

Diplomarbeit

**Anti-infektive Ausrüstung zementfreier
Titanimplantate mit Gentamicinpalmitat**

eingereicht von

Stefan Klaus Kogler

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

Univ.-Prof. Dr.rer.nat Klaus-Dieter Kühn

Mag. Dr.rer.nat Gernot Zarfel

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 03.09.2014

Stefan Klaus Kogler eh

Vorwort

Da ich ein großes Interesse an der Orthopädie und der Mikrobiologie habe, war dieses Thema eine Chance für mich, diese beiden Spezialfächer zu kombinieren und mich in deren Literatur einzulesen.

Schon früh bemerkte ich, welche große wissenschaftliche Bandbreite das Thema beinhaltet und manche spezifischen Fragestellungen für sich eine eigene Diplomarbeit wert wären. Somit bestand die Herausforderung darin, sich dem essentiellen Kern des Gegenstandes zu widmen.

Ein persönlicher Höhepunkt war die Posterpräsentation meiner Arbeit bei der 34. Jahrestagung der ÖGHMP in Bad Ischl.

Poster:

Hygiene, Microbiology and Preventive Medicine (ÖGHMP), 34th biennial Conference, June 2-5 2014, Bad Ischl/Austria

Study an antiinfective coatings of implants

S.K. Kogler, M. Glehr, A. Leithner, K.D. Kühn, A. Grisold, C. Kittinger

Danksagungen

Mein großer Dank gilt Herrn Dr. Clemens Kittinger und Herrn Dr. Gernot Zarfel, die mir bei der praktischen Durchführung der Experimente fachlich zur Seite standen und für die wissenschaftliche Betreuung der Diplomarbeit.

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

Bei Frau Bettina Folli und Michaela Lipp bedanke ich mich herzlich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Laborversuche.

Bedanken möchte ich mich auch beim Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin (Vorstand Prof. Dr. Andrea Grisold), bei der Klinik für Orthopädie und orthopädische Chirurgie (Klinikvorstand: Univ. Prof. Dr. Andreas Leithner) und bei der Medizinischen Universität Graz, für die Möglichkeit der Umsetzung der Laborversuche.

Ich danke meinem Lehrer und guten Freund, Bernhard Sallay, der in mir schon in jungen Jahren das Interesse an der Wissenschaft geweckt hat.

Ein Herzliches Dankeschön meiner Mutter, Julia Kogler. Danke für deine unablässige Unterstützung während meines gesamten Studiums. Ohne dich wäre das alles niemals möglich gewesen.

Zusammenfassung

Eine der gefürchtetsten Komplikationen in der orthopädischen Endoprothetik ist die periprothetische Infektion. Trotz systemischer Antibiotikaprophylaxe und moderner Operationstechniken sowie Laminar Airflow Technologie, steigt die Infektionsprävalenz stetig an. Wegen der therapeutischen Schwierigkeiten, die aufgrund der Implantat-assoziierten Infektionen entstehen, ist es von großem Interesse, die Zahl der Infektionen einzudämmen. Eine vielversprechende Möglichkeit der Infektionsprävention von zementfreien Titanimplantaten ist Gentamicinpalmitat (GP), ein auf Implantatoberflächen selbsthaftender antibiotischer Fettsäurekomplex.

Ziel der Studie war es, die Wirksamkeit einer Gentamicinpalmitat-Beschichtung darzustellen, die auf sterile Kirschnerdrähte aufgebracht war.

In den Versuchen wurde die Wirkung von GP auf *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) und *Escherichia coli* (*E.coli*) innerhalb der ersten 24 Stunden und darüber hinaus beobachtet. Zusätzlich wurde von beschichteten Kirschnerdrähten die Bestimmung der Menge an freigesetztem GP pro Zeit durchgeführt. Die Kirschnerdrähte wurden in PBS-Puffer eluiert. Mittels Agardiffusionstest wurde die Wirksamkeit gegen *S.aureus* und *E.coli* bestimmt. In weiterer Folge wurde eine Absterbekinetik von *S.aureus* durchgeführt. Außerdem wurde eine Eichgerade mit bekannten Konzentrationen von Gentamicin erstellt, um die Absolutwerte des freigesetzten GP bestimmen zu können. Darüber hinaus wurde die Gewichtsänderung vor und nach der Elution gemessen.

