

Diplomarbeit

**Mikrobiologische Vergleichsuntersuchungen an
antibiotikahaltigen PMMA-Knochenzementen**

eingereicht von

Johannes Stadler

Geb. Dat.: 3.5.1981

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der/am

**Klinik für Orthopädie und orthopädische Chirurgie
Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin**

unter der Anleitung von

Prof. Dr. Klaus-Dieter Kühn

Dr. Clemens Kittinger

Ort, Datum

(Unterschrift)

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

Unterschrift

Vorwort

Aus generellem Interesse an dem Fachgebiet Orthopädie, habe ich mich für dieses Thema für meine Diplomarbeit entschieden. Zwar war mir der Begriff „Knochenzement“ aus Praktika in orthopädischen Abteilungen während meiner Studienzeit geläufig, dennoch konnte ich zu Beginn meiner Arbeit in keinsten Weise erahnen, in welches Spezialgebiet der Orthopädie ich mich vertiefen werde. Sehr erfreulich war, dass ich die Ergebnisse meiner Arbeit auf zwei nationalen (ÖGHMP, Salzburg und ÖGO-Sitzung, Hartberg) und einem internationalen (EORS, Amsterdam) Kongress im Jahr 2012 als Poster präsentieren durfte. Zudem wurde für den EBJIS 2012 in Montreux ein Abstract der vorliegenden Arbeit als Vortrag angenommen, der freundlicherweise stellvertretend von Herrn Dr. Clemens Kittinger im September 2012 dort präsentiert wurde.

Poster:

Österreichische Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin, 33. Jahrestagung, 21. – 24. Mai 2012, Salzburg

Comparable study of antibiotic release on commercially PMMA bone cements

J. Stadler¹, E. Marth¹, M. Lipp¹, A. Leithner¹, K.-D. Kühn¹, C. Kittinger¹

¹Medical University of Graz (Graz, Austria)

European Orthopaedic Research Society, 20th annual meeting, September 26-28, 2012, Amsterdam

Comparable study of antibiotic release on commercially PMMA bone cements

Johannes Stadler¹, Clemens Kittinger¹, Michaela Lipp¹, Andreas Leithner¹, Klaus-Dieter Kühn¹

¹Medical University of Graz, (Graz, Austria)

Österreichische Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie ÖGO Symposium - „Revisionen – Infektionen“ 5. und 6.10. 2012 Hartberg

Unterschiede in der Freisetzung von Antibiotika aus 10 verschiedenen PMMA-Knochenzementen.

Stadler J, Leithner A, Marth E, Kühn K D, Kittinger C

Univ.-Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Medizinische Universität Graz, Austria

Vortrag:

European Bone and Joint Infection Society 20 -22 September 2012 Montreux, Switzerland

Comparative Study of Antibiotic Release on Commercially PMMA Bone Cements

Clemens Kittinger¹, Egon Marth¹, Johannes Stadler¹, Michaela Lipp¹, Andreas Leithner¹, Klaus-Dieter Kühn¹

¹Medical University of Graz (Graz, Austria)

In der vorliegenden Arbeit wurden keine geschlechterneutralen Formulierungen verwendet. Die männliche Ausdrucksweise soll in keiner Form Frauen oder bestimmte Gruppen von Frauen diskriminieren, sondern dient ausschließlich der leichteren Lesbarkeit dieses Textes.

Danksagungen

Ich bedanke mich ganz besonders bei Herrn Dr. Clemens Kittinger für die immer freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Laborversuche, der Präsentation meines Posters auf dem ÖGHMP-Kongress in Salzburg und der wissenschaftlichen Betreuung der Diplomarbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Kühn bedanke ich mich für die Beschaffung der notwendigen Testmaterialien und für die wissenschaftliche Betreuung der Diplomarbeit.

Bei Frau Michaela Lipp bedanke ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der Laborversuche.

Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Leithner bedanke ich mich für die Präsentation meines Posters am EORS-Kongress in Amsterdam im September 2012.

Ein Dank gilt auch dem Institut für Hygiene (Vorstand Prof. Dr. Egon Marth) der medizinischen Universität Graz, für die Möglichkeit, die Laborversuche durchführen zu können.

Bei Frau Prof. Andrea Grisold bedanke ich mich für die Informationen die in Abbildung 1 dargestellt sind.

Herzliches Dankeschön meinen Eltern, Johann und Maria Stadler! Danke für die Geduld und Unterstützung während meiner gesamten Studienzzeit! Ohne Euch wäre es nicht möglich gewesen!

Zusammenfassung

Knochenzemente werden in der orthopädischen Chirurgie seit Jahrzehnten zur Verankerung von Prothesen verwendet. Diese Zemente bestehen aus einer Pulver- und aus einer flüssigen Komponente. Bei Vermischung dieser beiden Komponenten startet ein chemischer Prozess, der als radikalische Polymerisation bezeichnet wird, und der Zement härtet unter Wärmeabgabe aus. Die Verwendung von Antibiotika in den Knochenzementen soll einerseits die Entwicklung von Infektionen bei primären Prothesen verhindern, andererseits werden sie auch in der Revisionschirurgie als sogenannte Platzhalter (Spacer) eingesetzt. Die Antibiotika werden aus den Zementen durch Diffusion lokal freigesetzt. In dieser Studie wurden 10 verschiedene handelsübliche Knochenzemente in Bezug auf mögliche Unterschiede in der Freisetzung der enthaltenen Antibiotika in vitro untersucht.

Nach Herstellung von kleinen Formkörpern aus den verschiedenen Zementen erfolgte die Durchführung eines Agardiffusionstests mit verschiedenen klinisch relevanten Bakterien. Bei zwei Zementen wurden die Formkörper über 14 Tage in einen PBS-Puffer gelegt, die Eluate zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und zur Durchführung eines modifizierten Agardiffusionstests verwendet.

Alle getesteten Zemente erzeugten im Agardiffusionstest über die gesamte Testdauer von 7 Tagen messbare Hemmhöfe. Unabhängig der Menge der in den Zementen enthaltenen Antibiotika und deren Elutionsverhalten im Puffer konnten im Agardiffusionstest keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Knochenzementen gefunden werden. Exemplarisch wurden an den Zementen deren Eluate für den modifizierten Agardiffusionstest verwendet wurden jedoch signifikante Unterschiede in der Größe der Hemmhöfe beobachtet.

Die Ergebnisse im Agardiffusionstest geben einen Hinweis darauf, dass diese Testmethode zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den Zementen in Bezug auf ihre Antibiotikafreisetzung nicht geeignet ist. Da im anschließend durchgeführten Versuch mit den Eluaten der Zemente aber deutliche Unterschiede erkennbar sind, steht als mögliche Ursache für die nicht vorhandenen Unterschiede ein Diffusionsproblem beim herkömmlichen Agardiffusionstest zur Diskussion.

Abstract

Since several decades PMMA-bone cements are in use in orthopaedic surgery for fixing prostheses. PMMA bone cements are made by polymerization out of two components: a PMMA powder and the liquid monomer.

By mixing these components a chemical process starts and the bone cement begins to polymerize. This process is exothermic. There are two reasons for the usage of antibiotic loaded bone cements. On the one hand implant-related infections should be reduced and on the other hand an existing infection could be cured. The release of the antibiotics from bone cements is a diffusion process. Local high concentrations of antibiotics are needed for an early stage elimination of bacteria to avoid colonization of the surface and biofilm formation. In this study we tested 10 commercially available bone cements to characterize their release kinetics in vitro.

At first small discs were made from different bone cements, according to the manufacturers' instructions. These discs were used for an agar diffusion test with *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and various MRSA over seven days. Another Test (modified agar diffusion test) was performed with the eluates of two bone cements.

In the agar diffusion test all tested bone cements showed measurable inhibition areas over seven days. There were no differences between the various bone cements, regardless of the content of antibiotics and their elution profiles in buffer. The eluates from two bone cements which were used for a modified agar diffusion test produced considerable differences in the diameter of inhibition.

The tested bone cements showed very similar diameters in their inhibition areas. Differences in their antimicrobial activity as described in literature could not be found in the agar diffusion test. This leads to the assumption, that this method is not suitable for evaluating release rates of antibiotics from bone cements. Otherwise the eluates from two bone cements (Palacos® R+G and CMW 1G) produced considerable differences in inhibition areas in a modified agar diffusion test. To prove the reliability of the new test method higher numbers of experiments have to be carried out.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	ii
Zusammenfassung.....	v
Abstract.....	vi
Glossar und Abkürzungen.....	ix
Abbildungsverzeichnis.....	x
Tabellenverzeichnis.....	xii
1 Einleitung.....	1
1.1 PMMA-Knochenzemente.....	1
1.1.1 Bestandteile der Pulverkomponente.....	1
1.1.2 Bestandteile der Flüssigkeit.....	2
1.1.3 Polymerisation.....	2
1.2 Geschichte der Knochenzemente.....	3
1.3 Anwendungsgebiete von PMMA-Zementen.....	4
1.4 Knochenzemente mit Antibiotika.....	5
1.4.1 Anwendungsgebiete.....	5
1.4.2 Verwendete Antibiotika.....	5
1.4.3 Freisetzung der Antibiotika aus den Knochenzementen.....	7
1.4.4 Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften von Knochenzementen durch Antibiotika.....	8
1.5 Infektionen von orthopädischen Implantaten.....	9
1.5.1 Häufigkeit von Implantat-assoziierten Infektionen.....	9
1.5.2 Erreger von Implantat-assoziierten Infektionen.....	9
1.5.3 Entstehung von Implantat-assoziierten Infektionen - Biofilm.....	10
1.5.4 Prophylaxe von Implantat-assoziierten Infektionen.....	12
1.5.5 Therapie von Implantat-assoziierten Infektion.....	13
1.5.6 Mögliche Probleme bei der Verwendung von lokalen Antibiotika.....	15
1.6 Fragestellung - Ziel der Untersuchung.....	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Verwendete Knochenzemente.....	17
2.2 Herstellung von Formkörpern.....	17
2.3 Agardiffusionstest.....	18
2.3.1 Verwendete Bakterien.....	19
2.3.2 Herstellung einer Bakteriensuspension.....	19
2.3.3 Durchführung des Agardiffusionstests: 7-Tage.....	19
2.3.4 Durchführung des Agardiffusionstests: 24 Stunden.....	20
2.3.5 Messung.....	21
2.4 Epsilometertest (E-Test).....	21

2.5	Elutionsversuch.....	22
2.5.1	Herstellung von Formkörpern	22
2.5.2	Elution.....	22
2.5.3	Elutionstest.....	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Agardiffusionstest – 7 Tage.....	25
3.1.1	Knochenzemente mit Gentamicin	25
3.1.2	Knochenzemente mit Antibiotikakombinationen	26
3.1.3	Knochenzemente mit Antibiotikakombinationen - Testung mit verschiedenen MRSA-Stämmen	27
3.2	Agardiffusionstest – 24 Stunden	31
3.2.1	Knochenzemente mit Gentamicin, Tobramycin und Antibiotika- Kombinationen	31
3.3	Elutionstest.....	33
4	Diskussion.....	35
4.1	Agardiffusionstest.....	35
4.1.1	Antibiotikakombinationen.....	36
4.1.2	Mögliche Grenzen des Agardiffusionstests.....	38
4.2	Elutionstest.....	39
5	Literaturverzeichnis	41

Glossar und Abkürzungen

Agar: Nährmedium für Mikroorganismen

Agardiffusionstest: Zur Ermittlung der bakteriostatischen oder bakteriziden Wirkung von Antibiotika auf einen bestimmten Erreger.

Biofilm: Eine durch Mikroorganismen auf Oberflächen gebildete Schicht, die sich auch aus verschiedenen Spezies zusammensetzen kann. Biofilme erreichen einen hohen Grad an Widerstandsfähigkeit gegenüber der Umwelt und dem Immunsystem

Elution: Herauslösen von Antibiotika aus dem Knochenzement

Elutionstest: Elution der Antibiotika mit anschließendem Agardiffusionstest

EPS: Extrazelluläre polymere Substanzen

Eradikation: vollständige Eliminierung von Erregern

Formkörper: Aus Knochenzementen hergestellte Testplättchen mit 15mm Durchmesser und 3mm Dicke.

Hemmhof: Eine durch Antibiotika erzeugte, auf dem Agar makroskopisch sichtbare Wachstumshemmung von Bakterien

Inkubation: Anzucht oder Vermehrung von Mikroorganismen in einem Brutschrank mit konstanter Temperatur.

Laminar flow: Gerichtete Luftströmung zur Reduktion der Keimzahl im Operationsgebiet

MHK: Minimale Hemmkonzentration

MMA: Methylmethacrylat

Müller-Hinton-Agar: Das für die Bestimmung von Antibiotikaresistenzen zu verwendende spezielle mikrobiologische Nährmedium.

PMMA: Polymethylmethacrylat

Spacer: Anstelle einer Prothese (z.B. Hüftprothese) vorübergehend eingesetzter Platzhalter.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der identifizierten Bakterien aus Punktaten (Information Prof. Andrea Grisold, Institut für Hygiene, Graz)	10
Abbildung 2: Die zur Herstellung der Formkörper notwendigen Materialien.....	18
Abbildung 3a,b: Drehtisch mit Agarplatte (a) zur gleichmäßigen Verteilung der Bakteriensuspension. Agardiffusionstest mit Formkörper aus Knochenzement (b). Übertragung auf neue Agarplatte mittels Pinzette.....	20
Abbildung 4: Epsilometertest mit Clindamycin und den MRSA-Stämmen 02/39 (links) und 02/260 (rechts).....	22
Abbildung 5: Formkörper in 10,5ml Pufferlösung	23
Abbildung 6: Elutionstest mit dem 0,25-Stunden-Eluat von Palacos® R+G. Im Zentrum das mittels Pasteur-Pipette gestanzte Loch. Kreisförmige Wachstumshemmung von <i>Staphylococcus aureus</i> durch Gentamicin.....	24
Abbildung 7: Verlaufskurven der Hemmhofdurchmesser der untersuchten gentamicinhaltigen Zemente über 7 Tage. Testbakterium: <i>Staphylococcus aureus</i> . Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.....	25
Abbildung 8: Messung der Hemmhofgröße im Agardiffusionstest an 6 untersuchten Knochenzementen mit Gentamicin an 7 aufeinander folgenden Tagen. Testbakterium: <i>Staphylococcus epidermidis</i> . Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.....	26
Abbildung 9: Hemmhofdurchmesser der Zemente mit 2 verschiedenen Wirkstoffkombinationen (Gentamicin und Vancomycin oder Gentamicin und Clindamycin). Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.....	27
Abbildung 10: Hemmhofdurchmesser von verschiedenen MRSA-Stämmen nach Konfrontation mit einem Knochenzement mit 2 Wirkstoffen (Gentamicin und Vancomycin), der Antibiotika sensitive <i>Staphylococcus aureus</i> Laborstamm dient als Referenz. Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.....	28
Abbildung 11: Hemmhofdurchmesser von verschiedenen MRSA-Stämmen nach Konfrontation mit einem Knochenzement mit 2 Wirkstoffen (Gentamicin und Vancomycin), der Antibiotika sensitive <i>Staphylococcus aureus</i> Laborstamm dient als Referenz. Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.....	29
Abbildung 12: Hemmhofdurchmesser eines MRSA-Stammes nach Konfrontation mit Knochenzementen mit 2 verschiedenen Wirkstoffkombinationen (Gentamicin und Vancomycin oder Gentamicin und Clindamycin). Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.....	30
Abbildung 13: Hemmhofdurchmesser verschiedener MRSA-Stämme gegenüber Copal® G+C (Gentamicin und Clindamycin). Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten	31

Abbildung 14: Vergleich der Hemmhofdurchmesser verschiedener gentamicinhaltiger Knochenzemente in einem 24 Stunden Ansatz. Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten. Die Abweichungen bei den Hemmhofdurchmessern von SmartSet® GHV (2 und 3h Wert) sind durch nicht korrektes Entfernen bei jeweils einem der drei Formkörper entstanden. Die mittleren Hemmhofdurchmesser sind somit zu diesen Zeitpunkten zugunsten eines größeren Hemmhofes verfälscht.....	32
Abbildung 15: Vergleich der Hemmhofdurchmesser verschiedener antibiotikahaltiger Revisionszemente in einem 24 Stunden Ansatz. Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.....	32
Abbildung 16: Darstellung der mittleren Hemmhofdurchmesser (Testung mit Eluaten) von jeweils 3 Formkörpern Palacos® R+G sowie CMW 1G pro Knochenzement auf der Y-Achse. Die Zeitpunkte der Eluatentnahmen sind auf der X-Achse aufgetragen. Testkeim: <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Abbildung 17: Hemmhöfe im Elutionsexperiment mit CMW 1G über einen Tag. Testbakterium: <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Abbildung 18: Hemmhöfe im Elutionsexperiment mit Palacos® R+G über 1 Tag. Testbakterium: <i>Staphylococcus aureus</i>	34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übliche Zusammensetzung von Knochenzementen (1)	1
Tabelle 2: Notwendige physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften von Antibiotika die für Knochenzemente geeignet sind.....	6
Tabelle 3: In den Tests verwendete Knochenzemente.....	17
Tabelle 4: Resistenzen verschiedener MRSA-Stämme gegenüber Clindamycin, Gentamicin und Vancomycin. Die Werte geben die MHK in µg/ml an.....	28

1 Einleitung

1.1 PMMA-Knochenzemente

Bei einem Knochenzement handelt es sich um einen synthetischen, thermoplastischen Kunststoff aus Polymethylmethacrylat (PMMA). Ein sehr bekanntes Erzeugnis aus Polymethylmethacrylat ist *Plexiglas*[®]. Generell bestehen Knochenzemente aus einer Pulverkomponente und aus einer flüssigen Komponente. Werden die Flüssigkeit und das Pulver miteinander vermischt, startet eine chemische Reaktion und der Zement härtet unter Wärmeabgabe aus.

