare Ergebnisse wie jene Versuche in Graz. Es konnten sowohl die inital hohe Freisetzung als auch der Abfall der Freisetzungskurve ab dem dritten Tag nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Agardiffusionstest in Graz konnten auch hier die höchsten Freisetzungen von Gentamicin und Vancomycin beim Revisionszement Copal® G+V erreicht werden. Eine erstaunlich geringe Freisetzungsmenge erzielte hingegen der Zement VancoGenx®. Mit nur 40µg/cm² Vancomycin am ersten Tag schnitt dieser im Gegensatz zu Copal® G+V mit 130µg/cm² am schlechtesten ab. Während VancoGenx® im Agardiffusionstest zwar ab Beginn der zweiten Woche keinen Hemmhof mehr nachweisen konnte, wurden im HPLC Versuch ab dem dritten Tag hingegen annähernd gleiche Mengen an Vancomycin freigesetzt. Ein möglicher Grund für das Fehlen des Hemmhofes könnte eine verminderte Wirkung der Antibiotika unterhalb der MHK sein, weshalb das Bakterienwachstum nicht mehr gehemmt wird.

Literaturverzeichnis

(1) Springer BD, Lee GC, Osmon D, Haidukewych GJ, Hanssen AD, Jacofsky DJ. Systemic safety of high-dose antibiotic-loaded cement spacers after resection of an infected total knee arthroplasty. Clin Orthop Relat Res 2004 Oct;(427)(427):47-51.

(2) Penner MJ, Masri BA, Duncan CP. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. J Arthroplasty 1996 Dec;11(8):939-944.

(3) van de Belt H, Neut D FAU - Schenk, W, Schenk W FAU - van Horn, J R, van Horn JR FAU - van der Mei, H C, van der Mei HC FAU - Busscher, H J, HJ B. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. (0001-6470; 0001-6470).

(4) Alt V, Bechert T, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, et al. In vitro testing of antimicrobial activity of bone cement. Antimicrob Agents Chemother 2004 Nov;48(11):4084-4088.

(5) Anagnostakos K, Schmid NV, Kelm J, Grun U, Jung J. Classification of hip joint infections. Int J Med Sci 2009 Sep 1;6(5):227-233.

(6) Leone S, Borre S, Monforte A, Mordente G, Petrosillo N, Signore A, et al. Consensus document on controversial issues in the diagnosis and treatment of prosthetic joint infections. Int J Infect Dis 2010 Oct;14 Suppl 4:S67-77.

(7) Claassen L, Plaass C, Daniilidis K, Calliess T, von Lewinski G. Two-stage revision total knee arthroplasty in cases of periprosthetic joint infection: an analysis of 50 cases. Open Orthop J 2015 Feb 27;9:49-56.

(8) Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. Acta Orthop 2014 Sep 19:1-12.

(9) Hetrick EM, Schoenfisch MH. Reducing implant-related infections: active release strategies. Chem Soc Rev 2006 Sep;35(9):780-789.

(10) Schmalzried TP, Amstutz HC, Au MK, Dorey FJ. Etiology of deep sepsis in total hip arthroplasty. The significance of hematogenous and recurrent infections. Clin Orthop Relat Res 1992 Jul;(280)(280):200-207.

(11) Schildhauer TA, Robie B, Muhr G, Koller M. Bacterial adherence to tantalum versus commonly used orthopedic metallic implant materials. J Orthop Trauma 2006 Jul;20(7):476-484.

(12) Kühn KD. PMMA Cements. Are we aware what we are using? Berlin Heidelberg: Springer Medizin; 2014.

(13) Buchholz HW, Elson RA, Engelbrecht E, Lodenkamper H, Rottger J, Siegel A. Management of deep infection of total hip replacement. J Bone Joint Surg Br 1981;63-B(3):342-353.

(14) Cui Q, Mihalko WM, Shields JS, Ries M, Saleh KJ. Antibiotic-impregnated cement spacers for the treatment of infection associated with total hip or knee arthroplasty. J Bone Joint Surg Am 2007 Apr;89(4):871-882.

(15) Betz M, Abrassart S, Vaudaux P, Gjika E, Schindler M, Billieres J, et al. Increased risk of joint failure in hip prostheses infected with Staphylococcus aureus treated with debridement, antibiotics and implant retention compared to Streptococcus. Int Orthop 2014 Sep 4.

(16) Disch AC, Matziolis G, Perka C. Two-stage operative strategy without local antibiotic treatment for infected hip arthroplasty: clinical and radiological outcome. Arch Orthop Trauma Surg 2007 Oct;127(8):691-697.

(17) Stevens CM, Tetsworth KD, Calhoun JH, Mader JT. An articulated antibiotic spacer used for infected total knee arthroplasty: a comparative in vitro elution study of Simplex and Palacos bone cements. J Orthop Res 2005 Jan;23(1):27-33.

(18) Bistolfi A, Massazza G, Verne E, Masse A, Deledda D, Ferraris S, et al. Antibiotic-loaded cement in orthopedic surgery: a review. ISRN Orthop 2011 Aug 7;2011:290851.