Im Experiment löste sich das GP von den Kirschnerdrähten in Gegenwart von PBS und wies eine hohe Wirksamkeit in den ersten 24 Stunden gegenüber den Testbakterien auf. In den ersten 15 Minuten wurden 40,5% der 24-Stunden-Elution freigesetzt. Nach 1 Stunde waren 69% eluiert. Trotzdem war eine Freisetzung auch nach 24 und länger nachweisbar. Diese hohe initiale Freisetzung hat einen großen operativen Vorteil, da der Großteil des GP perioperativ gelöst wird, aber auch ausreichend Antibiotikum an der Implantatoberfläche verbleibt, um auch einen postoperativen Schutz zu gewährleisten.

Demzufolge stellt GP eine neue Option zur antiinfektiven Beschichtung von zementfreien Implantaten dar.

Abstract

Implant related infection is one of the most feared complications in orthopedic replacement surgery. Despite prophylactic systemic antibiotics, modern surgical techniques and air flow technologies in the operating room, the infection rate is still increasing. Because of the therapeutic difficulties in implant-associated infections it is of great interest to prevent as many infections as possible. A new possibility to avoid infections of cementless titan implants is a self-adhesive antibiotic fatty acid complex, gentamicinpalmitate (GP) that serves as an antiinfective coating. The aim of the study was to show the activity of GP on sterile Kirschner wires.

For that purpose we tested the applied GP against *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) and *Escherichia coli* (*E.coli*) within the first 24 hours, and further. In addition we tried to determine the amount of released GP on the desired time points. Additionally the GP coated Kirschner wires were eluted in buffer and aliquots were applied into several investigations. The effectiveness was tested with agar diffusion test against *S.aureus* and *E.coli*. In addition inactivation kinetics of *S.aureus* were carried out. Furthermore calibration curves with standard gentamicin solution were performed to determine absolute values of released GP. The weight difference between pre-and post-elution phase was calculated.

In the experiments sterile coated wires released gentamicinpalmitate and showed high efficacy in eliminating bacteria in the first 24 hours. In the first 15 minutes 40.5% of the 24h-elution were set free. After 1 hour 69% were released. However, a release is still detectable after 24 hours and later on. The high initially release has a large surgical benefit, because the majority of GP is released perioperatively and sufficient antibiotic will remain within the implant and bone interface postoperatively.

So the use of GP represents a new option for the antiinfective coating of cementless titan implants.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie postoperativer Infektionen	1
1.2	Bakterielles Keimspektrum.....	1
1.3	Bakterielle Ansiedelung auf orthopädischen Prothesen	2
1.4	Diagnostik der postoperativen Infektion	4
1.5	Therapieoptionen bei postoperativen Infektionen.....	5
1.5.1	Antibiotikatherapie, Debridement und Lavage:.....	5
1.5.2	Ein-Phasen Revision:.....	6
1.5.3	Zwei-Phasen Revision:	7
1.5.4	Permanente Extraktion infizierter Implantate, Arthrodesse und Amputation	8
1.6	Prophylaxe von postoperativen Infektionen	8
1.6.1	Systemische Verwendung von Antibiotika	9
1.6.2	Knochenzemente mit Antibiotika	10
1.7	Antiinfektive Beschichtungen	10
1.7.1	Gentamycinpalmitat (GP).....	11
1.7.2	Alternative Implantatmodifikationen	12
1.7.3	Unterschiede einer GP-Beschichtung gegenüber gentamicinhaltigen Knochenzement	13
1.7.4	Mögliche Probleme	14
1.8	Fragestellung – Ziel der Studie	14
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Verwendete Lösungen und Puffer.....	16
2.2	Nährmedien.....	16
2.3	Sonstige Substanzen	17
2.4	Teststämme:	17
2.5	Verwendete Beschichtungen.....	18
2.6	Beschichtungsverfahren.....	18
2.6.1	Ergebnisse	19
2.7	Elutionsexperiment.....	20
2.8	Inokulation.....	22
2.9	Elutionstestung.....	22
2.10	Eichreihe.....	23