Tabelle 1 zeigt die übliche Zusammensetzung von Knochenzementen.

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

Tabelle 1: Übliche Zusammensetzung von Knochenzementen (1)

1.1.1 Bestandteile der Pulverkomponente

Wie in Tabelle 1 ersichtlich besteht die Pulverkomponente zum überwiegenden Teil aus PMMA. Setzt sich das PMMA aus nur einem Monomer (z.B. Methylmethacrylat) zusammen, so spricht man von Homopolymeren. Werden in die Polymerkette noch weitere Monomere eingebaut, entstehen Co-Polymere. So können in verschiedenen PMMA-Knochenzementen unterschiedliche Mischungen enthalten sein, z.B. Methacrylat- oder Styrol-Copolymere.

Um den verwendeten Knochenzement bei Röntgenaufnahmen für den Chirurgen sichtbar zu machen, ist dem Pulver ein Röntgenkontrastmittel beigemischt. Dafür werden Zirkoniumdioxid oder Bariumsulfat verwendet. Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist das Benzoylperoxid, ein Initiator, der gemeinsam mit dem Aktivator der Flüssigkeit die Polymerisation unter Raumtemperatur startet. Zur besseren Sichtbarkeit des Zements im Operationsgebiet färben manche Hersteller ihre Produkte mit einem Farbstoff.

Die Knochenzemente der Palacosfamilie (Palacos® R+G, Palacos® MV+G, Copal® G+C sowie Copal® G+V) enthalten sowohl im Pulver als auch in der Flüssigkeit den Farbstoff Chlorophyll, wodurch die Zementmatrix grün eingefärbt wird. Im Refobacin® Bone Cement R enthält nur die Flüssigkeitskomponente das Chlorophyll. Je nach Anwendung des jeweiligen Knochenzements können dem Pulver auch noch ein oder mehrere Antibiotika zugegeben werden.

1.1.2 Bestandteile der Flüssigkeit

Der Hauptbestandteil der flüssigen Komponente von Knochenzementen ist das Monomer Methylmethacrylat (MMA). Dieses wird während der radikalischen Polymerisation zu einer Polymerkette umgewandelt. Ebenfalls in der Flüssigkeit enthalten ist der Aktivator N,N-Dimethyl-p-toluidin. Dieser bewirkt gemeinsam mit dem Initiator der Pulverkomponente die Bildung von freien Radikalen, die die Polymerisation starten und die C-C Doppelbindung des MMA öffnen.

Hydrochinon wird der flüssigen Komponente als Stabilisator zugesetzt. Dieser soll eine vorzeitige Polymerisation, wie sie eventuell durch Hitze oder Licht auftreten kann, verhindern. Generell ist die Flüssigkeit farblos, entzündlich und hat einen sehr intensiven und charakteristischen Geruch. Manche Produzenten färben die Flüssigkeit mit Chlorophyll grün (s. 1.1.1).

1.1.3 Polymerisation

Der fertige, ausgehärtete Knochenzement entsteht durch Vermischung der Pulverkomponente mit der flüssigen Komponente. Unmittelbar nach dem Vermischen ist die Masse zähflüssig, später wird sie teigig und gut formbar, bis sie zum Schluss ganz fest geworden ist. Dieser Aushärtvorgang dauert je nach Temperatur ca. 8-10 Minuten. Je höher die Umgebungstemperatur bzw. die Zementkomponenten sind, desto schneller erfolgt die Aushärtung. Die chemische Reaktion die dabei vor sich geht, nennt man radikalische Polymerisation. Dabei bilden als Anfangsreaktion der Initiator (Benzoylperoxid) der Pulverkomponente und der Aktivator (N,N-Dimethyl-p-toluidin) der flüssigen Komponente Benzoeradikale.

Radikale sind Moleküle mit ungepaarten Elektronen und daher sehr reaktionsfreudig. Diese Radikale brechen die Doppelbindungen in den MMA-

Molekülen auf und addieren sich mit anderen MMA-Molekülen zu einer PMMA-Kette. Durch die vielen Radikale, die zu Beginn der Reaktion entstehen, werden viele solcher PMMA-Ketten ausgebildet. Der Kettenabbruch kann auf verschiedene Arten zustande kommen. Sehr häufig ist der Kettenabbruch durch Rekombination. Dabei verbinden sich zwei Radikale und aus ihren ungepaarten Elektronen entsteht ein bindendes Elektronenpaar. Somit sind sie keine Radikale mehr und daher auch nicht mehr reaktiv. Wird bei der Polymerisation nur eine Monomerart (z.B. MMA) umgesetzt so spricht man von einer Homopolymerisation. Werden in die wachsende Polymerkette verschiedene Monomere (z.B. MMA, Methylacrylat oder Butylmethacrylat) eingebaut, so handelt es sich um eine Copolymerisation.

Die Polymerisation ist eine exothermische Reaktion. Dementsprechend wird die Knochenzementmasse während der Aushärtung sehr warm. Die maximalen in-vitro Temperaturen liegen bei etwa 60-80° Celsius (2). Die Wärmeentwicklung im menschlichen Körper ist jedoch um ein Vielfaches geringer. Klinische Studien zeigten ein Temperaturmaximum von etwa 40-47° Celsius. Diese wurden an der Grenzfläche zwischen Knochen und Zement gemessen. Die Gründe dafür sind eine dünne Zementschicht (3), die Blutzirkulation (4), und die Wärmeableitung durch die Prothese (5) und das vitale Gewebe (6).

1.2 Geschichte der Knochenzemente

Die Erfindung von Polymethylmethacrylat, dem Ausgangsmaterial für die heute verwendeten Knochenzemente, geht auf Otto Röhm zurück. Seit Beginn des 20. Jahrhunderts beschäftigte er sich mit der Synthese und Polymerisation der Acrylate. Ende der 1920er wurde schließlich von Otto Röhm und seiner Firma Polymethylmethacrylat entwickelt und 1933 unter dem Namen Plexiglas® bekannt. Erste Produkte aus dem neu entwickelten Material waren Schutzbrillen, Gasmasken, Fenster im Zeppelin. Aber auch Zeichengeräte und Geschirr wurden daraus hergestellt.

1936 ließ die Firma Kulzer einen heiß-aushärtenden Teig patentieren, der durch Mischung von PMMA-Pulver mit flüssigem Methylmethacrylat (MMA) und einem wärmeempfindlichen Initiator hergestellt wurde. 1943 entwickelte die Firma Degussa und Kulzer den ersten kalthärtenden Zement (2). In der Medizin fand

PMMA zunächst hauptsächlich in der Zahnheilkunde Anwendung (7). Im orthopädischen Bereich verwendeten Scales und Herschell (1945) und die Brüder Judet (1950) PMMA zur Behandlung einer Coxarthrose beim Einbau einer Hüftprothese dieses Material (8,9). 1952 fixierte Haboush eine Hüftprothese mit PMMA (10). Nur wenige Jahre später (1960) berichtete Sir John Charnley über die erste erfolgreiche Verankerung einer Femurkopf-Prothese mit einem selbsthärtenden PMMA-Zement (11). Er nannte das Verankerungsmaterial „Knochenzement auf Acrylatbasis“.

Heute kommt PMMA in den verschiedensten Gebieten zum Einsatz. So wird es zum Beispiel in der Automobilindustrie für Blinker- und Rückleuchtengläser verwendet. Weiters werden daraus Brillengläser, Uhrgläser, Schüsseln für den Haushalt und auch Klebstoffe gefertigt. Das sind nur ein paar Beispiele für den Gebrauch von PMMA-Produkten.

1.3 Anwendungsgebiete von PMMA-Zementen

Auch heute wird PMMA in der Medizin überwiegend in der Zahnheilkunde und in der orthopädischen Chirurgie verwendet. Die Liste der herstellenden Firmen und derer Produkte hat sich seit den Anfängen stetig verlängert. Auf dem Gebiet der Zahnmedizin werden aus PMMA Provisorien, Füllungen, Kronen, Brücken und Prothesen gefertigt. Man verwendet es aber auch als Klebstoff. Im Bereich der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie werden mit PMMA-Zementen vorwiegend Wirbelkörperfrakturen behandelt. Dabei wird in den gebrochenen Wirbelkörper PMMA-Zement eingebracht und so der Wirbel wieder aufgerichtet.

In der orthopädischen Chirurgie werden Knochenzemente vorwiegend zur Verankerung von Prothesen (Hüftprothesen, Knieprothesen) verwendet. Es werden daraus aber auch sogenannte Spacer (Platzhalter) bei Revisionseingriffen gefertigt. Darüber hinaus können den Knochenzementen Antibiotika beigemischt werden und dienen dann als lokale Wirkstoffträger.

Werden Knochenzemente zur Verankerung von Endoprothesen (z.B. Hüftprothesen) verwendet, übernehmen sie bestimmte Funktionen:

- Fixierung des künstlichen Gelenkes
- Verankerung des Implantates am Knochen

- elastischer Puffer um die auftretenden Kräfte gleichmäßig vom Implantat auf den Knochen zu übertragen
- Freisetzung von Antibiotika (2)

1.4 Knochenzemente mit Antibiotika

1.4.1 Anwendungsgebiete

Vor mehr als 40 Jahren machten Buchholz und Engelbrecht (1970) zusammen mit der Fa. Kulzer die ersten Versuche zur Freisetzung von verschiedenen Antibiotika aus dem Knochenzement Palacos®. Von den verwendeten Antibiotika zeigte Gentamicin die besten Eigenschaften und Ergebnisse um im klinischen Alltag Anwendung zu finden. Bis heute ist Gentamicin das am häufigsten verwendete Antibiotikum als Zusatz zu Knochenzementen (12). Seit damals haben sich Knochenzemente mit Antibiotika in der orthopädischen Chirurgie als ein sehr wichtiges Hilfsmittel etabliert und gelten heute als Goldstandard in der Zementiertechnik. Infektionen von orthopädischen Implantaten sind eine schwerwiegende Komplikation, da sie erstens schwierig zu therapieren sind, zweitens dem Patienten erhebliche Beschwerden bereiten und drittens auch einen großen finanziellen Aufwand bedeuten. Ein besonderes Augenmerk liegt daher auf der Verhinderung solcher Infektionen. Ein entscheidender Schritt in der Entstehung von Implantat-assoziierten Infektionen, ist die Besiedelung der Prothese mit Bakterien. Durch die lokale Freisetzung der Antibiotika aus den Knochenzementen soll die Anlagerung von Bakterien auf der Implantatoberfläche verhindert werden. Hat sich aber bereits eine Infektion ausgebildet, so können diese hohen lokalen Antibiotikakonzentrationen einen entscheidenden Beitrag zur Therapie leisten.

1.4.2 Verwendete Antibiotika

Bis heute wurden etliche Antibiotika für den Gebrauch als Zusatz zu PMMA-Knochenzementen getestet. Jedoch erfüllen nur einige dieser Substanzen die Anforderungen um den Zementen beigemischt zu werden. Geeignete Antibiotika benötigen gewisse physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften um

Verwendung in einem Knochenzement zu finden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über diese Eigenschaften (13).

Physikalisch-chemische Eigenschaften	Biologische Eigenschaften
gut wasserlöslich	breites antibakterielles Wirkspektrum inklusive gram-positiver und gram-negativer Bakterien
sterilisierbar durch Gamma-Bestrahlung oder Begasung mit Ethylenoxid	guter bakterizider Effekt in niedriger Konzentration
hitzestabil und chemisch inaktiv während der Polymerisation	geringe Anzahl von primär resistenten Bakterien
kein oder nur geringer Einfluss auf die mechanische Festigkeit des Knochenzements	geringe Rate an Resistenzbildung
leichte Freisetzung aus dem ausgehärteten Zement	geringe Proteinbindung
stabil während der Lagerung des fertigen Zements bis zum Gebrauch	niedrige allergene Potenz

Tabelle 2: Notwendige physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften von Antibiotika die für Knochenzemente geeignet sind.

Das am häufigsten in Knochenzementen verwendete Antibiotikum ist Gentamicinsulfat, da es die in Tabelle 2 aufgeführten notwendigen Eigenschaften von allen Antibiotika am besten besitzt. Gentamicinsulfat gehört in die Gruppe der Aminoglykosid-Antibiotika. Die (konzentrationsabhängige) bakterizide Wirkung kommt durch die Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese zustande. Es ist aufgrund der fünf Aminogruppen gut wasserlöslich, kann allerdings nicht aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert werden und muss daher parenteral verabreicht werden. Es besitzt eine geringe therapeutische Breite. Mögliche Nebenwirkungen von Gentamicin sind eine Nierenschädigung durch eine kontinuierliche Anreicherung in der Nierenrinde (Nephrotoxizität) und eine Schädigung des Gehör- und Gleichgewichtssinnes (Ototoxizität) durch eine irreversible Zerstörung der Haarzellen des Innenohres.

Ebenfalls über eine Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese wirken die Antibiotika Tobramycin (Aminoglykosid) und Clindamycin (Lincosamin).

Clindamycin besitzt eine gute Gewebegängigkeit, vor allem in Knochen und Weichteile und wird daher auch bevorzugt bei Osteomyelitis eingesetzt.

Über eine Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese wirkt das Antibiotikum Vancomycin (Glykopeptid). Es wirkt nur gegen gram-positive Keime und kann aufgrund seines hohen Molekulargewichtes nur parenteral verabreicht werden. Es gilt als wichtiges Reserveantibiotikum gegen multiresistente gram-positive Erreger wie zum Beispiel *Staphylokokken* (v.a. *Methicilin resistenter Staphylococcus aureus* – *MRSA*). Bei hohen Plasmaspiegeln besitzt Vancomycin ebenso wie Gentamicin eine schädliche Wirkung auf Nieren und Ohren.

1.4.3 Freisetzung der Antibiotika aus den Knochenzementen

Das Herauslösen von Antibiotika aus der Knochenzementmatrix ist ein Diffusions- und Oberflächenprozess (2). Verschiedene Faktoren haben wesentlichen Einfluss darauf, wie viel Antibiotikum aus dem Zement gelöst werden kann. Eine entscheidende Rolle spielt die Fähigkeit zur Wasseraufnahme eines Zements (2). Je hydrophiler die Polymermatrix und die Eigenschaften eines Knochenzements sind, desto leichter kann Wasser in die Zementmatrix eindringen und das Antibiotikum lösen. Die Wasseraufnahme in einen Zement ist aber auch von Poren und einer gewissen Rauigkeit der Zementoberfläche abhängig. Durch die Poren kann das Wasser in die Matrix eindringen und das Antibiotikum oberflächlich herauslösen (14). Ein weiterer Faktor der Einfluss auf die Antibiotikafreisetzung nimmt, ist die Größe der Oberfläche des Zementes (15). Steht mehr Oberfläche für den Diffusionsprozess zur Verfügung, so kann auch mehr Antibiotikum gelöst werden. Antibiotika werden nur aus einer dünnen Schicht aus der Oberfläche gelöst, und der Großteil der Menge wird während der Lebenszeit eines Knochenzements gar nicht freigesetzt (2).

Wahlig und Dingeldein (1980) konnten in einer Studie zeigen, dass einerseits Gentamicin über eine Dauer von 5 Jahren subinhibitorisch aus Palacos® R freigesetzt wird und andererseits in diesem Zeitraum nur 3 - 8 % der gesamten Gentamicinkonzentration eluiert werden konnte (16).

1.4.4 Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften von Knochenzementen durch Antibiotika

Bei Verankerung von Endoprothesen durch PMMA-Knochenzemente im menschlichen Körper, sind die Zemente verschiedenen physikalischen Kräften ausgesetzt. Auftretenden Druckbelastungen können PMMA-Zemente besser standhalten als ebenfalls vorkommenden Zugbelastungen. Verschiedene Faktoren beeinflussen die mechanischen Eigenschaften der Knochenzemente. Durch die Verwendung von verschiedenen Copolymeren kann die Formbarkeit verändert werden. So erhält zum Beispiel ein PMMA-Zement durch die Verwendung von Methylacrylat (als Copolymer) ein verbessertes elastisches Verhalten, während der Zusatz von Styrol (als Copolymer) das Material in seiner Sprödigkeit erhöht (1). Auch die Art des Mischens kann die Festigkeit von Knochenzementen beeinflussen. So kann durch Vakuum-Mischen eine 30%ige Steigerung der statischen (plastischen) Festigkeit und der Bruchdehnung erreicht werden, sowie die Langlebigkeit im Ermüdungsversuch um das 10fache gesteigert werden (17). Werden dem Knochenzement nun Antibiotika beigemischt, so nehmen diese ebenfalls Einfluss auf die mechanische Festigkeit. Der Grund dafür ist, dass die Antibiotikapartikel nicht in die Polymermatrix eingebaut werden, und daher wie ein Fremdkörper im ausgehärteten Zement agieren (13).

Jedoch ist der Antibiotikagehalt in industriell gefertigten Knochenzementen gering und variiert zwischen 1,25 und 2,5 Gewichtsprozent. Der Zusatz von Antibiotika reduziert zwar die mechanische Festigkeit von PMMA-Zementen, jedoch ist diese Schwächung klinisch nicht relevant (13). Kritisch zu beurteilen ist die Mischung des Antibiotikums mit dem Knochenzementpulver durch den Chirurgen selbst. Dies kann zu einer inhomogenen Mischung des Zementes und zur Schwächung der Zementmatrix führen (13).