(19) Mutschler W., Frommelt L., Anagnostakos K., Trampuz A., Fink B., Perka C. Periprothetische Infektionen am Hüftgelenk - von der Forschung in die Klinik. AE-Bulletin 2010.

(20) Garvin KL, Hanssen AD. Infection after total hip arthroplasty. Past, present, and future. J Bone Joint Surg Am 1995 Oct;77(10):1576-1588.

(21) Fink B, Grossmann A, Fuerst M, Schafer P, Frommelt L. Two-stage cementless revision of infected hip endoprostheses. Clin Orthop Relat Res 2009 Jul;467(7):1848-1858.

(22) Breusch SJ., Kühn, KD.. [Bone cements based on polymethylmethacrylate]. Orthopäde 32(1), 41-50, 2003 .

(23) Diefenbeck M, Muckley T, Hofmann GO. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. Injury 2006 May;37 Suppl 2:S95-104.

(24) Spierings P. Bone Cements - Are They Different? In: Walenkamp G. (Ed.). Local Antibiotics in Arthroplasty: Georg Thieme Verlag, Germany; 2007. p. 31-39.

(25) Mjoberg B. Loosening of the cemented hip prosthesis. The importance of heat injury. Acta Orthop Scand Suppl 1986;221:1-40.

(26) Iarikov D, Demian H, Rubin D, Alexander J, Nambiar S. Choice and doses of antibacterial agents for cement spacers in treatment of prosthetic joint infections: review of published studies. Clin Infect Dis 2012 Dec;55(11):1474-1480.

(27) Jiranek WA, Hanssen AD, Greenwald AS. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. J Bone Joint Surg Am 2006 Nov;88(11):2487-2500.

(28) Hanssen AD. Prophylactic use of antibiotic bone cement: an emerging standard--in opposition. J Arthroplasty 2004 Jun;19(4 Suppl 1):73-77.

(29) Bourne RB. Prophylactic use of antibiotic bone cement: an emerging standard--in the affirmative. J Arthroplasty 2004 Jun;19(4 Suppl 1):69-72.

(30) Lewis G, Janna S, Bhattaram A. Influence of the method of blending an antibiotic powder with an acrylic bone cement powder on physical, mechanical, and thermal properties of the cured cement. Biomaterials 2005 Jul;26(20):4317-4325.

(31) Lewis G, Janna S. Estimation of the optimum loading of an antibiotic powder in an acrylic bone cement: gentamicin sulfate in SmartSet HV. Acta Orthop 2006 Aug;77(4):622-627.

(32) Frommelt L. Antibiotic Choices in Bone Surgery- Local Therapy using Antibiotic-Loaded Bone Cement. In: Walenkamp G. (Ed.). Local Antibiotics in Arthroplasty Germany: George Thieme Verlag; 2007. p. 59-64.

(33) Scott CP, Higham PA, Dumbleton JH. Effectiveness of bone cement containing tobramycin. An in vitro susceptibility study of 99 organisms found in infected joint arthroplasty. J Bone Joint Surg Br 1999 May;81(3):440-443.

(34) Qadir R, Sidhu S, Ochsner JL, Meyer MS, Chimento GF. Risk stratified usage of antibiotic-loaded bone cement for primary total knee arthroplasty: short term infection outcomes with a standardized cement protocol. J Arthroplasty 2014 Aug;29(8):1622-1624.

(35) Hendriks JG, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. Biomaterials 2004 Feb;25(3):545-556.

(36) Wahlig H, Dingeldein E. Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. Acta Orthop Scand 1980 Feb;51(1):49-56.

(37) Krause WR, Krug W, Miller J. Strength of the cement-bone interface. Clin Orthop Relat Res 1982 Mar;(163)(163):290-299.

(38) Kühn K. Antibiotic-Loaded Bone Cements - Antibiotic Release and Influence on Menchnical Properties. In: Walenkamp G. (Ed.). Local Antibiotics in Arthroplasty Stuttgart: George Thieme Verlag; 2007. p. 47-57.

(39) Frommelt L. KK. Properties of Bone Cement: Antibiotic-loaded cement. In: Breusch S, Malchau H (Eds.). The well-cemented Total Hip Arthroplasty: Springer; 2005. p. 86-92.

(40) Corona PS, Barro V, Mendez M, Caceres E, Flores X. Industrially prefabricated cement spacers: do vancomycin- and gentamicin-impregnated spacers offer any advantage? Clin Orthop Relat Res 2014 Mar;472(3):923-932.

(41) Tunney MM, Ramage G, Patrick S, Nixon JR, Murphy PG, Gorman SP. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from orthopedic implants following revision hip surgery. Antimicrob Agents Chemother 1998 Nov;42(11):3002-3005.

(42) van de Belt H, Neut D, van Horn JR, van der Mei HC, Schenk W, Busscher HJ. . . . Or Not to Treat? Nat Med 1999 Apr;5(4):358-359.