2.10.1	Messung	23
2.10.2	Bestimmung der Absolutmenge an Gentamycin	23
2.11	Absterbekinetik	23
2.12	Datenanalyse.....	24
2.13	Beschichtung mit Vancomycin in Palmitinsäure	24
3	Resultate	26
3.1	Eichreihe	26
3.1.1	Eichgerade <i>S.aureus</i>	26
3.1.2	Eichgerade <i>E.coli</i>	26
3.2	Bestimmung der Absolutmenge an Gentamycinbase (GB).....	27
3.3	Menge an freigesetzten Gentamicin aus GP.....	28
3.4	Elutionstest.....	30
3.4.1	Elutionstest von GP-beschichteten Kirschnerdrähten mit <i>S.aureus</i>	30
3.4.2	Vergleich zwischen Raumtemperatur und Körpertemperatur.....	31
3.4.3	Elutionstest mit <i>E.coli</i>	32
3.5	Absterbekinetik von <i>Staphylococcus aureus</i>	32
3.6	Zusatzbeschichtung mit Vancomycinpalmitat (VP)	33
4	Diskussion	35
4.1	Elution des GP	35
4.1.1	Diffusionstestung mit <i>S.aureus</i>	35
4.1.2	Diffusionstestung mit <i>E.coli</i>	35
4.1.3	Analyse der Elution	36
4.1.4	Gewichtsmessung.....	36
4.1.5	Auswirkung der Temperatur	37
4.2	Genauigkeit der Eichgerade.....	37
4.3	Absterbekinetik.....	39
4.4	Folgen für die Osseointegration	40
4.5	Versuche zur Selbstbeschichtung	41
4.6	Klinische Relevanz.....	41
	Referenzen:.....	43

Glossar und Abkürzungen

Agar: Nährmedium für Mikroorganismen

Agardiffusionstest: Ein Test zur Ermittlung der antibakteriellen Wirkung von Antibiotika auf einen bestimmten Erreger.

Biofilm: Eine durch Mikroorganismen auf Oberflächen gebildete Schicht, die eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen Umwelteinflüsse und das Immunsystem hat.

Elution: das Ab- oder Herauslösen von Substanzen aus stationären Phasen

Elutionstest: Elution der Antibiotika mit anschließendem Agardiffusionstest

Endoprothetik: Technik mit Implantaten, die dauerhaft im Körper verbleiben

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

H-TEP: Hüft-Totalendoprothese ist ein vollständiger Gelenkersatz einer Hüfte

KBE: koloniebildende-Einheiten

MHK: Die Minimale Hemm-Konzentration bezeichnet die niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der die Vermehrung von Mikroorganismen nicht wahrgenommen werden kann

Müller-Hinton-Agar: Zur Bestimmung von Antibiotikaresistenzen verwendende Nährmedium.

PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung, ist eine isotonische Pufferlösung, die in der Biochemie verwendet wird.