1.5 Infektionen von orthopädischen Implantaten

1.5.1 Häufigkeit von Implantat-assoziierten Infektionen

Jeder chirurgische Eingriff birgt ein Infektionsrisiko. Bakterielle Infektionen von orthopädischen Implantaten sind bis heute eine sehr ernsthafte aber seltene Komplikation in der orthopädischen Chirurgie. Denn sie verursacht nicht nur erhebliche Beschwerden und einen oft langen Krankenhausaufenthalt des Patienten, sondern stellt auch den Chirurgen vor eine besondere Herausforderung. Trotz der prophylaktischen, intraoperativen systemischen Antibiotikagabe, strikten Hygieneprotokollen und der Verwendung von Laminar flow, liegt die Infektionsrate in der orthopädischen Chirurgie bei 1-3% (18,19). In der Hüftendoprothetik beträgt die Infektionsrate trotz verbesserter chirurgischer Technik und Implantat-Design 0,8-1,2% (20). Von den 2,6 Millionen orthopädischen Implantaten die jährlich in den USA eingesetzt werden, infizieren sich in etwa 112000, das sind 4,3%(21).

1.5.2 Erreger von Implantat-assoziierten Infektionen

Die am häufigsten identifizierten Erreger, die Implantat-assoziierte Infektionen hervorrufen sind *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* (22,23). Diese beiden Bakterien gemeinsam sind verantwortlich für bis zu 60% aller Hüftprotheseninfektionen seit 1980 (22). *Staphylococcus epidermidis* ist häufig an Infektionen von Polymer-Materialien beteiligt (24), wohingegen *Staphylococcus aureus* meistens für Infektionen von metallischen Implantaten verantwortlich ist (14). Andere Keime die mit Implantat-assoziierten Infektionen im Zusammenhang stehen sind gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und Bakterien aus der Proteus-Gruppe (z.B. *Proteus mirabilis* und *Proteus vulgaris* (22). In der routinemäßig durchgeführten Bakterienkultivierung in Krankenhauslabors, wird häufig nur ein ursächlicher Erreger von infizierten Implantaten gefunden. Werden aber aufwendigere Kultivierungstechniken verwendet, so scheinen diese Infektionen durch mehrere Keime verursacht zu sein (25,26). Das Verteilungsmuster der infektionsverursachenden Bakterien in Graz ist in der Abbildung 1 dargestellt.

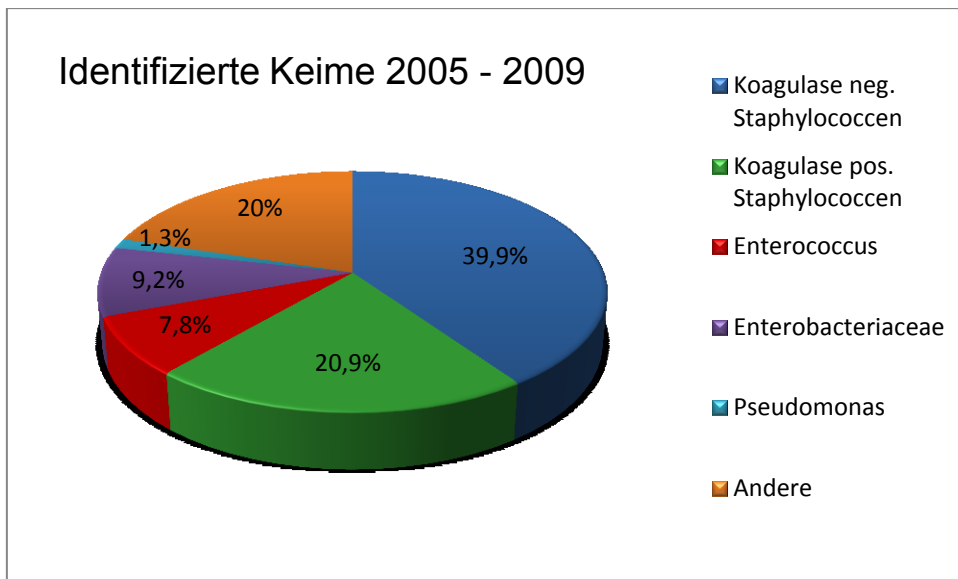


Abbildung 1: Verteilung der identifizierten Bakterien aus Punkttaten (Information Prof. Andrea Grisold, Institut für Hygiene, Graz)

1.5.3 Entstehung von Implantat-assoziierten Infektionen - Biofilm

Es gibt eine Vielzahl an verschiedenen Biomaterialien die heutzutage in der Medizin im oder am Menschen verwendet werden. Die Aufgabe von solchen Biomaterialien ist der Ersatz von krankhaften Körperteilen oder die Unterstützung bei Heilungsprozessen. Beispiele hierfür sind künstliche Herzklappen, Gefäßprothesen, Nägel oder Platten zur Knochenstabilisierung sowie künstliche Gelenke. Jedoch birgt die Anwendung solcher Biomaterialien insbesondere im Körper auch immer das Risiko, infektiösen Mikroorganismen als Rückzugsgebiet zu dienen (24). Diese Organismen können die Prothesen auf zwei Arten erreichen. Erstens durch direkte Kontamination während der Operation, d.h. Keime von der Hautflora des Patienten, des Operationspersonals oder von kontaminierter Luft im Operationssaal (25). Weitere potentielle Quellen für infektiöse Organismen sind kontaminierte chirurgische Instrumente, Haut, Schleim oder die Kleidung vom Operationspersonal. Eine direkte Kontamination der offenen Wunde löst in den meisten Fällen eine frühe Infektion (Aufreten innerhalb der ersten 3 postoperativen Monate) des Implantates aus (27).

Die zweite Möglichkeit wie Implantate von Mikroorganismen erreicht werden können ist über den Blutstrom. Bei dieser sogenannten hämatogenen Infektion

transportieren entweder das Blut oder die lymphatischen Gefäße die Pathogene von einem anderen Infektionsherd im Körper (z.B. Entzündungen des Zahnfleisches oder der Harnwege, einfache Kratzer und Schnitte der Haut) zum Implantat. Hämatogen verursachte Infektionen manifestieren sich typischerweise erst später (Spätinfektionen) (28). Mit einer Inzidenz von 0,3-7% spielen hämatogen verursachte Infektionen in der orthopädischen Chirurgie jedoch eine untergeordnete Rolle (29,30).

Eine entscheidende Rolle in der Infektion von orthopädischen Implantaten spielt die Fähigkeit der Bakterien, sich in einem sogenannten Biofilm zu organisieren. Die bakterielle Anhaftung und die nachfolgende Organisation zu einem Biofilm finden in mehreren Stadien statt. Die früheste Phase und die möglicherweise klinisch am wichtigsten, ist der sogenannte „Wettlauf zur Oberfläche“. Ein Wettbewerb zwischen Gewebezellintegration und der bakteriellen Anhaftung auf der gleichen Oberfläche (24). Werden die Implantate nun in den Körper eingesetzt, so wird deren Oberfläche sofort mit einem Film aus Makromolekülen des Körpers überzogen. Die Art der Moleküle ist abhängig von der Umgebung, in welche das Implantat eingesetzt wird. Der Prozess in der sich dieser dünne Film ausbildet geschieht innerhalb von Sekunden wenn ein Biomaterial einer biologischen Umgebung ausgesetzt wird. Orthopädische Implantate sind meistens in Kontakt mit Knochen und kommen daher in direkten Kontakt mit Blut. Daher können Plasmaproteine diese erste Schicht ausbilden. Das bedeutet, dass sich Mikroorganismen in den meisten Fällen an einen bereits gebildeten Film auf der Oberfläche der Prothese anheften und nur selten sich an das blanke Biomaterial anlagern (14). Haben sich die Bakterien nun auf der Oberfläche festgesetzt, beginnen sie mit der Produktion von sogenannten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS). Diese EPS lassen die Bakterien in einem Verband zusammenhaften, verankern sie fest auf dem Biomaterial und bilden zudem eine schützende Hülle über den Bakterien aus. Dieser Mantel aus EPS schützt die Bakterien im Biofilm einerseits gegen das körpereigene Immunsystem, andererseits aber auch gegen Antibiotika. Zudem reduzieren die Bakterien im Biofilm ihre metabolische Aktivität und verlängern so ihre Überlebensdauer (31). Costerton et al. (1995) fanden eine 800-fach erhöhte MHK in adhäsiven *Pseudomonas aeruginosa* verglichen mit nicht adhäsiven Bakterien (32). In einem

letzten Schritt der Biofilm-Entstehung können sich Bakterien in peripheren Gebieten des sich erweiternden Biofilms ablösen. Dies spielt eine große Rolle in der Pathogenese von septischen Prozessen (14). Aufgrund der Schwierigkeit, Bakterien in einem formierten Biofilm zu bekämpfen, gilt die Verhinderung der Anlagerung der Bakterien an das Biomaterial als wichtigster Schritt bei der Verhinderung von Implantat-assoziierten Infektionen.

1.5.4 Prophylaxe von Implantat-assoziierten Infektionen

Aufgrund der schwierigen Therapie von Infektionen von orthopädischen Implantaten, den hohen Belastungen denen die Patienten ausgesetzt sind und nicht zuletzt der hohen Kosten, die die Therapie solcher Infektionen verursachen, gilt in der orthopädischen Chirurgie ein besonderes Augenmerk der Vermeidung von Implantat-assoziierten Infektionen. Dabei können verschiedene Strategien verfolgt werden:

1.5.4.1 Systemische Verwendung von Antibiotika

Eine Möglichkeit Implantat-assoziierte Infektionen zu reduzieren besteht in der prophylaktischen systemischen Anwendung von Antibiotika. Entscheidend dabei ist, welche Antibiotika verwendet werden und zu welchem Zeitpunkt sie verwendet werden:

- Auswahl der Antibiotika nach den häufigsten Keimen die die Haut und Mukosa kontaminieren, da diese bei der Operation eingeschnitten werden.
- Es ist notwendig während der Operation hohe Antibiotikakonzentrationen zu erreichen. Der beste Moment dafür ist die intravenöse Antibiotikagabe 15-30 Minuten vor Operationsbeginn.
- Die Verabreichung einer präoperativen Antibiotikadosis ist wahrscheinlich ausreichend (27).

Das geringste Risiko eine tiefe Infektion zu entwickeln, wurde durch die prophylaktische systemische Gabe von Antibiotika in Kombination mit lokalen Antibiotika in Knochenzementen erreicht. Patienten mit alleiniger systemischer Antibiotikagabe, hatten ein 1,8fach höheres Risiko für eine Revision durch Infektion (33).

1.5.4.2 Verwendung von antibiotikahaltigen Knochenzementen

Wie oben erwähnt, gilt die Vermeidung der Anlagerung der Bakterien an das Implantat als einer der wichtigsten Schritte in der Prophylaxe von Infektionen. Werden orthopädische Implantate mittels Knochenzement im Körper verankert, so können den Zementen Antibiotika beigemischt werden, die dann lokal freigesetzt werden und die Bildung eines Biofilms verhindern sollen. Bereits 1970 berichteten Buchholz und Engelbrecht über eine Reduktion der tiefen Infektionen beim Einbau von primären Hüftprothesen, indem sie dem Knochenzement Palacos® R verschiedene Antibiotika beigemischt hatten (12). Nach diesen anfänglich berichteten Erfolgen wurde vermehrt an dieser Möglichkeit der Prophylaxe geforscht. Jedoch waren die Ergebnisse nicht einheitlich. Manche Autoren befürworteten die prophylaktische Anwendung von antibiotikahaltigen Knochenzementen (34,35) andere hingegen fanden keinen positiven Effekt zur Vermeidung von Infektionen (36). Eine neuere Arbeit zeigt jedoch wiederum einen signifikanten Vorteil in der prophylaktischen Anwendung von Antibiotika in Knochenzementen (33).

1.5.5 Therapie von Implantat-assoziierten Infektion

Eine Infektion von orthopädischen Implantaten ist schwierig zu behandeln. Mögliche Faktoren die die Therapie erschweren sind,

- eine immuninkompetente Zone um das Implantat herum (37)
- eine gegenüber Antibiotika reduzierte Sensitivität von Bakterien die in einem Biofilm wachsen (38) und
- eine geringe Verfügbarkeit von Antibiotika am Ort der Infektion bei systemischer Verabreichung (28).

Das Ziel in der Therapie von Implantat-assoziierten Infektionen ist die Eradikation der Infektion und die Erlangung eines schmerzfreien und funktionellen Gelenkes. Um dieses Ziel zu erreichen ist eine Kombination aus chirurgischer und antimikrobieller Therapie notwendig. Nach dem zeitlichen Verlauf werden zwei grundlegende Vorgangsweisen unterschieden. Bei einem einzeitigen Prothesenwechsel erfolgen die Entfernung der infizierten Prothese, die

Wundreinigung (Débridement) und der Einbau einer neuen Prothese innerhalb einer Operation. Bei einem zweizeitigen Vorgehen wird zunächst in einer ersten Operation das alte Implantat entfernt und das Débridement durchgeführt. Anschließend folgt eine Periode mit antimikrobieller Therapie. Nach erfolgreicher Therapie der Infektion wird in einer zweiten Operation eine neue Prothese implantiert. Die Wahl zwischen einzeitigem und zweizeitigem Wechsel sowie Art und Dauer der antibiotischen Therapie sind schlecht standardisiert und zu einem großen Anteil von der persönlichen Erfahrung des Chirurgen abhängig (28). Sowohl beim einzeitigen als auch beim zweizeitigen Prothesenwechsel, ist für eine erfolgreiche Therapie der Infektion ganz entscheidend, dass lokal eine hohe Konzentration an Antibiotika vorhanden ist. Mit Antibiotika gemischte PMMA-Knochenzemente sind hier ein sehr wichtiges Hilfsmittel. Buchholz et al. (1981) berichteten, dass durch die Anwendung von antibiotikahaltigen Knochenzementen, eine Steigerung der Erfolgsrate in der Revisionschirurgie auf 77% beim einzeitigen Wechsel und auf 90 % beim zweizeitigen Wechsel erzielt werden konnte (39). Ein Problem beim zweizeitigen Vorgehen ist, dass zwischen dem Entfernen der alten Prothese und dem Einbau der neuen, für eine bestimmte Zeit keine Überbrückung zwischen Femurschaft und Hüftgelenkspfanne besteht. Dies führt zu einer Kontraktur von Weichteilgewebe, Instabilität der Extremität und daher Immobilität des Patienten mit Muskelabbau (40). Es gibt daher die Möglichkeit aus antibiotikahaltigen Knochenzementen sogenannte Platzhalter (Spacer) herzustellen und damit die Zeit bis zur Implantation der neuen Prothese zu überbrücken. Sie dienen daher nicht nur der lokalen Infektionstherapie, sondern verhindern auch eine Kontraktion des Weichteilgewebes und verleihen der Extremität Stabilität. Weitere Möglichkeiten zur lokalen Antibiotikatherapie sind die Verwendung von Gentamicin-PMMA-Ketten und Kollagenschwämmen mit Gentamicin. Eine alternative Behandlungsmöglichkeit bei Implantat-assoziierten Infektionen, ist eine alleinige antibiotische Langzeittherapie. Allerdings ist diese Variante Patienten vorbehalten, die entweder nicht operationstauglich sind oder weitere chirurgische Verfahren ablehnen (28,41).

1.5.6 Mögliche Probleme bei der Verwendung von lokalen Antibiotika

1.5.6.1 Resistenzentwicklung von Bakterien

Antibiotika werden aus Knochenzementen anfänglich (Stunden bis wenige Tage) in hoher Konzentration freigesetzt. Danach werden nur mehr geringe Mengen von Antibiotikum aus den Zementen herausgelöst, allerdings kann dies über mehrere Jahre andauern (16). Diese lang anhaltende Freisetzung von geringen Mengen an Antibiotikum, kann für die Entwicklung von resistenten Bakterienstämmen verantwortlich sein (27,42-44). 1989 konnten Hope et al. zeigen, dass bei 90% der Patienten mit infizierten Hüftprothesen, deren primäres Implantat mit gentamicin-beladenen Knochenzementen fixiert worden war, mindestens ein infektiöser resistenter Staphylokokkenstamm gefunden werden konnte (45).

1.5.6.2 Überempfindlichkeitsreaktionen

Überempfindlichkeitsreaktionen des menschlichen Körpers gegenüber verabreichten Antibiotika können nie mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Anders als z.B. Beta-Lactam-Antibiotika besitzen die am häufigsten in Knochenzementen verwendeten Antibiotika allerdings eine sehr geringe allergene Potenz.

1.5.6.3 Toxische Effekte

Aminoglykosid-Antibiotika können eine Schädigung der Niere und des Gehör- und Gleichgewichtssinnes verursachen. Bei einmaliger Verabreichung von Gentamicin und dem damit verbundenen kurzfristigen hohen Serumspiegel, spielt in der Entstehung der Nebenwirkungen nicht die entscheidende Rolle. Vielmehr sind über längere Zeit andauernde niedrigere Serumkonzentrationen von Gentamicin für die Schädigungen verantwortlich. Der hauptsächliche Vorteil der direkten Freisetzung von Antibiotika am Implantat liegt darin, dass lokal hohe Konzentrationen erreicht werden können, ohne dabei systemische toxische Grenzwerte zu überschreiten (46). Die meisten Autoren sind sich darüber einig, dass die lokale Anwendung von Gentamicin in Knochenzementen zu keinen Schädigungen an Niere und Ohren führt (13,47). Als Beweis dafür kann der gute nachweisbare lokal hohe Gentamicin - Spiegel herangezogen werden, während im Urin und im Blut zum gleichen Zeitpunkt nur äußerst geringe Mengen gefunden werden können. So können nach Wahlig und Dingeldein (1980) postoperativ (nach

24h) lokal rund 120 µg/ml im Wundsekret nachgewiesen werden, wohingegen die Serumspiegel bei 0,20 µg/ml liegen (16).