(43) Hope PG, Kristinsson KG, Norman P, Elson RA. Deep infection of cemented total hip arthroplasties caused by coagulase-negative staphylococci. J Bone Joint Surg Br 1989 Nov;71(5):851-855.

(44) Davis JS. Management of bone and joint infections due to Staphylococcus aureus. Intern Med J 2005 Dec;35 Suppl 2:S79-96.

(45) Goldenberg DL. Septic arthritis. Lancet 1998 Jan 17;351(9097):197-202.

(46) Chang Y, Chen WC, Hsieh PH, Chen DW, Lee MS, Shih HN, et al. In vitro activities of daptomycin-, vancomycin-, and teicoplanin-loaded polymethylmethacrylate against methicillin-susceptible, methicillin-resistant, and vancomycin-intermediate strains of Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2011 Dec;55(12):5480-5484.

(47) Appelbaum PC. MRSA--the tip of the iceberg. Clin Microbiol Infect 2006 Apr;12 Suppl 2:3-10.

(48) Rathbone CR, Cross JD, Brown KV, Murray CK, Wenke JC. Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity. J Orthop Res 2011 Jul;29(7):1070-1074.

(49) U. R. Schiefer. Antibiotika-haltige Knochenzemente: In vitro Untersuchungen der Freisetzungskinetiken und antimikrobiellen Wirkung. Justus-Liebig-Universität Gießen; 2004.

(50) Jamsen E, Stogiannidis I, Malmivaara A, Pajamaki J, Puolakka T, Konttinen YT. Outcome of prosthesis exchange for infected knee arthroplasty: the effect of treatment approach. Acta Orthop 2009 Feb;80(1):67-77.

(51) Ochsner P, Borens O, Bodler P, et al editors. Infektionen des Bewegungsapparates Grundlagen, Prophylaxe, Diagnostik und Therapie Herausgegeben durch die Expertengruppe „Infektionen des Bewegungsapparates“ der swiss orthopaedics und der Swiss Society for Infectious Diseases. 2nd ed. Grandvaux: Eigenverlag swiss orthopaedics; 2015.

(52) Elson RA, Jephcott AE, McGechie DB, Verettas D. Antibiotic-loaded acrylic cement. J Bone Joint Surg Br 1977 May;59(2):200-205.

(53) Goodell JA, Flick AB, Hebert JC, Howe JG. Preparation and release characteristics of tobramycin-impregnated polymethylmethacrylate beads. Am J Hosp Pharm 1986 Jun;43(6):1454-1461.

(54) Moojen DJ, Hentenaar B, Charles Vogely H, Verbout AJ, Castelein RM, Dhert WJ. In vitro release of antibiotics from commercial PMMA beads and articulating hip spacers. J Arthroplasty 2008 Dec;23(8):1152-1156.

(55) Squire MW, Ludwig BJ, Thompson JR, Jagodzinski J, Hall D, Andes D. Premixed antibiotic bone cement: an in vitro comparison of antimicrobial efficacy. J Arthroplasty 2008 Sep;23(6 Suppl 1):110-114.

(56) DiCicco M, Duong T, Chu A, Jansen SA. Tobramycin and gentamycin elution analysis between two in situ polymerizable orthopedic composites. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2003 Apr 15;65(1):137-149.

(57) Watanakunakorn C, Tisone JC. Synergism between vancomycin and gentamicin or tobramycin for methicillin-susceptible and methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. Antimicrob Agents Chemother 1982 Nov;22(5):903-905.

(58) Bertazzoni Minelli E, Caveiari C, Benini A. Release of antibiotics from polymethylmethacrylate cement. J Chemother 2002 Oct;14(5):492-500.

(59) Torrado S, Frutos P, Frutos G. Gentamicin bone cements: characterisation and release (in vitro and in vivo assays). Int J Pharm 2001 Apr 17;217(1-2):57-69.

(60) van de Belt H, Neut D, Uges DR, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, et al. Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release. Biomaterials 2000 Oct;21(19):1981-1987.

(61) Bertazzoni Minelli E, Benini A, Magnan B, Bartolozzi P. Release of gentamicin and vancomycin from temporary human hip spacers in two-stage revision of infected arthroplasty. J Antimicrob Chemother 2004 Feb;53(2):329-334.

(62) Davies JP, Jasty M, O'Connor DO, Burke DW, Harrigan TP, Harris WH. The effect of centrifuging bone cement. J Bone Joint Surg Br 1989 Jan;71(1):39-42.

(63) Dunne NJ, Hill J, McAfee P, Kirkpatrick R, Patrick S, Tunney M. Incorporation of large amounts of gentamicin sulphate into acrylic bone cement: effect on handling and mechanical properties, antibiotic release, and biofilm formation. Proc Inst Mech Eng H 2008 Apr;222(3):355-365.

(64) DeLuise M, Scott CP. Addition of hand-blended generic tobramycin in bone cement: effect on mechanical strength. Orthopedics 2004 Dec;27(12):1289-1291.

(65) van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJ. Influence of interfaces on microbial activity. Microbiol Rev 1990 Mar;54(1):75-87.