Periprothetisch: der Bereich, der die Prothese umgibt

REM: Rasterelektronenmikroskop

Spacer: Ein eingesetzter Platzhalter anstelle einer Prothese

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der identifizierten Bakterien aus Punktaten (Prof. Andrea Grisold, Institut für Hygiene, Graz; Diplomarbeit J.Stadler)	2
Abbildung 2: Genese eines Biofilm (9)	4
Abbildung 3: Unbeschichteter Kirschnerdraht (Heraeus Medical GmbH, Hemoteq AG).....	19
Abbildung 4: Beschichteter Kirschnerdraht (Heraeus Medical GmbH, Hemoteq AG).....	20
Abbildung 5: Beschichteter Kirschnerdraht im REM (250-fache Vergrößerung, Heraeus Medical GmbH, Hemoteq AG)	20
Abbildung 6: Elutionsversuch mit einem Kirschnerdraht im PBS-Puffer	21
Abbildung 7: Rotator zum Ausplattieren von <i>S.aureus</i> Suspension auf Müller-Hinton-Platten.....	22
Abbildung 8: Eichgeraden der Teststämme: Darstellung der mittleren Hemmhofdurchmesser von <i>S.aureus</i> und <i>E.coli</i> auf der y-Achse. Die Genatmicinsulfat-Konzentrationen sind auf der x-Achse aufgetragen.....	27
Abbildung 9: Die verwendeten Kirschnerdrähte mit GP-Beschichtung, nach Lufttrocknung nach der Elution im PBS-Puffer (bei der weißen Schicht handelt es sich um die Salzreste des Puffers), und nach der Elution in Methanolbad (v.l.n.r.)	29
Abbildung 10: Hemmhöfe <i>S.aureus</i> . Die y-Achse zeigt die mittleren Hemmhofdurchmesser der Eluate von jeweils 3 Agarplatten. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte der Eluatentnahme dargestellt.	30
Abbildung 11: Temperaturdifferenz bei <i>S.aureus</i> . Die y-Achse zeigt die mittleren Hemmhofdurchmesser der Eluate bei Temperaturen von 23°C und 37°C bei Elution mit <i>S.aureus</i> . Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte der Eluatentnahme dargestellt.....	31
Abbildung 12: Hemmhöfe <i>E.coli</i> : Die y-Achse zeigt die mittleren Hemmhofdurchmesser der Eluate von jeweils 3 Agarplatten. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte der Eluatentnahme dargestellt.	32

Abbildung 13: Absterbekinetik von *Staphylokokkus aureus* über 24h. Auf der y-Achse ist die mittlere KBE in log-Stufen angegeben. Auf der x-Achse sind die Entnahmezeitpunkte eingetragen..... 33

Abbildung 14: Kirschnerdraht nach dem Selbstbeschichtungsversuch. Man erkennt deutlich die dicke Schicht an Palmitat, welche die gesamte Oberfläche bedeckt..... 34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des verwendeten MH-Agar, Nährbodenküche Hygiene Graz	16
Tabelle 2: Zusammensetzung des verwendeten Blutagar, Nährbodenküche Hygiene Graz	17
Tabelle 3: Zusammensetzung des verwendeten MHB, Nährbodenküche Hygiene Graz.....	17
Tabelle 4: Die Konzentrationen an Gentamicin errechnet aus den Mittelwerten der Hemmhöfe von <i>S.aureus</i> in mm nach 0,25h, 1h und 24h. Man sieht auf die Absolutmenge an Gentamicin in µg und den prozentuellen Anteil der Menge in Bezug auf den 24h-Wert, der mit >95% angegeben wird	28
Tabelle 5: Gewichte der Kirschnerdrähte vor bzw. nach 24h Elution und nach weiteren 24h Methanolbad (zur Ermittlung der Gesamtmenge an GP auf den Kirschnerdrähten). Die unterste Zeile der Tabelle zeigt die Mittelwerte.....	29
Tabelle 6: Gewichte der Eigenbeschichtungsversuche bei unterschiedlicher Temperatur und Verweildauer im flüssigen Palmitat	34

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie postoperativer Infektionen

Eine der gefürchtetsten Komplikationen in der orthopädischen Endoprothetik ist die periprothetische Infektion. Trotz prophylaktischer systemischer Antibiotikatherapie und modernen Operationstechniken und Technologien im Operationssaal beträgt die Infektionsrate in der orthopädischen Implantatchirurgie mindestens 1-3% (1,2). Bei den Hüft-Totalendoprothesen (H-TEP) wird die Infektionsrate mit ca. 0,8-1,2% (3) angegeben. In den USA müssen 14,8% aller Revisionseingriffe aufgrund von postoperativen Infektionen durchgeführt werden (4). Auch wenn durch verschiedene prophylaktische Maßnahmen die Inzidenz von tiefen Infektionen gesenkt wurde, steigt durch die ständig steigende Zahl an Gelenkersatzoperationen die Prävalenz weiter signifikant an (5).