1.6 Fragestellung - Ziel der Untersuchung

Seit rund 40 Jahren gibt es Knochenzemente mit Antibiotika auf dem Markt. Im Laufe der Zeit sind viele Hersteller dazugekommen, die solche Produkte anbieten. Bislang existieren aber kaum Arbeiten, die die gebräuchlichsten Knochenzemente in Hinblick auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit miteinander vergleichen. In der hier vorliegenden Arbeit sollen 10 handelsübliche Knochenzemente auf die Freisetzung des enthaltenen Antibiotikums in vitro getestet und miteinander verglichen werden. Neben Zementen die ein Antibiotikum (Gentamicin oder Tobramycin) enthalten, werden hier aber auch Zemente mit Antibiotika-Kombinationen getestet (Gentamicin +Vancomycin, Gentamicin + Clindamycin).

Folgende Fragen soll diese Studie klären:

- Setzen alle Knochenzemente das enthaltene Antibiotikum in ausreichender Konzentration frei, um das Bakterienwachstum in vitro zu hemmen?
- Über welchen Zeitraum werden diese Konzentrationen erreicht?
- Bestehen Unterschiede zwischen den Knochenzementen in der Freisetzung bezüglich des zeitlichen Verlaufs? Wann ist das Maximum der Freisetzung und unterscheiden sich dabei die Zemente?
- Bewirken Antibiotika-Kombinationen eine stärkere Hemmung des Bakterienwachstums als Knochenzemente mit einem Antibiotikum?
- Gibt es Unterschiede zwischen den beiden Antibiotika-Kombination im Bezug auf die Hemmung des Bakterienwachstums?
- Die verschiedenen Knochenzemente enthalten nicht alle die gleiche Menge an Antibiotikum. Bei manchen ist in 40g Pulver 0,5g des Antibiotikums enthalten bei anderen ist es hingegen 1g Antibiotikum auf 40g Pulver. Ist bei der doppelten Menge an Antibiotikum auch eine stärkere Hemmung des Bakterienwachstums zu sehen?
- Aus Elutionsversuchen in Pufferlösungen ist bekannt, dass Knochenzemente das enthaltene Antibiotikum ganz unterschiedlich gut freisetzen (2). Sind die Ergebnisse des Elutionsversuches mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen vergleichbar?

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Knochenzemente

In Tabelle 3 sind die in dieser Studie getesteten Knochenzemente aufgelistet. Insgesamt wurden 10 verschiedene Zemente von 6 Herstellern untersucht. 6 Knochenzemente enthalten das Antibiotikum Gentamicin, einer Tobramycin, zwei die Antibiotikakombination Gentamicin + Vancomycin und einer die Kombination Gentamicin + Clindamycin.

Produkt	Hersteller	Antibiotikum	Antibiotikagehalt
Smartset [®] GHV	DePuy	Gentamicin	1g in 40g Pulver
CMW 1G	DePuy	Gentamicin	1g in 40g Pulver
Palacos [®] R+G	Heraeus	Gentamicin	0,5g in 40g Pulver
Palacos [®] MV+G	Heraeus	Gentamicin	0,55g in 40g Pulver
Refobacin [®] Bone Cement R	Biomet [®]	Gentamicin	0,5g in 40,8g Pulver
Cemex [®] Genta HV	Tecres [®]	Gentamicin	1g in 40g Pulver
Antibiotic Simplex [®] T	Stryker [®]	Tobramycin	1g in 41g Pulver
Vancogenx [®]	Tecres [®]	Gentamicin, Vancomycin	1g/1g in 40g Pulver
Copal [®] G+V	Heraeus	Gentamicin, Vancomycin	0,5g/2g in 43g Pulver
Copal [®] G+C	Heraeus	Gentamicin, Clindamycin	1g/1g in 42,7g Pulver

Tabelle 3: In den Tests verwendete Knochenzemente

2.2 Herstellung von Formkörpern

Zunächst wurden aus den in Tab. 1 aufgeführten Knochenzementen kleine Testplättchen (Formkörper) mit einem Durchmesser von 15mm und einer Dicke von 3mm hergestellt. Dazu wurde für alle Zemente eine Originalpackung der Pulverkomponente (40g) mit der dazugehörigen Flüssigkeit (Monomer) verwendet. Je nach Herstellerangaben wurde entweder die Pulverkomponente der Flüssigkeit zugegeben oder die Flüssigkeit der Pulverkomponente. Alle Zemente wurden mit der Hand und unter Luftdruck bei Raumtemperatur (24°C) in einem Keramikgefäß mit einem Metallspatel vermischt. Die Dauer des Mischens richtete sich ebenfalls nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die teigige Masse mit

dem Metallspatel auf 3 Silikonformen (pro Form 8 Testplättchen) aufgetragen und mit einer Kunststoffolie abgedeckt. Sofort danach wurden die mit Knochenzement gefüllten Silikonformen mit einem konstantem Gewicht belastet. Nach 20 Minuten wurden die ausgehärteten Formkörper entnommen und in verschließbaren Kunststoffbehältern bei einer Raumtemperatur von 24° Celsius bis zur weiteren Verwendung gelagert.

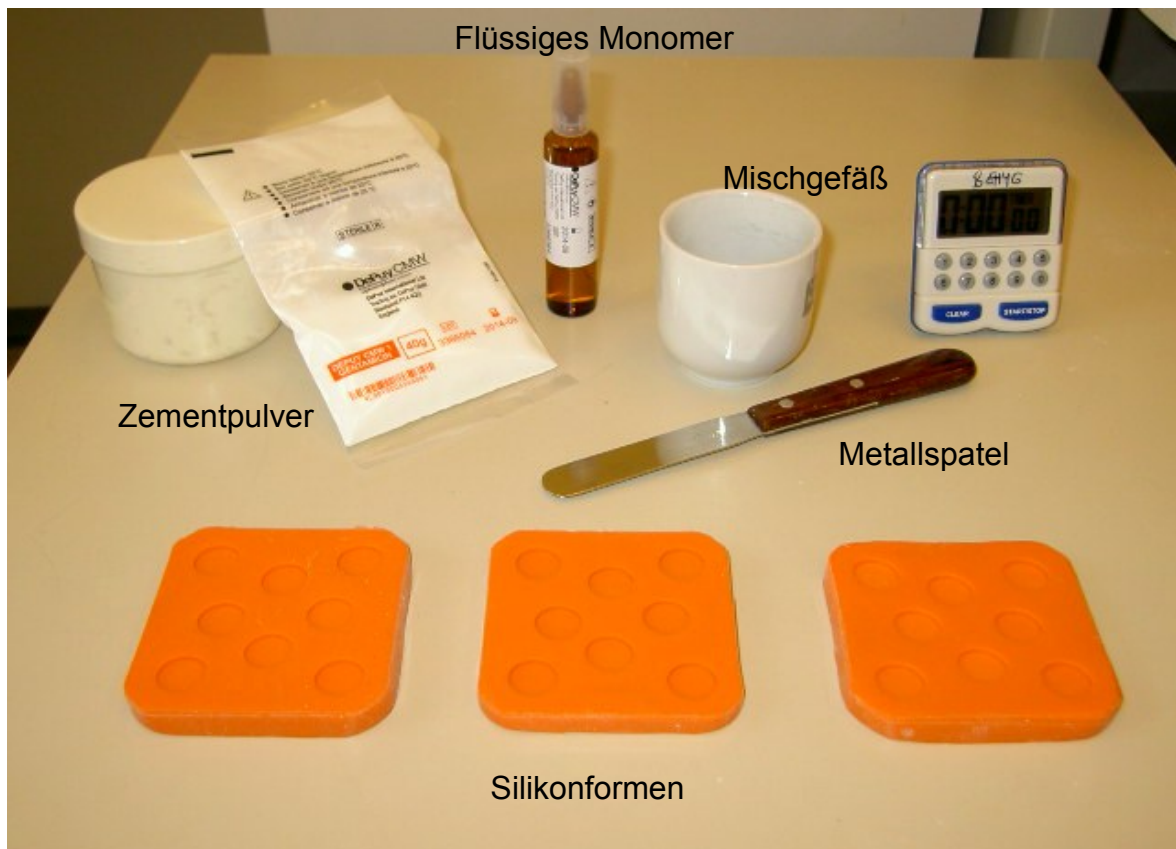


Abbildung 2: Die zur Herstellung der Formkörper notwendigen Materialien.

2.3 Agardiffusionstest

Mit dem Agardiffusionstest kann die bakteriostatische oder bakterizide Wirkung von Antibiotika auf einen bestimmten Erreger ermittelt werden. Dazu werden antibiotikahaltige Testblättchen auf eine mit einem bestimmten Erreger angezüchtete Agarplatte gelegt. Das Antibiotikum diffundiert ringförmig in den Agar. In jenem Bereich, in dem die minimale Hemmkonzentration überschritten wird, werden die Bakterien am Wachstum gehindert und es entsteht um das

Testblättchen herum ein sogenannter „Hemmhof“. Dieser lässt Rückschlüsse auf die Freisetzung des Antibiotikums zu.

2.3.1 Verwendete Bakterien

Für den Agardiffusionstest wurden folgende Bakterien verwendet:

- *Staphylococcus aureus* DSM 799
- *Staphylococcus epidermidis* DSM 1798
- MRSA 02/39
- MRSA 02/260
- MRSA 02/221
- MRSA 06/10
- MRSA 03/08

Staphylococcus aureus und *Staphylococcus epidermidis* sind für den Großteil der Implantat-assoziierten Infektionen verantwortlich. Aufgrund ihrer klinischen Relevanz wurden sie daher auch in unserer Studie verwendet. Die verschiedenen verwendeten MRSA-Stämme weisen unterschiedliche Resistenzen gegenüber Gentamicin, Vancomycin und Clindamycin auf. Diese MRSA-Stämme werden verwendet, um die antibakterielle Wirksamkeit von Knochenzementen zu testen, die zwei verschiedene Antibiotika enthalten. In dem ein MRSA verwendet wird, der gegenüber einem Antibiotikum resistent ist, kann die Wirkung des anderen enthaltenen Antibiotikums untersucht werden. Die Resistenzen der verschiedenen MRSA-Stämme sind in Tabelle 4 aufgeführt.

2.3.2 Herstellung einer Bakteriensuspension

Mit den oben angeführten Bakterien wurde zunächst eine Suspension mit einem Trübungsstandard von McFarland 0,5 hergestellt. Dieser entspricht einer Anzahl von 10^8 Bakterien pro ml. Der Trübungsstandard McFarland 0,5 wird üblicherweise zur Durchführung von Antibiotika-Empfindlichkeitstests eingesetzt.

2.3.3 Durchführung des Agardiffusionstests: 7-Tage

Zur Durchführung des Agardiffusionstests wurden Petrischalen mit „Müller-Hinton-Agar“ verwendet. Müller-Hinton-Agar ist ein spezielles mikrobiologisches Nährmedium, das üblicherweise zur Bestimmung von Antibiotikaresistenzen

verwendet wird. Zunächst wurde ein durch Hitze sterilisiertes Wattestäbchen in die mit *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und MRSA hergestellten Bakteriensuspensionen getaucht. Die Agarplatte wurde im Zentrum eines Drehtisches (Sensorturn pro, WLD-TEC.) positioniert und die Keime wurden gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche des Agars aufgetragen. Die Formkörper wurden anschließend mit einer Pinzette in die Mitte der Agarplatte gelegt. Danach erfolgte die Inkubation der Platten im Brutschrank bei 37° Celsius.

Nach 24 Stunden wurden die Formkörper mittels Pinzette auf frisch hergestellte Agarplatten übertragen und erneut für 24 Stunden in den Brutschrank gelegt. Dies wurde bei den Formkörpern aller getesteten Zemente an 6 aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Pro Zement wurden jeweils 3 Formkörper getestet.

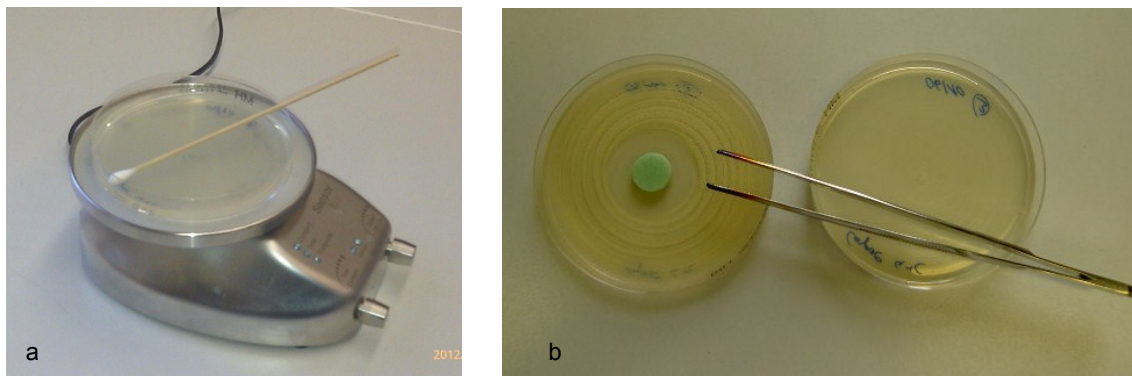


Abbildung 3a,b: Drehtisch mit Agarplatte (a) zur gleichmäßigen Verteilung der Bakteriensuspension. Agardiffusionstest mit Formkörper aus Knochenzement (b). Übertragung auf neue Agarplatte mittels Pinzette.

2.3.4 Durchführung des Agardiffusionstests: 24 Stunden

Analog zu dem oben angeführten 7-Tages-Versuch wurden auch für diesen Test alle in Tabelle 2 angeführten Zemente untersucht. Die Herstellung der Formkörper und der Bakteriensuspensionen erfolgte in der gleichen Weise wie oben beschrieben. Allerdings wurde bei diesem Versuch nur *Staphylococcus aureus* und pro Knochenzement jeweils 6 Formkörper getestet. Die Bakteriensuspension mit *Staphylococcus aureus* wurde auf einen Müller-Hinton-Agar aufgetragen und die Formkörper zum gleichen Zeitpunkt mit einer Pinzette im Zentrum der Platte positioniert. Anschließend wurden alle Platten in den Brutschrank mit einer Temperatur von 37° Celsius gelegt. Pro Zement wurde nun zu vorher festgelegten

Zeitpunkten jeweils ein Formkörper entfernt und danach wurden die Agarplatten wieder in den Brutschrank zurückgelegt. Die Zeitpunkte der Formkörperentfernung waren: 0,5-, 1-, 2-, 3-, 4- und 24 Stunde(n). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37° Celsius erfolgte die Abmessung der Größe der Hemmhöfe.

2.3.5 Messung

Sowohl beim 24-Stunden-Versuch als auch beim 7-Tages-Versuch erfolgte die Abmessung der Größe der Hemmhöfe nach jeweils 24 Stunden Inkubation im Brutschrank. Gemessen wurden die Durchmesser der Hemmhöfe. Pro Agarplatte wurde zweimal der Durchmesser (senkrecht aufeinander) gemessen und das Mittel der beiden Werte als Hemmhofdurchmesser der jeweiligen Platte definiert. Die Angabe erfolgte in Millimeter (mm).

2.4 Epsilometertest (E-Test)

Der Epsilometertest, oder auch kurz E-Test genannt, dient der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) eines Antibiotikums für ein bestimmtes Bakterium. Auf einem schmalen Papierstreifen sind von einem zum anderen Ende verschiedene Konzentrationen eines Antibiotikums aufgetragen. Das zu testende Bakterium wird auf eine Agarplatte aufgebracht und der Papierstreifen darauf gelegt. Die Platte wird dann bei 37° Celsius inkubiert. Das Antibiotikum diffundiert aus dem Papierstreifen in den Agar und hemmt dort das Bakterienwachstum. Nach 24 Stunden kann anhand von Markierungen auf dem Papierstreifen die minimale Hemmkonzentration abgelesen werden. Die MHK wird in Mikrogramm pro Milliliter ($\mu\text{g/ml}$) angegeben und ist beim E-Test dann erreicht, wenn das Bakterienwachstum bis an den Papierstreifen heranreicht.

In unserer Studie wurden die minimalen Hemmkonzentrationen von Gentamicin, Clindamycin und Vancomycin gegenüber fünf verschiedenen MRSA-Stämmen ermittelt. Der Epsilometertest erfolgte auf einem Müller-Hinton-Agar. Die Abbildung 4 zeigt die unterschiedliche Resistenzlage von zwei verschiedenen MRSA-Stämmen gegenüber dem Antibiotikum Clindamycin. Auf der linken Agarplatte ist deutlich zu sehen, dass Clindamycin das Bakterienwachstum von MRSA 02/39 hemmt, während hingegen bei der rechten Agarplatte die Bakterien bis an den Papierstreifen heranwachsen.

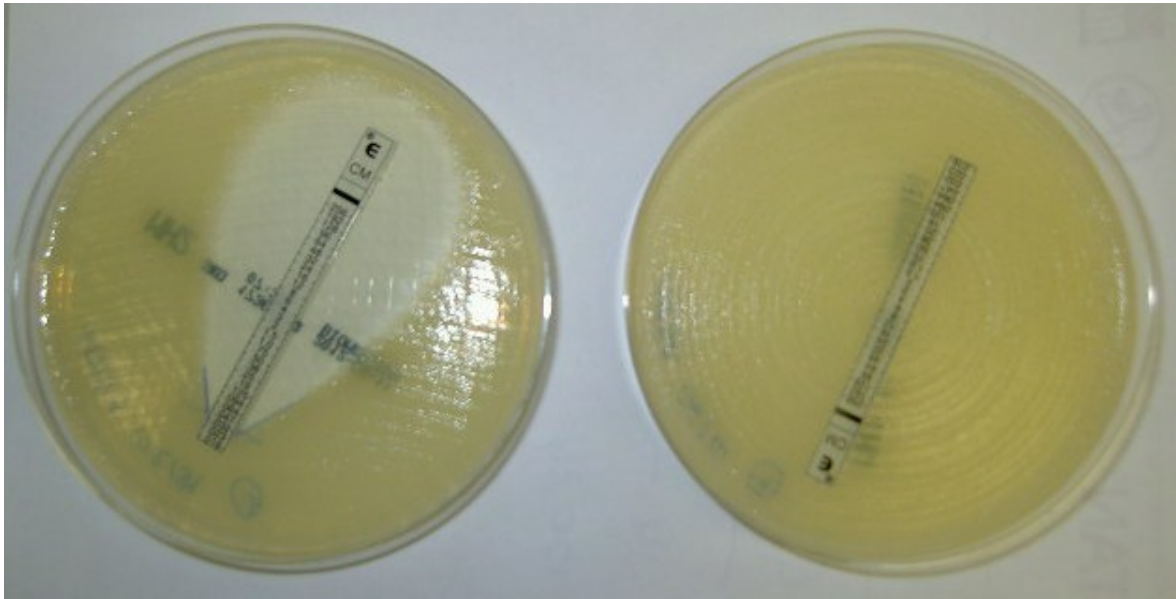


Abbildung 4: Epsilon test mit Clindamycin und den MRSA-Stämmen 02/39 (links) und 02/260 (rechts).

2.5 Elutionsversuch

2.5.1 Herstellung von Formkörpern

Für diesen Test wurden aus den Knochenzementen Palacos® R+G und CMW 1G kleine, runde Formkörper hergestellt. Die Art der Herstellung erfolgte auf die gleiche Weise, wie sie in Kapitel 2.2 bereits beschrieben wurde. Pro Knochenzement wurden 3 Formkörper ausgewählt, die folgende Anforderungen erfüllten:

- Makroskopisch gleiche Oberflächenbeschaffenheit
- Durchmesser von 15 mm
- Gewicht zwischen 0,560 und 0,575 Gramm

Die Formkörper wurden mit der Präzisionswaage (Cubis, Sartorius Austria) gewogen.

2.5.2 Elution

Zunächst erfolgte die Herstellung einer Pufferlösung. Die Pufferlösung Dulbecco 10xPBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Biochrom AG, Austria) wurde mit sterilem Wasser

10fach verdünnt. Danach wurden jeweils 10,5 ml Pufferlösung in Reaktionsgefäße (Greiner, Bioone Austria) gegeben.

Die Formkörper wurden dann in die Reaktionsgefäße mit der Pufferlösung gegeben, einmal geschwenkt und anschließend bei Raumtemperatur (24° Celsius) stehend gelagert. Die Formkörper verblieben für eine bestimmte Zeit in der Pufferlösung und wurden dann mittels Pinzette in Reaktionsgefäße mit frischer Pufferlösung übertragen. Die Oberfläche der Formkörper wurde auf beiden Seiten kurz abgetrocknet, bevor sie in die neuen Reaktionsgefäße gegeben wurden. Dieses Vorgehen sollte verhindern, dass bereits gelöstes Antibiotikum in der Flüssigkeit auf der Oberfläche der Formkörper in die frische Pufferlösung verschleppt wird. Die Zeitpunkte der Formkörperübertragungen waren nach 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 Stunde(n), 2 Tagen, 3 Tagen, 4 Tagen, 5 Tagen, 6 Tagen, 7 Tagen, 10 Tagen und 14 Tagen.

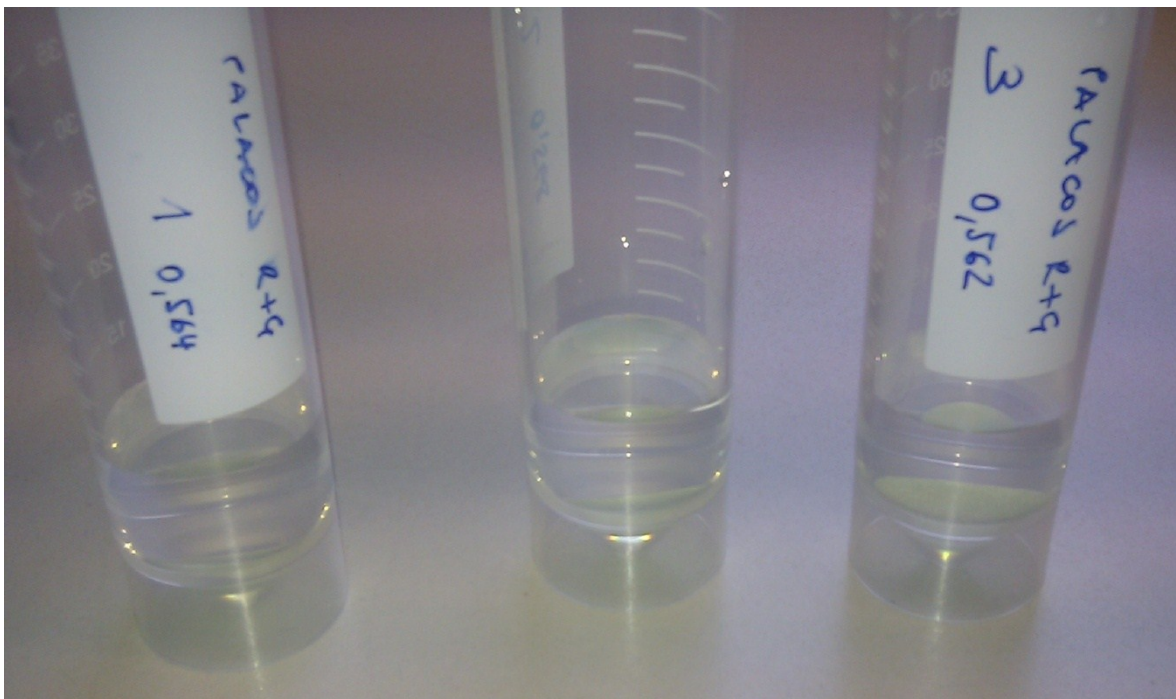


Abbildung 5: Formkörper in 10,5ml Pufferlösung

2.5.3 Elutionstest

Zuerst wurde mit *Staphylococcus aureus* eine Bakteriensuspension mit einem Trübungsstandard von McFarland 0,5 hergestellt. Danach erfolgte die Aufbringung der Suspension mittels Wattestäbchen auf den Müller-Hinton-Agar. Dazu wurde

das Wattestäbchen in die Bakteriensuspension getaucht, die Petrischale auf einem Drehtisch (Sensorturn pro, WLD-Tec.) platziert und der Keim gleichmäßig auf dem Agar verteilt. Danach wurde mit einer Pasteur-Pipette aus dem Zentrum des Agars ein Loch mit einem Durchmesser von 6 mm gestanzt.

Der nächste Schritt war die Entnahme von 50µl der Puffer-Antibiotika-Lösung aus den Röhrchen mit den verschiedenen Zeitpunkten (0,25 Stunden, 0,5 Stunden, 1 Stunde, usw.) und deren Einbringung in das aus dem Agar gestanzte Loch. Anschließend wurden die Agarplatten bei 37°Celsius für 24 Stunden inkubiert.

Die Abbildung 6 zeigt den Elutionsversuch mit dem 0,25-Stunden-Eluat des Knochenzements Palacos® R+G nach 24 stündiger Inkubation im Brutschrank. Deutlich sichtbar sind das ausgestanzte Loch im Zentrum der Agarplatte und der durch Gentamicin erzeugte Hemmhof.



Abbildung 6: Elutionstest mit dem 0,25-Stunden-Eluat von Palacos® R+G. Im Zentrum das mittels Pasteur-Pipette gestanzte Loch. Kreisförmige Wachstumshemmung von *Staphylococcus aureus* durch Gentamicin.

3 Ergebnisse

3.1 Agardiffusionstest – 7 Tage

3.1.1 Knochenzemente mit Gentamicin

Zum Vergleich von 6 verschiedenen Knochenzementen die alle das Antibiotikum Gentamicin enthalten, wurde ein Agardiffusionstest über 7 Tage durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt. Auf der Y-Achse ist der mittlere Hemmhofdurchmesser von jeweils 3 Formkörpern pro Zement aufgetragen, die X-Achse zeigt den zeitlichen Verlauf. Über 7 Tage wurde von jedem Knochenzement ein messbarer Hemmhof erzeugt. Im Allgemeinen ist eine Abnahme der Größe der Hemmhöfe von Tag 1 zu Tag 7 zu beobachten, auch wenn einzelne Tageswerte eine Zunahme zeigen. Sowohl gegen *Staphylococcus aureus*, als auch gegen *Staphylococcus epidermidis* erzeugten alle getesteten Knochenzemente ähnlich große Hemmhöfe

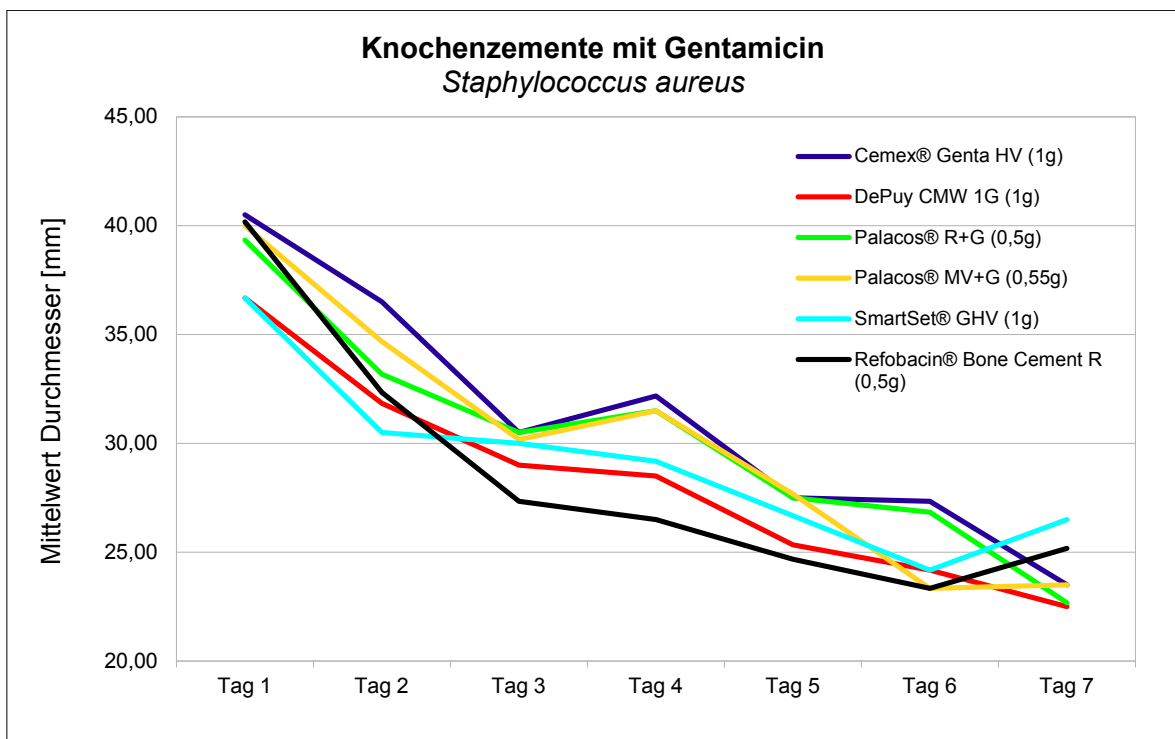


Abbildung 7: Verlaufskurven der Hemmhofdurchmesser der untersuchten gentamicinhaltigen Zemente über 7 Tage. Testbakterium: *Staphylococcus aureus*. Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.

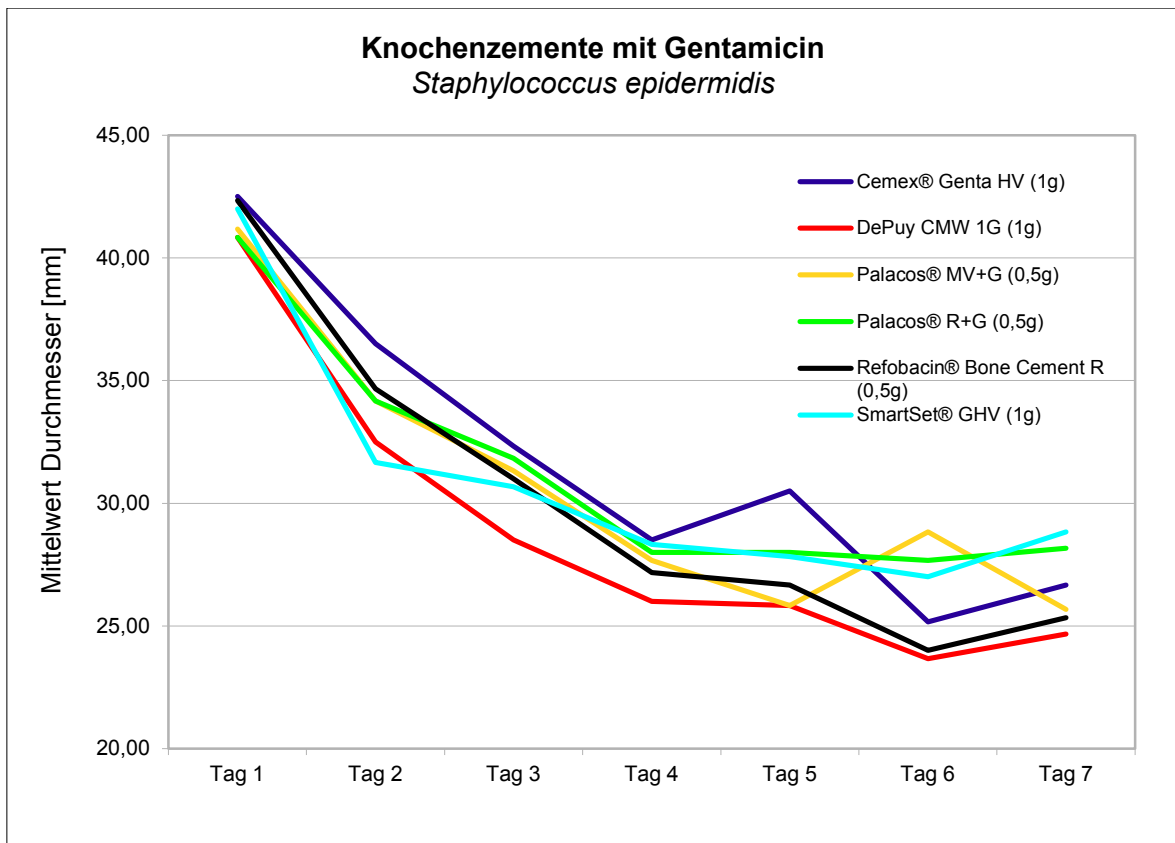


Abbildung 8: Messung der Hemmhofgröße im Agardiffusionstest an 6 untersuchten Knochenzementen mit Gentamicin an 7 aufeinander folgenden Tagen. Testbakterium: *Staphylococcus epidermidis*. Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.

3.1.2 Knochenzemente mit Antibiotikakombinationen

Im Agardiffusionstest wurden auch Knochenzemente miteinander verglichen, die zwei Antibiotika enthalten.

- Copal® G+C: enthält Gentamicin und Clindamycin
- Copal® G+V: enthält Gentamicin und Vancomycin
- Vancogenx®: enthält Gentamicin und Vancomycin

Getestet wurde mit *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse für *Staphylococcus aureus* dargestellt. Auf der Y-Achse sind die mittleren Hemmhofdurchmesser von drei Formkörpern pro Knochenzement aufgetragen, auf der X-Achse deren Verlauf über die Testdauer von 7 Tagen. Im Allgemeinen ist eine Abnahme der Hemmhofgröße zu erkennen, auch wenn an wenigen Tagen eine Zunahme der Hemmhofdurchmesser zu beobachten war. Die Antibiotikakombination Gentamicin + Vancomycin, die in zwei Zementen enthalten ist, lieferte nahezu identische Ergebnisse. Die in Copal® G+C

enthaltene Kombination mit Gentamicin und Clindamycin, erzeugte über die gesamte Testdauer deutlich größere Hemmhöfe als die in Copal® G+V und Vancogenx® enthaltene Kombination Gentamicin und Vancomycin.

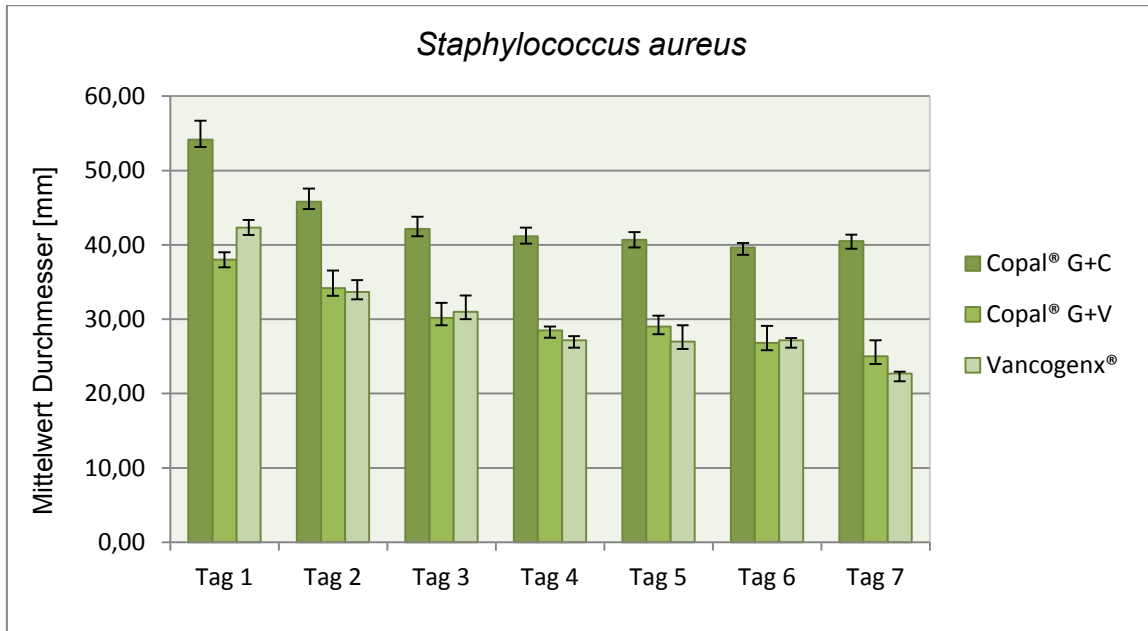


Abbildung 9: Hemmhofdurchmesser der Zemente mit 2 verschiedenen Wirkstoffkombinationen (Gentamicin und Vancomycin oder Gentamicin und Clindamycin). Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.