1.2 Bakteriellles Keimspektrum

Die häufigsten bakteriellen Erreger, die mit periprothetischen Infektionen in Verbindung gebracht werden, sind koagulasepositive (*Staphylokokkus aureus*) und koagulasenegative Staphylokokken (primär *Staphylokokkus epidermidis*) (2,6). Diese beiden Stämme alleine sind für mehr als 60% aller Infektionen verantwortlich (6-8). *S.aureus* ist der Hauptvertreter bei Infektionen von Metallimplantaten (9), während hingegen *S.epidermidis* vor allem bei Biomaterialien auf Kunststoffbasis zu finden ist (10).

Des Weiteren findet man von postoperativen Implantatinfektionen in 7,4-15% der Punktionen gram-negative Bakterien (7,8) wie zum Beispiel *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*. Ebenso findet man Vertreter aus der Proteus-Gruppe wie *Proteus mirabilis* und *Proteus vulgaris* (6).

Abbildung 1 zeigt die Verteilung der infektionsverursachenden Bakterien in Graz.

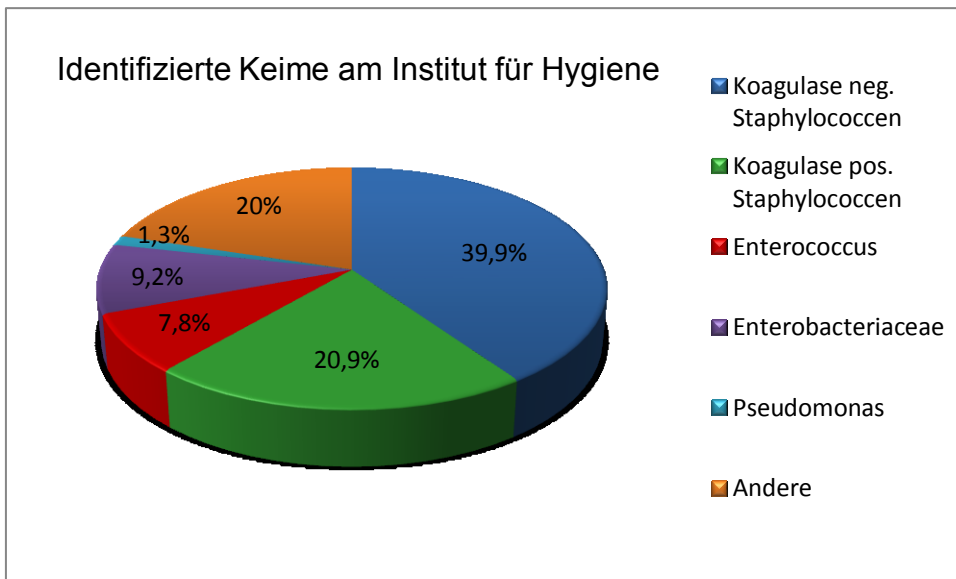


Abbildung 1: Verteilung der identifizierten Bakterien aus Punkttaten (Prof. Andrea Grisold, Institut für Hygiene, Graz; Diplomarbeit J.Stadler)