3.1.3 Knochenzemente mit Antibiotikakombinationen - Testung mit verschiedenen MRSA-Stämmen

Um die Wirkung eines Antibiotikums bei Knochenzementen zu testen, die zwei verschiedene Antibiotika enthalten, wurde der Agardiffusionstest mit mehreren MRSA-Stämmen durchgeführt. Diese Keime sind gegenüber einem enthaltenen Antibiotikum unterschiedlich resistent. Zur Ermittlung der Resistenzen wurde zunächst ein Epsilometertest mit Gentamicin, Clindamycin und Vancomycin durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Antibiotikum	MRSA 02/39	MRSA 02/260	MRSA 02/221	MRSA 06/10	MRSA 03/08
Clindamycin	0,23	>256	>256	>256	>256
Gentamicin	>256	64	48	0,5	32
Vancomycin	0,75	1	1	1	1

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

Zunächst erfolgte der Vergleich der beiden Knochenzemente, die Gentamicin und Vancomycin enthalten. Getestet wurde gegen drei verschiedene MRSA-Stämme mit unterschiedlicher Resistenz gegenüber Gentamicin. Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die Ergebnisse für die Knochenzemente Copal® G+V und Vancogenx®. Auf der Y-Achse sind die mittleren Hemmhofdurchmesser von jeweils 3 Formkörpern der getesteten Zemente aufgetragen, auf der X-Achse deren Verlauf über die Testdauer von 7 Tagen.

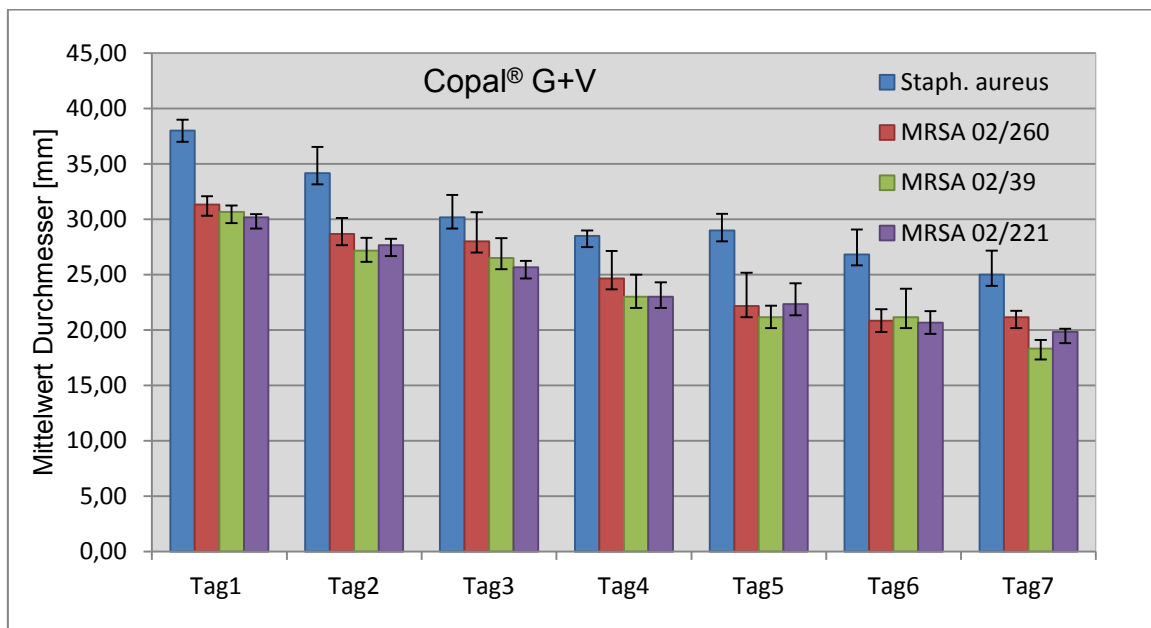


Abbildung 10: Hemmhofdurchmesser von verschiedenen MRSA-Stämmen nach Konfrontation mit einem Knochenzement mit 2 Wirkstoffen (Gentamicin und Vancomycin), der Antibiotika sensitive *Staphylococcus aureus* Laborstamm dient als Referenz. Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.

Bei diesem Versuch zeigte sich, dass sowohl Copal® G+V als auch Vancogenx® bei einem gegenüber Gentamicin weniger resistenten MRSA-Stamm, keine größeren Hemmhöfe erzeugen konnten. Zum Vergleich sind in den Abbildungen

10 und 11 die Ergebnisse der Tests von Copal® G+V und Vancogenx® gegenüber einem sensitiven *Staphylococcus aureus* eingefügt. Dabei konnte die Kombination Gentamicin und Vancomycin an allen Versuchstagen geringfügig größere Hemmhofdurchmesser produzieren.

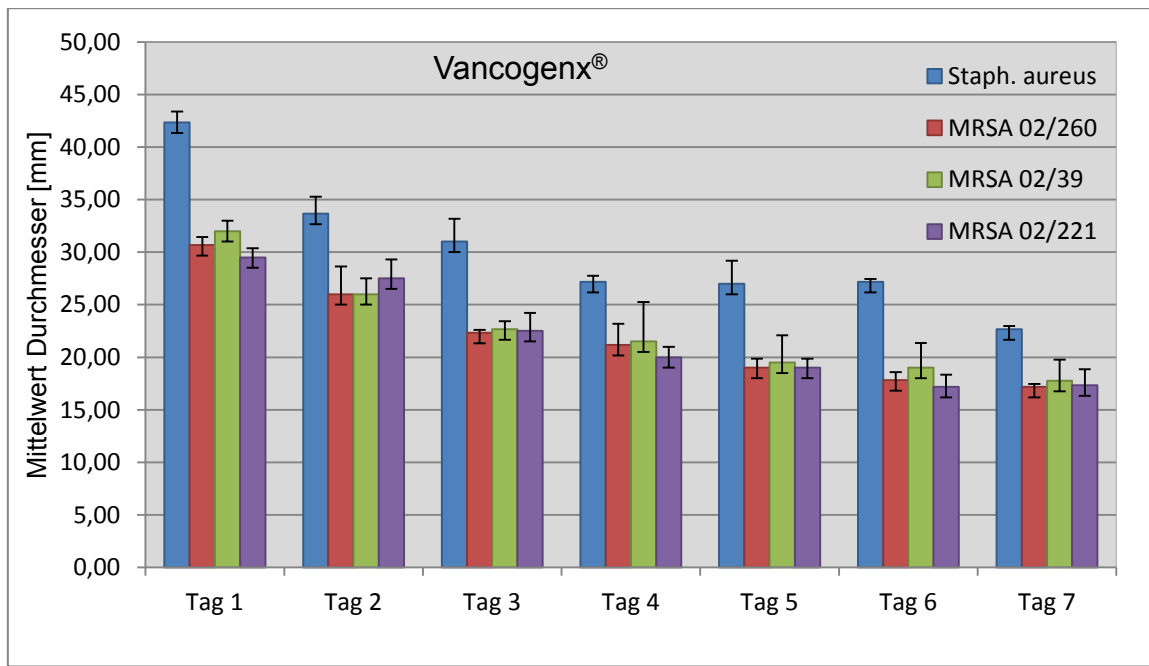


Abbildung 11: Hemmhofdurchmesser von verschiedenen MRSA-Stämmen nach Konfrontation mit einem Knochenzement mit 2 Wirkstoffen (Gentamicin und Vancomycin), der Antibiotika sensitive *Staphylococcus aureus* Laborstamm dient als Referenz. Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.

Weiters wurden 3 verschiedene Knochenzemente mit zwei verschiedenen Antibiotikakombinationen gegen den gleichen Keim getestet. Der MRSA 02/39 ist sowohl gegen Clindamycin als auch gegen Vancomycin sensitiv, gegen Gentamicin aber resistent. Somit kann die Wirkung der beiden Antibiotika miteinander verglichen werden. Die Ergebnisse der Testung sind in Abbildung 12 dargestellt. Auf der Y-Achse sind die mittleren Hemmhofdurchmesser von jeweils 3 Formkörpern pro Knochenzement aufgetragen, auf der X-Achse deren Verlauf über die Testdauer von 7 Tagen. Alle drei Zemente produzierten an jedem Tag messbare Hemmhöfe. Die beiden Zemente mit der Antibiotikakombination Gentamicin + Vancomycin zeigten nahezu gleiche Ergebnisse. Deutlich größere Hemmhöfe lieferte der Knochenzement mit der Kombination Gentamicin + Clindamycin.

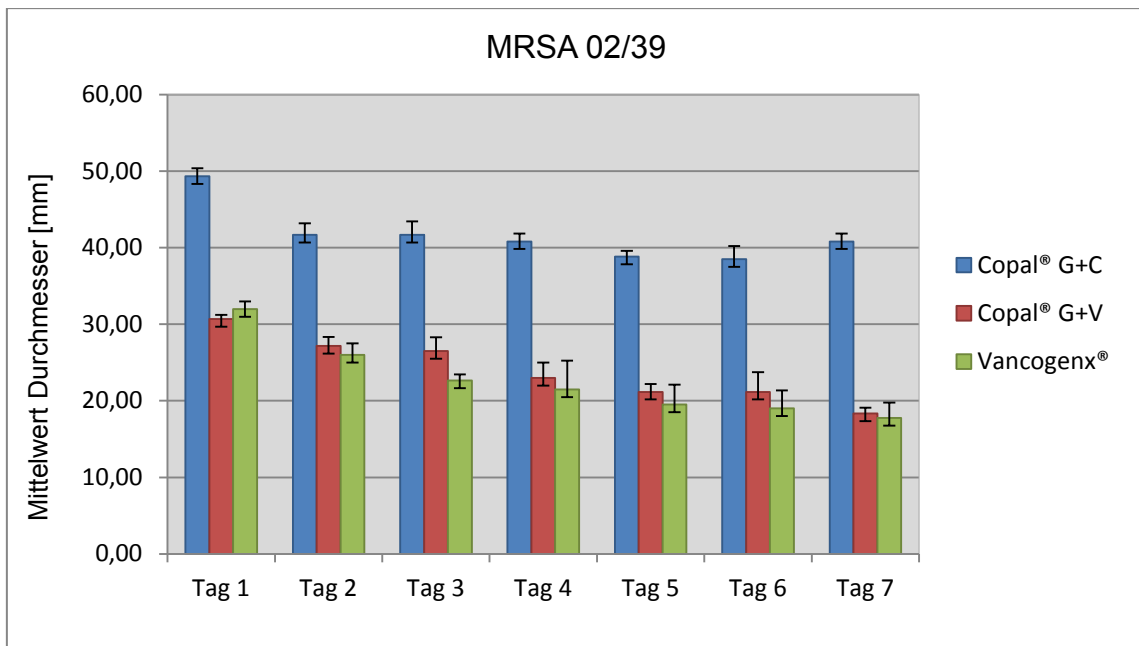


Abbildung 12: Hemmhofdurchmesser eines MRSA-Stammes nach Konfrontation mit Knochenzementen mit 2 verschiedenen Wirkstoffkombinationen (Gentamicin und Vancomycin oder Gentamicin und Clindamycin). Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.

Im Knochenzement Copal® G+C sind die Antibiotika Gentamicin und Clindamycin enthalten. Zur Prüfung wie diese beiden Antibiotika alleine wirken, wurde ein Agardiffusionstest mit drei verschiedenen MRSA-Stämmen durchgeführt. Diese Bakterien haben unterschiedliche Resistenzen gegenüber den beiden Antibiotika. MRSA 02/39 ist gegen Gentamicin resistent, MRSA 06/10 gegen Clindamycin und MRSA 03/08 gegen beide. Die Ergebnisse der Testung sind in Abbildung 13 dargestellt.

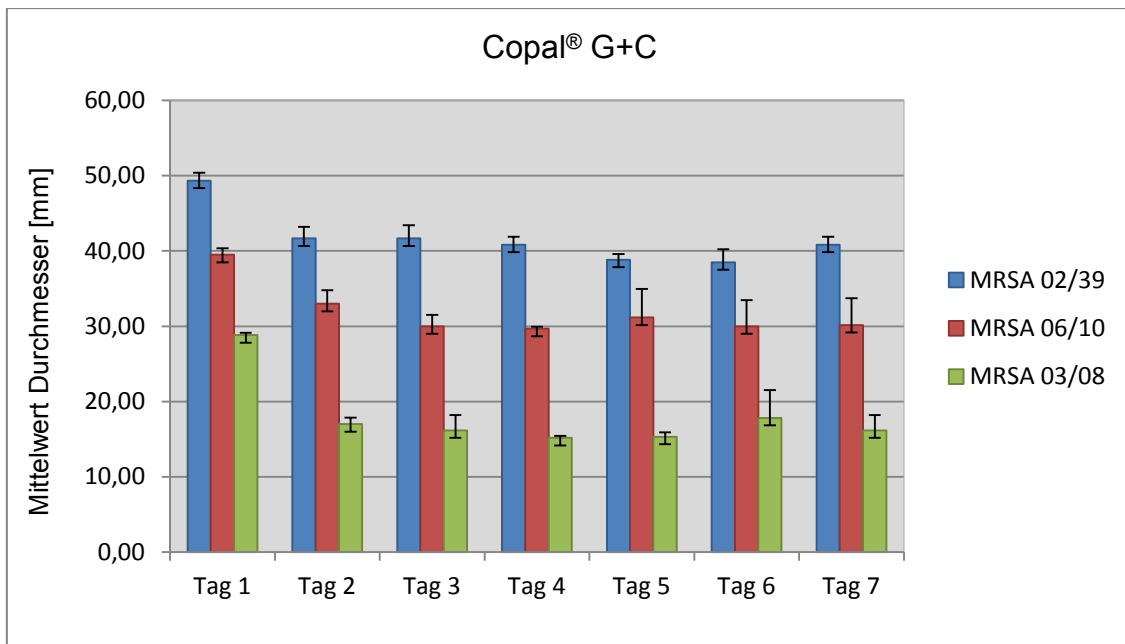


Abbildung 13: Hemmhofdurchmesser verschiedener MRSA-Stämme gegenüber Copal® G+C (Gentamicin und Clindamycin). Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten

3.2 Agardiffusionstest – 24 Stunden

3.2.1 Knochenzemente mit Gentamicin, Tobramycin und Antibiotika-Kombinationen

Um zu prüfen, wie rasch die Diffusion der Antibiotika aus den Knochenzementen vor sich geht, wurde der Agardiffusionstest an einem Tag durchgeführt. Getestet wurden alle Zemente mit Gentamicin, einer mit Tobramycin und drei mit Antibiotikakombinationen. Die Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Zemente mit Gentamicin, die Abbildung 15 die Ergebnisse für die Zemente mit zwei Antibiotika und einem Zement mit Tobramycin. Auf der Y-Achse sind die mittleren Hemmhofdurchmesser aufgetragen, auf der X-Achse die Zeitpunkte, an denen die Formkörper von der Agarplatte entfernt wurden. Alle Zemente erzeugten bereits nach einer halben Stunde ähnlich große Hemmhöfe wie nach 24 Stunden. Mit Ausnahme von Copal® G+C lagen die Werte bei allen Zementen nach 0,5 Stunden zwischen 34 und 38 mm und nach 24 Stunden zwischen 35,5 und 38,5 mm. Copal® G+C erzeugte mit einem 0,5-Stunden-Wert von 44 mm und einem 24-Stunden-Wert von 48,5 mm deutlich größere Hemmhöfe als alle anderen getesteten Zemente.

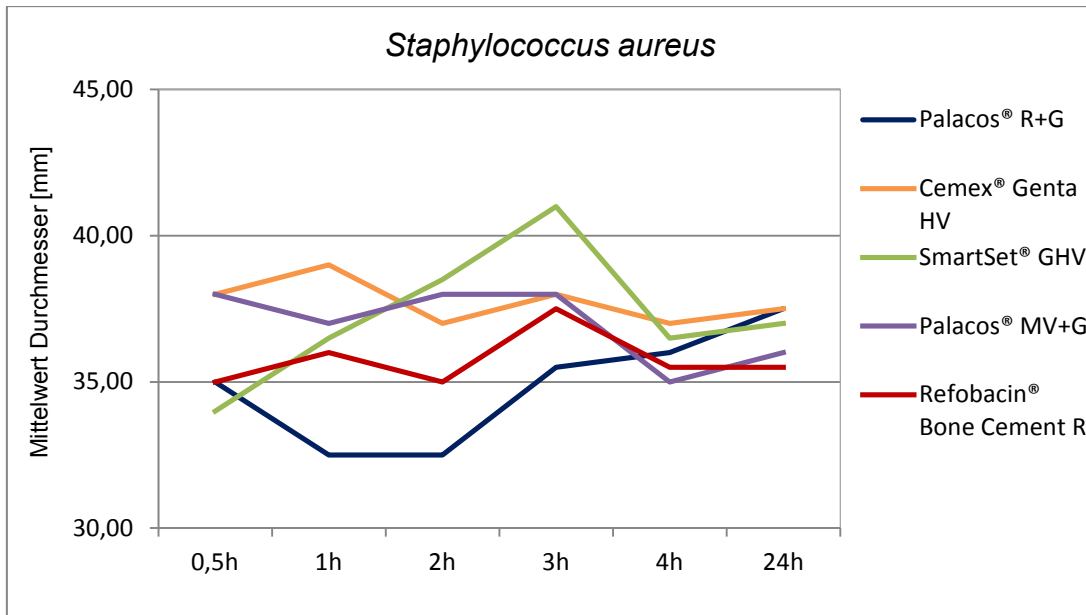


Abbildung 14: Vergleich der Hemmhofdurchmesser verschiedener gentamicinhaltiger Knochenzemente in einem 24 Stunden Ansatz. Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten. Die Abweichungen bei den Hemmhofdurchmessern von SmartSet® GHV (2 und 3h Wert) sind durch nicht korrektes Entfernen bei jeweils einem der drei Formkörper entstanden. Die mittleren Hemmhofdurchmesser sind somit zu diesen Zeitpunkten zugunsten eines größeren Hemmhofes verfälscht.