1.3 Bakterielle Ansiedelung auf orthopädischen Prothesen

In den unterschiedlichen Fachgebieten der Medizin werden Biomaterialien verwendet, die aus den verschiedensten Materialien bestehen. Sie übernehmen Aufgaben wie den Ersatz von funktionsuntüchtigen Körperteilen oder die Unterstützung des Körpers in seiner Funktion. Beispiele für solche Biomaterialien sind Blasenkatheter, Nägel und Platten für die Osteosynthese und auch Gelenkprothesen. Solche für den Körper „fremde“ Materialien sind stets gefährdet, dass Mikroorganismen die Oberflächen dieser Biomaterialien als Rückzugsgebiet nutzen und sie rasch besiedeln (10). Die größte Gefahr einer Implantat-assoziierten Infektion mit Keimen besteht im Operationssaal, einerseits durch das Operationsteam andererseits durch die Patientin oder den Patienten selbst. Die Bakterien können während der Operation von der Luft oder von der Haut der Patientin oder des Patienten in die Wunde eindringen (11). Viele dieser Keime haben die Fähigkeit zur Adhärenz auf den Implantatoberflächen. Dort können sie proliferieren und akkumulieren. Es entsteht ein mehrschichtiger Zellverband, der sogenannte Biofilm (12). Die mit Abstand häufigsten Bakterien, die solche Biofilme bilden, sind *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*.

Der erste Schritt bei der Bildung eines Biofilms ist die Anlagerung von Makromolekülen aus der unmittelbaren Umgebung des Implantats (Figur a, Abb. 2). Dabei handelt es sich oftmals um verschiedene Plasmaproteine (z.B. Albumine und Globuline). Eine oberflächliche Anlagerung kann bereits unmittelbar nach der Implantation eines Fremdkörpers beobachtet werden (9). Auf bzw. an diesen Makromolekülen können sich Bakterien sehr leicht anheften (Figur b, Abb. 2). Die Keime produzieren rasch eine extrazelluläre muköse Matrix, die hauptsächlich aus Polysacchariden und Proteinen besteht (Figur c, Abb. 2) und eine Abgrenzung bzw. einen Schutz gegen Umwelteinflüsse darstellt (Figur d, Abb. 2). Dies erschwert den Angriff des körpereigenen Immunsystems auf die Bakterien erheblich und macht eine Therapie mit systemischer Gabe von Antibiotika weitgehend unmöglich (13). Die zur Therapie notwendigen lokalen Wirkstoffkonzentrationen für Keime im Biofilm steigen dabei um ein Vielfaches – z.B. das bis zu 234-fache (14). Zusätzlich können Bakterien untereinander kommunizieren, woraus sich ein koordiniertes Gruppenverhalten der Bakterien ergibt. Dieses Phänomen bezeichnet man als „Quorum sensing“ (15). Im Biofilm selbst befinden sich die Zellen im Inneren in einer Art „steady state“ (16) und haben einen deutlich reduzierten Stoffwechsel, während die Zellen am Rand des Biofilms proliferieren und einen normalen Stoffwechsel aufweisen.

Dadurch ist das Ziel einer Antibiotikatherapie, die gesamten Bakterien zu eradizieren, nahezu unmöglich, da die Bakterien im Zentrum des Biofilm erstens schwer zugänglich und zweitens in ihrer herangesetzten Stoffwechselsituation nicht sensibel für Antibiotika sind.

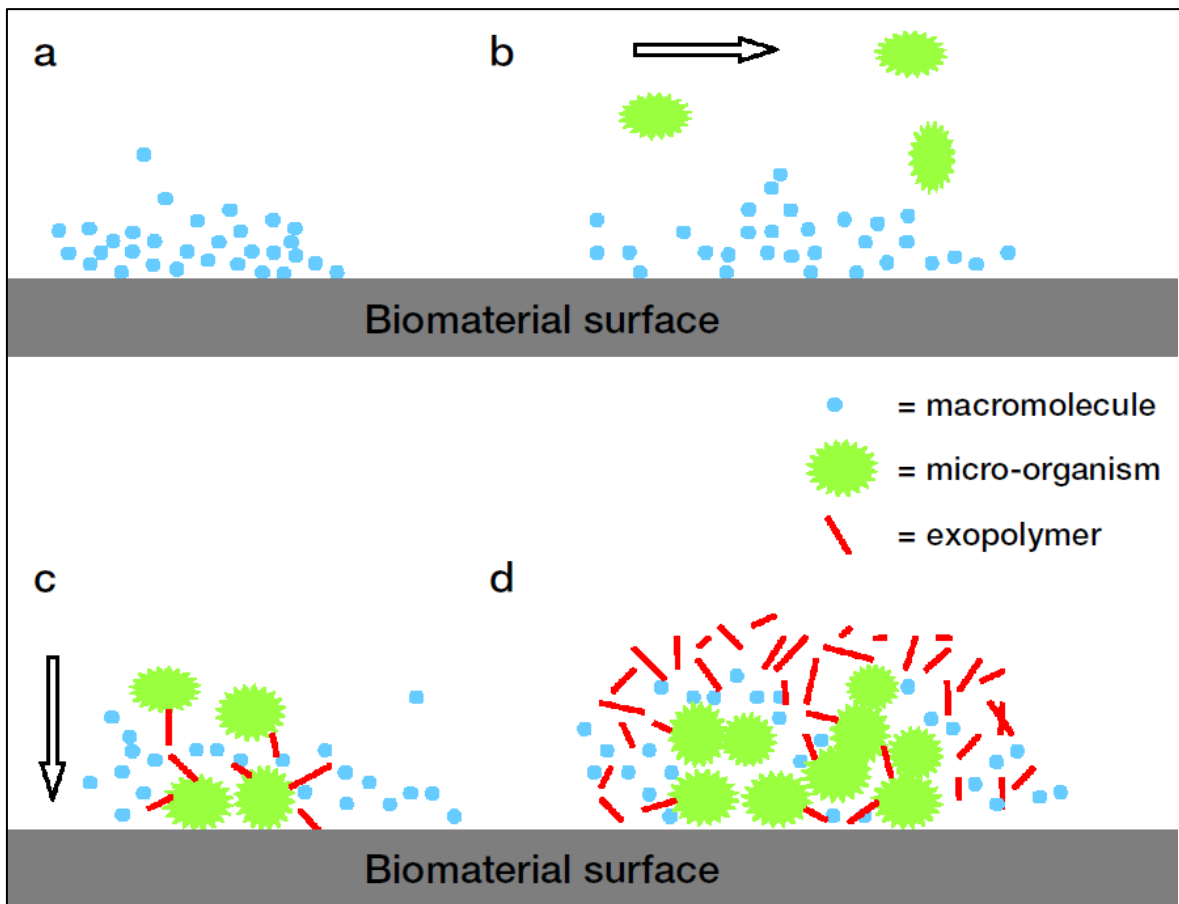


Abbildung 2: Genese eines Biofilm (9)

1.4 Diagnostik der postoperativen Infektion

Es gibt keine standardisierten Kriterien für Infektionen orthopädischer Implantate. Der Goldstandard ist der Kulturnachweis von Mikroorganismen in Gewebsbiopsien (17). Die Diagnose wird aufgrund von klinischen Symptomen gestellt. Dabei gelten Schmerzen in der Prothesenregion als ein wichtiges Zeichen. Auch Anamnese, klinische Tests, bildgebende Verfahren und verschiedene Laborparameter können über die Lage einer Patientin oder eines Patienten Aufschluss geben. Eine Erhöhung der Leukozytenzahl (Leukozytose) ist ein weiterer wichtiger Faktor für die Diagnose. Die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und das C-reaktive Protein (CRP) sind die am häufigsten verwendeten Laborparameter (18). Der Nachweis der Erreger basiert auf mikrobiellen oder histologischen Verfahren.