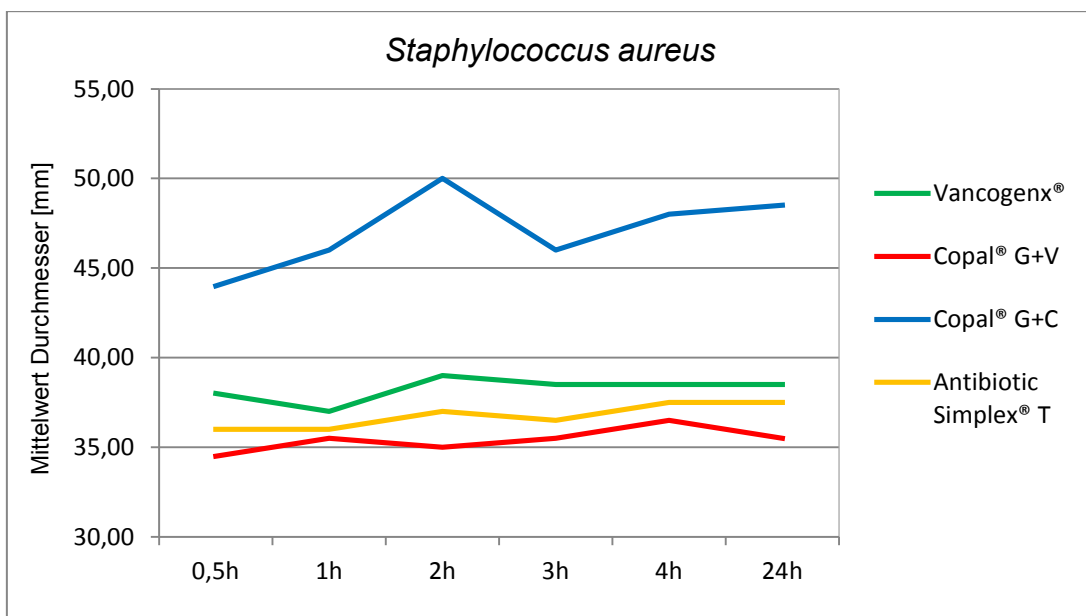


Abbildung 15: Vergleich der Hemmhofdurchmesser verschiedener antibiotikahaltiger Revisionszemente in einem 24 Stunden Ansatz. Methode: Auflegen der Formkörper auf die Agarplatten.

3.3 Elutionstest

Die Ergebnisse des Elutionstests der Knochenzemente Palacos® R+G und CMW 1G sind in Abbildung 16 dargestellt. Auf der Y-Achse sind die mittleren Hemmhofdurchmesser der Eluate von jeweils 3 Formkörpern pro Knochenzement dargestellt. Die X-Achse zeigt die Zeitpunkte der Eluatentnahme. Getestet wurde gegen *Staphylococcus aureus*. Die 15 Minuten-Eluate beider Zemente erzeugten die größten Hemmhöfe, wobei zu diesem Zeitpunkt CMW 1G das einzige Mal während der gesamten Testdauer einen größeren Hemmhofdurchmesser aufwies als Palacos® R+G. Anschließend zeigten beide Knochenzemente einen sehr ähnlichen Verlauf: Zunächst wurden die Hemmhöfe bis zum 6-Stunden-Wert kontinuierlich kleiner. Es folgte eine sprunghafte Größenzunahme am Tag 1, danach wurden die Durchmesser der Hemmhöfe wieder stetig kleiner um am Tag 7 und 10 erneut zuzunehmen. Die Eluate von Palacos® R+G konnten zu jedem Versuchszeitpunkt einen Hemmhof erzeugen, während CMW 1G nach 6 und 14 Tagen nicht genügend Antibiotikum freisetzte um das Bakterienwachstum zu hemmen.

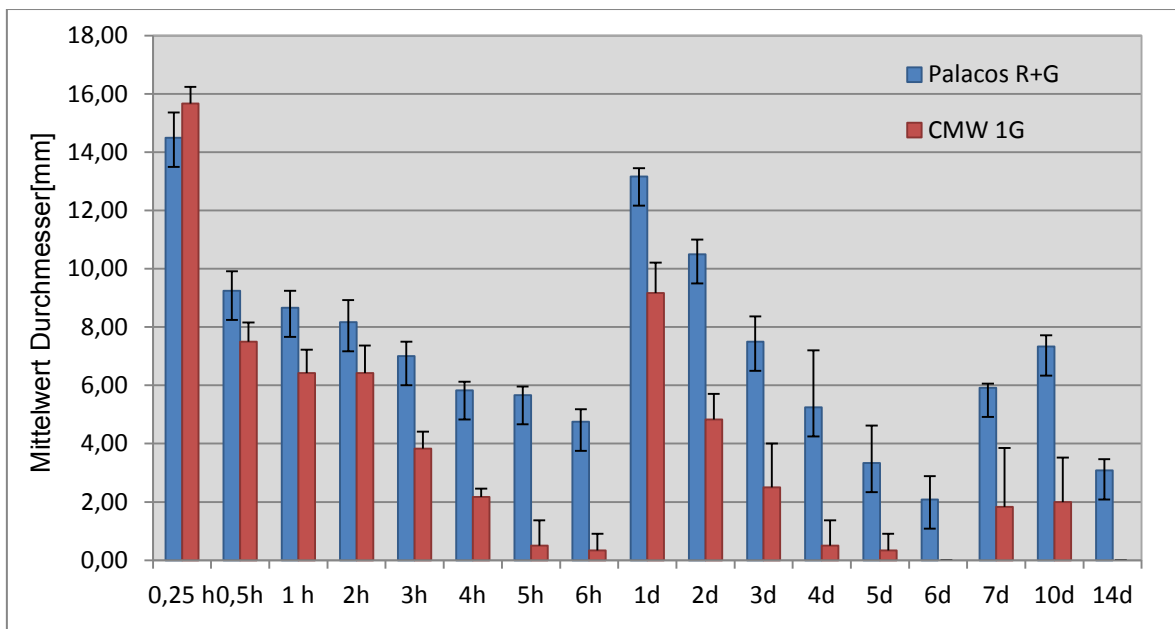


Abbildung 16: Darstellung der mittleren Hemmhofdurchmesser (Testung mit Eluaten) von jeweils 3 Formkörpern Palacos® R+G sowie CMW 1G pro Knochenzement auf der Y-Achse. Die Zeitpunkte der Eluatentnahmen sind auf der X-Achse aufgetragen. Testkeim: *Staphylococcus aureus*

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen die Elutionstests von Palacos® R+G und CMW 1G am ersten Versuchstag. Deutlich sichtbar ist die zunächst kontinuierliche Abnahme der Hemmhofdurchmesser bei beiden Knochenzementen, gefolgt von einer Zunahme nach 24 Stunden (bei beiden Abbildungen die rechte untere Agarplatte).

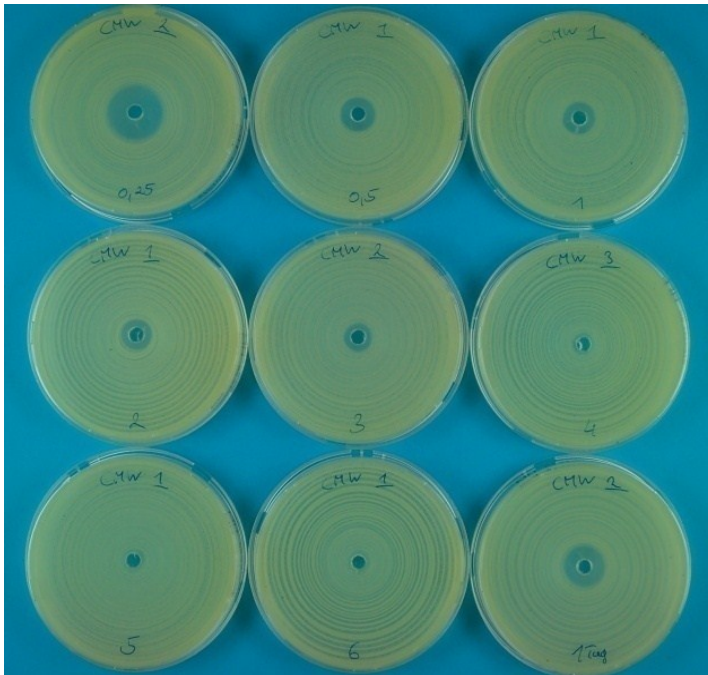


Abbildung 17: Hemmhöfe im Elutionsexperiment mit CMW 1G über einen Tag.
Testbakterium: *Staphylococcus aureus*.

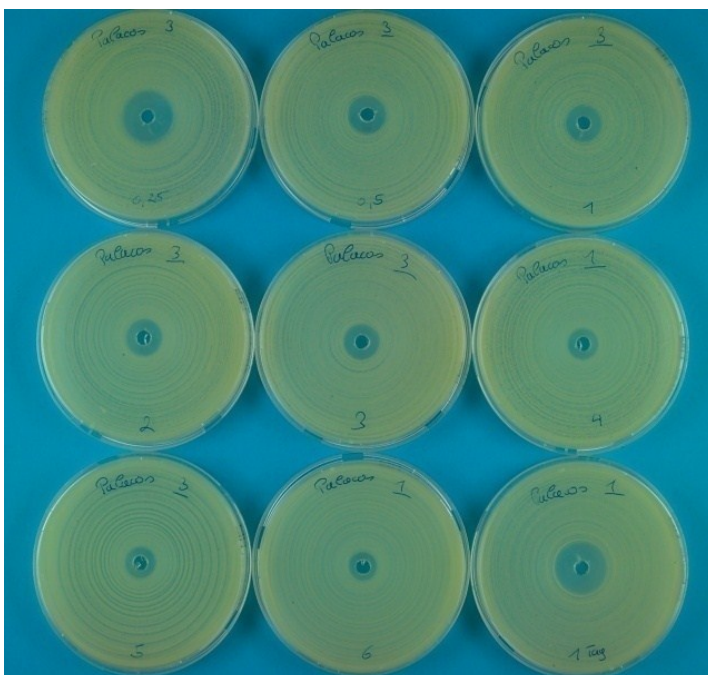


Abbildung 18: Hemmhöfe im Elutionsexperiment mit Palacos® R+G über 1 Tag.
Testbakterium: *Staphylococcus aureus*

4 Diskussion

4.1 Agardiffusionstest

In dieser Arbeit wurden 10 handelsübliche Knochenzemente mit Antibiotikazusatz in Bezug auf deren antibakterielle Wirksamkeit *in vitro* untersucht. Mit dem Agardiffusionstest können keine Konzentrationen von freigesetzten Antibiotika bestimmt werden. Die Größe der Hemmhöfe ist allerdings von der Menge an eluiertem Antibiotikum abhängig. Das heißt, je mehr Antibiotikum pro Zeiteinheit vorhanden ist, desto größer wird der Hemmhof in seinem Durchmesser. Unter den gewählten Versuchsbedingungen „Auflegen von PMMA-Formkörpern auf Agar“ konnten alle untersuchten Zemente über die gesamte Testdauer von 7 Tagen genügend Antibiotikum freisetzen, um das Bakterienwachstum *in vitro* zu hemmen. Wie schon in anderen Studien beschrieben (48,49), war auch in dieser Untersuchung die Antibiotikafreisetzung zu Beginn am höchsten. Somit wiesen die Hemmhöfe am ersten Versuchstag die größten Durchmesser auf. Squire et al. (2008, 2011) beschreiben eine rapide Abnahme der Hemmhofdurchmesser auf 30% am Versuchstag 2 im Vergleich zum ersten Versuchstag (48,50). Eine solch rasche Größenabnahme der Hemmhöfe konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Beim Agardiffusionstest mit *Staphylococcus aureus* am 2. Versuchstag, konnte das freigesetzte Antibiotikum noch durchschnittlich 85% der Größe der Hemmhöfe vom ersten Untersuchungstag erreichen. Auch die ebenfalls beschriebenen signifikanten Unterschiede in der Freisetzung an den weiteren Versuchstagen konnten mit den von uns durchgeführten Hemmhoftests nicht bestätigt werden. In den getesteten Knochenzementen denen ein Antibiotikum zugemischt ist, variiert der Gehalt an Antibiotikum von 1,25 % und 2,5 % im Polymer. Die Zemente SmartSet[®] GHV, CMW 1G, Cemex[®] Genta HV, Antibiotic Simplex[®] T enthalten die doppelte Menge (1g/40g Pulver) an Gentamicin bzw. Tobramycin als die anderen drei untersuchten Zemente Palacos[®] R+G, Palacos[®] MV+G, Refobacin[®] Bone Cement R mit 0,5g bzw. 0,55g/40g Pulver. Das Herauslösen von Antibiotika aus einem PMMA-Zement ist ein Diffusionsprozess (2,51) der durch verschiedene Faktoren wie die Art (Viskosität) des Zementes, die Kontaktfläche, die Art und Menge des Antibiotikums (52), die Oberflächenrauigkeit und Porosität des Zementes (53) sowie von der Fähigkeit des Knochenzementes zur Wasseraufnahme (2,14) beeinflusst wird.

Außerdem haben Untersuchungen gezeigt, dass durch Erhöhung des Antibiotikagehalts in einem Knochenzement, auch dessen Freisetzung gesteigert werden kann (13,49) wobei dem Zement (Versabond) die doppelte Menge an Antibiotikum beigemischt wurde. Die in Puffer bestimmte Freisetzung verdoppelte sich jedoch nicht sondern stieg um einen höheren Faktor. Generell zeigte sich in dieser Studie auch, dass Clindamycin auch sehr gut freigesetzt wird. In den von uns durchgeführten Agardiffusionstests, zeigten sich jedoch, unabhängig vom Antibiotikagehalt der untersuchten PMMA-Zemente, keine signifikanten Unterschiede in der Größe der Hemmhöfe.

Eine mögliche Erklärung, warum Knochenzemente mit der doppelten Menge an Antibiotikum nicht auch größere Hemmhöfe produzieren, ist in den physikalischen Rahmenbedingungen der Diffusion begründet, und wird in Kapitel 4.1.2. diskutiert.

Auch in unseren 24-Stunden-Hemmhof-Experimenten war zu beobachten, dass die Antibiotika sehr rasch aus dem Knochenzement gelöst werden. Auch andere Autoren beschreiben eine initial (wenige Stunden) hohe Freisetzung (49,54). Danach werden die Antibiotika in immer geringer werdender Menge gelöst, allerdings kann dieser Prozess sehr lange andauern. Wahlig und Dingeldein (1980) konnten beispielsweise eine subinhibitorische Gentamicin-Freisetzung aus Palacos® R über fünf Jahre beobachten (16). Viele Autoren sehen in einer langanhaltenden Freisetzung von Antibiotika aus den Knochenzementen, in einer Dosierung unterhalb der MHK, die Gefahr für die Entwicklung von resistenten Bakterien (14,26,27,55).

4.1.1 Antibiotikakombinationen

Knochenzemente, die mehr als ein Antibiotikum enthalten, werden vorwiegend in der Revisionschirurgie zur Therapie von manifesten Infektionen verwendet.

Durch die Kombination von zwei Antibiotika in einem Zement, verbessert sich die Freisetzung von beiden Antibiotika im Vergleich zu Zementen die nur eines der beiden Antibiotika enthalten (56-58). So konnten beispielsweise Bertazzoni et al. (2002) eine höhere Wirksamkeit der Antibiotikakombination Gentamicin und Vancomycin im Vergleich zu Gentamicin alleine zeigen (58). Diesen synergistischen Effekt beschrieben Penner et al. (1996) als „passiven

Opportunismus“, weil die Anwesenheit eines zweiten Antibiotikums als passiver löslicher Zusatz zu wirken scheint (56).

In unserer Arbeit wurden drei Zemente mit zwei verschiedenen Antibiotikakombinationen (Gentamicin + Vancomycin und Gentamicin + Clindamycin) von zwei Herstellern auf ihre antibakterielle Wirksamkeit getestet.

Bei allen drei Knochenzementen mit Antibiotikakombinationen konnte im Vergleich zu Gentamicin alleine, auch eine erhöhte antibakterielle Wirksamkeit festgestellt werden. Die Kombination Gentamicin und Clindamycin zeigte dabei eine erheblich bessere synergistische Wirkung als die Kombination Gentamicin und Vancomycin. Bertazzoni et al. (2002) konnten an Untersuchungen mit verschiedenen Zementen (Cemex, Palacos und Simplex) zeigen, dass Vancomycin alleine im Vergleich zu Gentamicin eine geringere und weniger wirksame Freisetzung hat (58). Dieses schlechtere Diffusionsverhalten von Vancomycin ist laut Bistolfi et al. (2011) in einigen Faktoren begründet, wie z.B. physikalisch-chemische Eigenschaften des Antibiotikums, dem Molekulargewicht, der Stabilität der Moleküle in Gegenwart von biologischen Flüssigkeiten, der Temperatur ebenso wie eine unterschiedliche Morphologie der Zemente selbst (z.B. Porosität, Rauigkeit, Oberfläche) (59). Diese physikalischen – chemischen Unterschiede spiegeln sich auch in unseren Ergebnissen wieder. Der Vergleich zwischen Copal® G+V und Vancogenx® brachte in Bezug auf die von uns untersuchten Hemmhofstests keine nennenswerte Überlegenheit in der antibakteriellen Wirksamkeit eines Produktes zum Vorschein. Während bei Vancogenx® die Elutionseigenschaften beider Antibiotika durch einen höheren Gentamicinanteil von 2,5 % (im Vergleich zu Copal® G+V mit 1,25 %) positiv beeinflusst werden, wird dies bei Copal® G+V mit einem höheren Vancomygingehalt in einer hydrophilen Polymermatrix erreicht. Um die Wirksamkeit eines Antibiotikums bei Knochenzementen mit Antibiotikakombinationen sichtbar zu machen, wurden die Agardiffusionstests mit unterschiedlich resistenten MRSA-Stämmen durchgeführt. Um beispielsweise die antibakterielle Wirksamkeit von Clindamycin alleine, in der Antibiotikakombination Gentamicin und Clindamycin, darstellen zu können, wurde ein gentamicin-resistenter MRSA für den Agardiffusionstest verwendet. In diesen Tests zeigte sich, wenn Gentamicin durch einen resistenten MRSA nicht direkt an der Hemmhofbildung beteiligt ist, dass Clindamycin eine deutlich bessere antibakterielle Wirksamkeit aufweist als Vancomycin. Wie oben bereits erwähnt

spielt in diesem Zusammenhang die schlechtere Lösbarkeit und langsamere Diffusion von Vancomycin aufgrund der Größe des Moleküls die entscheidende Rolle. Andererseits sollte in Betracht bezogen werden, dass die in der Polymermatrix vorhandenen Gentamicinpartikel das Eindringen von Flüssigkeiten in die Matrix begünstigen und dadurch ggf. auch die Elution von Clindamycin deutlich verbessert wird.

4.1.2 Mögliche Grenzen des Agardiffusionstests

Der Agardiffusionstest dient in erster Linie der Resistenzbestimmung von Bakterien gegenüber bestimmten Antibiotika. Er wird aber auch als Standardmethode eingesetzt, um die antimikrobielle Wirksamkeit von antibiotikahaltigen Knochenzementen *in vitro* zu ermitteln. Die Ergebnisse die in dieser Studie durch den Agardiffusionstest erzielt wurden, geben einen Hinweis darauf, dass diese Methode zur Feststellung von Unterschieden im Elutionsverhalten zwischen den verschiedenen Knochenzementen nicht geeignet ist. Unabhängig davon, ob der Pulverkomponente 0,5g oder 1g Antibiotikum beigemischt ist, erzeugten alle primären Knochenzemente mit Gentamicinzusatz über die gesamte Testdauer von 7 Tagen nahezu gleich große Hemmhöfe. Obwohl im Elutionsversuch im Puffer deutliche Unterschiede der Antibiotikafreisetzung zwischen den Zementen erkennbar sind, scheinen diese Unterschiede im Agardiffusionstest nicht von Bedeutung zu sein (13-15,49,53,54,58).

Ebenfalls auffällig ist, dass das in den Formkörpern enthaltene Antibiotikum sehr rasch in den Agar diffundiert. Wie im 1-Tages-Agardiffusionstest gezeigt, erreichen Formkörper die nur eine halbe Stunde auf dem Agar bleiben, gleich große Hemmhöfe wie die Formkörper die 24 Stunden auf dem Agar liegen. Offenbar setzen einige gentamicinhaltige PMMA-Zemente den Wirkstoff innerhalb der ersten Minuten post-operativ in hohen Mengen frei (z.B. Cemex[®] Genta HV, CMW 1 G). Am Beispiel von CMW 1 G konnte gezeigt werden, dass nach der hohen initialen Elution im nachfolgenden Untersuchungszeitraum kaum noch ausreichende Wirkstoffmengen freigesetzt werden (über der MHK). Da häufig die eluierte Wirkstoffmenge kumulativ in Tagen dargestellt wird, geht die Information über den tatsächlichen Elutionscharakter in den ersten Minuten und Stunden völlig verloren. Die Antibiotika werden nur mittels Diffusion aus den Knochenzementen

freigesetzt. Die physikalischen Rahmenbedingungen der Diffusion dürften im Agardiffusionstest mit aufgelegten PMMA-Plättchen aber die mögliche Ursache für die gleich großen Hemmhöfe bei den verschiedenen Zementen sein. Das Antibiotikum diffundiert sehr rasch aus dem Knochenzement in den Agar. Der Agar ist daraufhin mit dem Antibiotikum gesättigt und es können keine weiteren Antibiotikamoleküle aus dem Zement gelöst werden. Das heißt, es wird immer ein Maximum an Antibiotikum gelöst und erzeugt daher auch gleich große Hemmhöfe. Unabhängig davon, ob den Zementen 0,5g oder 1g Antibiotikum beigemischt ist: In den kleinen Formkörpern ist so viel Antibiotikum enthalten, dass dieser Mengenunterschied beim Agardiffusionstest nicht von Bedeutung ist und der Sättigungsgrad schon nach wenigen Minuten erreicht ist.

4.2 Elutionstest

Obwohl die verschiedenen Knochenzemente sehr unterschiedliche Elutionsprofile im Puffer aufweisen, konnten diese Unterschiede in der Freisetzung der Antibiotika in dem von uns durchgeführten Agardiffusionstest nicht gefunden werden. Aufgrund der Annahme, dass der Agardiffusionstest nicht geeignet ist um diese Unterschiede zu identifizieren, wurde ein anderes Testverfahren gewählt (Elutionstest). Dieser Test wurde exemplarisch mit den Knochenzementen Palacos[®] R+G (mit 0,5 g Gentamicin/40g Pulver) und CMW 1G (mit 1,0 g Gentamicin/40g Pulver) durchgeführt, da sich diese Zemente in ihren Elutionsprofilen stark unterscheiden (2,16,60). Generell wurden im Elutionstest kleinere Hemmhöfe gemessen als im Agardiffusionstest. Da die Bakterien direkt auf der Oberfläche des Agars wachsen, ist im Agardiffusionstest das aus den Formkörpern gelöste Antibiotikum sofort auf der Agaroberfläche verfügbar. Im Unterschied dazu ist im Elutionstest die Puffer-Antibiotika-Lösung über die gesamte Schichtdicke des Agars verteilt. Das heißt, die Antibiotika-Lösung muss in horizontaler Richtung durch die gesamte Dicke des Agars diffundieren. Darin könnten auch die geringeren Durchmesser der Hemmhöfe begründet sein.

Obwohl im Knochenzement CMW 1G die doppelte Menge an Antibiotikum enthalten ist als im Palacos[®] R+G, erzeugt dieser über die gesamte Testdauer (Ausnahme 15-Minuten-Eluat) kleinere Hemmhofdurchmesser als der Palacos[®] R+G. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das im CMW 1G enthaltene

Gentamicin schlechter gelöst werden kann. Während die Eluate des Palacos® R+G zu allen Versuchszeitpunkten einen messbaren Hemmhofdurchmesser erzeugen konnten, wird beim CMW 1G am 6. und 14. Versuchstag nicht mehr genügend Gentamicin freigesetzt um das Bakterienwachstum zu hemmen. Die größten Hemmhofdurchmesser wurden mit den 15-Minuten-Eluaten erzielt. Danach folgt eine stetige Größenabnahme der Hemmhöfe bis inklusive den 6-Stunden-Eluaten. Eine Zunahme der Größe der Hemmhöfe am Versuchstag 1 ist nicht verwunderlich, da die Formkörper viel länger im Puffer verblieben als zu Beginn. Das heißt, durch die längere Verweildauer in dem gleichen Pufferröhrchen kann sich auch dementsprechend mehr Antibiotikum lösen. Von Tag 1 bis Tag 7 erfolgte der Wechsel in einen frischen Puffer täglich. Die Größe der Hemmhöfe nimmt auch hier erwartungsgemäß vom Versuchstag 1 bis 6 ab. Nicht vorhersehbar war die neuerliche Zunahme am Tag 7, obwohl die Formkörper genauso wie an den Tagen zuvor für nur 24 Stunden im Puffer gelegen sind. Beim Wechsel in frische Pufferröhrchen wurde die Oberfläche der Formkörper immer abgetrocknet. An diesem Tag wurde die Übertragung der Formkörper von einer anderen Person durchgeführt. Möglicherweise hat diese vergessen die Oberfläche abzutrocknen, und dadurch wurde bereits gelöstes Antibiotikum in den frischen Puffer übertragen.

Zwar wurden die Elutionsversuche nur mit den Knochenzementen Palacos® R+G und CMW 1G durchgeführt, doch sind diese Ergebnisse mit den Elutionsprofilen dieser Zemente im Puffer vergleichbar. Um die Ergebnisse abzusichern müssen sicherlich noch Versuche mit mehreren Knochenzementen durchgeführt werden.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Spierings P. Bone Cements - Are They Different? In: Walenkamp G, editor. Local Antibiotics in Arthroplasty Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag; 2007. p. 31-39.
- (2) Kuehn KD, Ege W, Gopp U. Acrylic bone cements: composition and properties. Orthop Clin North Am 2005 Jan;36(1):17-28, v.
- (3) Biehl G, Harms J, Hanser U. Experimental studies on heat development in bone during polymerization of bone cement. Intraoperative measurement of temperature in normal blood circulation and in bloodlessness. Arch Orthop Unfallchir 1974;78(1):62-69.
- (4) Labitzke R, Paulus M. Intraoperative measuring of temperature in the surgery of hip during the polymerisation of the bone cement palacos (author's transl). Arch Orthop Unfallchir 1974;79(4):341-346.
- (5) Reckling FW, Dillon WL. The bone-cement interface temperature during total joint replacement. J Bone Joint Surg Am 1977 Jan;59(1):80-82.
- (6) Toksvig-Larsen S, Franzen H, Ryd L. Cement interface temperature in hip arthroplasty. Acta Orthop Scand 1991 Apr;62(2):102-105.
- (7) Munson FT. HD. Facial reconstruction with acrylic resin. Am J Surg 1941;3:18-21.
- (8) Judet J, Judet R. The use of an artificial femoral head for arthroplasty of the hip joint. J Bone Joint Surg Br 1950 May;32-B(2):166-173.
- (9) Scales JT, Herschell W. Perspex in Orthopaedics. Br Med J 1945 Sep 29;2(4421):423-424.
- (10) Haboush EJ. A new operation for arthroplasty of the hip based on biomechanics, photoelasticity, fast-setting dental acrylic, and other considerations. 1953 [classicle article. Bull Hosp Jt Dis 1996;55(2):95-111.
- (11) Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. J Bone Joint Surg Br 1960 Feb;42-B:28-30.
- (12) Buchholz HW, Engelbrecht H. Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. Chirurg 1970 Nov;41(11):511-515.
- (13) Kühn K. Antibiotic - Loaded Bone Cements - Antibiotic Release and Influence on Mechanical Properties. In: Walenkamp G, editor. Local Antibiotics in Arthroplasty Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag; 2007. p. 47-57.
- (14) van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. Acta Orthop Scand 2001 Dec;72(6):557-571.

- (15) Frommelt L. Antibiotic Choices in Bone Surgery - Local Therapy using Antibiotic - Loaded Bone Cement. In: Walenkamp G, editor. Local Antibiotics in Arthroplasty Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag; 2007. p. 59-64.
- (16) Wahlig H, Dingeldein E. Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthop Scand* 1980 Feb;51(1):49-56.
- (17) Lewis G. Properties of acrylic bone cement: state of the art review. *J Biomed Mater Res* 1997 Summer;38(2):155-182.
- (18) Antti-Poika I, Josefsson G, Konttinen Y, Lidgren L, Santavirta S, Sanzen L. Hip arthroplasty infection. Current concepts. *Acta Orthop Scand* 1990 Apr;61(2):163-169.
- (19) Harris WH, Sledge CB. Total hip and total knee replacement (2). *N Engl J Med* 1990 Sep 20;323(12):801-807.
- (20) Espehaug B, Engesaeter LB, Vollset SE, Havelin LI, Langeland N. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Review of 10,905 primary cemented total hip replacements reported to the Norwegian arthroplasty register, 1987 to 1995. *J Bone Joint Surg Br* 1997 Jul;79(4):590-595.
- (21) Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 2004 Apr 1;350(14):1422-1429.
- (22) An YH, Friedman RJ. Prevention of sepsis in total joint arthroplasty. *J Hosp Infect* 1996 Jun;33(2):93-108.
- (23) Fitzgerald RH, Jr. Infected Total Hip Arthroplasty: Diagnosis and Treatment. *J Am Acad Orthop Surg* 1995 Oct;3(5):249-262.
- (24) Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987 Sep 25;237(4822):1588-1595.
- (25) Gristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg Am* 1985 Feb;67(2):264-273.
- (26) Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR, Anderson N, Davis RI, et al. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg Br* 1998 Jul;80(4):568-572.
- (27) Soriano A, Garcia-Ramiro S, Mensa J. Antimicrobial Prophylaxis in Orthopaedic Surgery. In: Meani E, Romanò C, Crosby L, Hofmann G, editors. *Infection and Local Treatment in Orthopedic Surgery*: Springer; 2007. p. 49-57.
- (28) Neut D, van der Mei H, Bulstra S, Busscher H. Infection of Orthopaedic Implants - Bacterial Adhesion and the Role of Local Antibiotics. In: Walenkamp G, editor. *Local Antibiotics in Arthroplasty* Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag; 2007. p. 1-11.

- (29) Ahnfelt L, Herberts P, Malchau H, Andersson GB. Prognosis of total hip replacement. A Swedish multicenter study of 4,664 revisions. *Acta Orthop Scand Suppl* 1990;238:1-26.
- (30) Ainscow DA, Denham RA. The risk of haematogenous infection in total joint replacements. *J Bone Joint Surg Br* 1984 Aug;66(4):580-582.
- (31) Gilbert P, Collier PJ, Brown MR. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob Agents Chemother* 1990 Oct;34(10):1865-1868.
- (32) Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-745.
- (33) Engesaeter LB, Lie SA, Espehaug B, Furnes O, Vollset SE, Havelin LI. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop Scand* 2003 Dec;74(6):644-651.
- (34) Thierse L. Experiences with Refobacin-Palacos with regard to deep late infections following hip-joint endoprosthesis surgery. A 4-years' study (author's transl). *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1978;116(6):847-852.
- (35) Wannske M, Tscherne H. Results of prophylactic use of Refobacin-Palacos in implantation of endoprostheses of the hip joint in Hannover. *Aktuelle Probl Chir Orthop* 1979;(12)(12):201-205.
- (36) Pfarr B, Burri C. Prospective study on the effect of gentamycin-Palacos in 200 total hip prostheses. *Aktuelle Probl Chir Orthop* 1979;(12)(12):207-210.
- (37) Gristina AG. Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. *Clin Orthop Relat Res* 1994 Jan;(298)(298):106-118.
- (38) Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999 May 21;284(5418):1318-1322.
- (39) 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.
- (40) 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.
- (41) Baiocchi P, Martino P. The Limits of Systemic Antibiotics in Device-related Infections. In: Meani E, Romanò C, Crosby L, Hofmann G, editors. *Infection and Local Treatment in Orthopedic Surgery*: Springer; 2007. p. 58-61.

- (42) 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.
- (43) 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.
- (44) Witso E. The Limits of the Local Antibiotic Therapy. In: Meani E, Romanò C, Crosby L, Hofmann G, editors. *Infection and Local Treatment in Orthopedic Surgery*: Springer; 2007. p. 68-72.
- (45) 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.
- (46) Hetrick EM, Schoenfisch MH. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem Soc Rev* 2006 Sep;35(9):780-789.
- (47) Lundberg A, Hedlund H. Antibiotic Bone Cement as a Prophylactic Means in Joint Replacement Surgery. In: Meani E, Romanò C, Crosby L, Hofmann G, editors. *Infection and Local Treatment in Orthopedic Surgery*: Springer; 2007. p. 62-66.
- (48) 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.
- (49) Schiefer UR, Heiss C, Dingeldein E, Wenisch S, Schnettler R, Kilian O. Elution kinetics and antimicrobial effects of gentamicin- and clindamycin-loaded bone cements in vitro. *Z Orthop Unfall* 2008 Jan-Feb;146(1):92-98.
- (50) Meyer J, Piller G, Spiegel CA, Hetzel S, Squire M. Vacuum-mixing significantly changes antibiotic elution characteristics of commercially available antibiotic-impregnated bone cements. *J Bone Joint Surg Am* 2011 Nov 16;93(22):2049-2056.
- (51) Elson RA, Jephcott AE, McGeachie DB, Verettas D. Antibiotic-loaded acrylic cement. *J Bone Joint Surg Br* 1977 May;59(2):200-205.
- (52) 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.
- (53) 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.
- (54) Anguita-Alonso P, Rouse MS, Piper KE, Jacofsky DJ, Osmon DR, Patel R. Comparative study of antimicrobial release kinetics from polymethylmethacrylate. *Clin Orthop Relat Res* 2006 Apr;445:239-244.

(55) 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.

(56) 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.

(57) Gonzalez Della Valle A, Bostrom M, Brause B, Harney C, Salvati EA. Effective bactericidal activity of tobramycin and vancomycin eluted from acrylic bone cement. *Acta Orthop Scand* 2001 Jun;72(3):237-240.

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

(59) Bistolfi A, Massazza G, Verné E, Massè A, Deledda D, Ferraris S, et al. ANTIBIOTIC LOADED CEMENT IN ORTHOPEDIC SURGERY. A review. International Scholarly Research Network ISRN Orthopedics 2011.

(60) Penner MJ, Duncan CP, Masri BA. The in vitro elution characteristics of antibiotic-loaded CMW and Palacos-R bone cements. *J Arthroplasty* 1999 Feb;14(2):209-214.