Es zeigt sich ein Unterschied zwischen Frühinfektionen und einer Spätinfektion. Akute Infektionen (innerhalb der ersten 4 Wochen postoperativ), die kurz nach der

Operation auftreten, sind einfacher zu diagnostizieren. Die Patientinnen und Patienten zeigen spezifische Symptome wie Fieber, lokale Rötung und Schwellung sowie anhaltende Wundsekretion (19). Es kann häufig ein hoch virulenter Erreger (*Staphylococcus aureus*) nachgewiesen werden (20). Bei Spätinfektionen (nach 4 Wochen postoperativ) zeigen sich häufig nur unspezifische Zeichen einer Prothesenlockerung. Die Diagnose zu stellen ist oft erheblich schwieriger und eine Infektion kann übersehen werden. Ein Grund dafür kann insbesondere im fehlenden Keimnachweis gesehen werden, da bei späten Infektionen stoffwechselarme Keime (20) und/oder durch unsachgemäße Vortherapie resistente Bakterien kaum noch mit Sicherheit bestimmt werden können. Zudem können Mischinfektionen vorkommen und dabei nicht alle an der Infektion beteiligten Keime zweifelsfrei detektiert werden. Dies kann dazu führen, dass eine versteckte Infektion als aseptische Lockerung diagnostiziert wird und es so zu einer falschen Therapie kommt. Am besten wird dies durch eine adäquate Kultivierung und eine höhere Anzahl an Gewebeproben verhindert (21,22).

Eine Studie von Tunney et al. (23) zeigt, dass in vielen Revisionsfällen eine Infektion unerkannt bleibt, da die Standard-Kultivierungstechniken die Bakterien nicht detektiert können. Werden jedoch aufwendigere Verfahren verwendet, werden einerseits in vorher negativen Proben Keime gefunden und andererseits häufig mehrere verschiedene Keime detektiert (23,24). Durch die heute immer sensibler werdenden Bestimmungsmethoden muss befürchtet werden dass die tatsächliche Infektionsrate periprothetischer Infekte signifikant höher ist als publiziert.

1.5 Therapieoptionen bei postoperativen Infektionen

1.5.1 Antibiotikatherapie, Debridement und Lavage:

Es gibt kein einheitliches Vorgehen bei der Bekämpfung von Implantat assoziierten Infektionen. Die einfachste Form der Behandlung von oberflächlichen Infektionen ist die alleinige Gabe von Antibiotika (25) ohne Chirurgie. Die Symptome bessern sich unter dieser Therapie, jedoch besteht immer die große Gefahr der Verschleppung des Infekts und des Übergangs in eine tiefe und chronische Infektion, vor allem wenn falsche Antibiotika gegeben werden oder die

Antibiotikagabe zu kurz angesetzt ist. Es kommt dann zu einer deutlichen Verschlechterung der Prognose unter weiteren Therapien. Eine gelenkserhaltende Therapie ist nur bei Frühinfekten erfolgversprechend, bei denen der Erreger und dessen Resistenz bekannt ist (19). Denkbar ist diese Option aber auch bei nicht operationstauglichen Patientinnen und Patienten.

Bei einem Frühinfekt kann ein Implantat-erhaltendes Vorgehen erfolgreich sein. Bei dieser Operation wird das infizierte Implantat im Patient bzw. in der Patientin belassen, das infizierte Gewebe wird entfernt (Debridement) und eine Spülung der infizierten Wunde durchgeführt (Lavage), um die Erreger so gut wie möglich zu entfernen. Neben diesen Maßnahmen ist es wichtig, die Polyethylen-Inlays, welche den mobilen Teil der Prothese darstellen, auszutauschen. Das im Knochen verankerte Implantat bleibt erhalten. Diese Form der Therapie zeigt jedoch nur dann ein gutes Ergebnis für die Patientin bzw. den Patienten, wenn es sich um eine akute Infektion handelt (19) und nach zwei oder maximal drei Wochen nach Auftreten der ersten Symptome operiert wird und das Implantat gut funktioniert und keine Lockerung aufweist (26).

1.5.2 Ein-Phasen Revision:

Bei dieser Operationsmethode wird das infizierte Implantat explantiert, ein radikales Debridement vorgenommen und eine neue Prothese eingesetzt (27,28). Beim Implantataustausch muss die gesamte Prothese ausgebaut werden und alle Zementreste entfernt werden. Zusätzlich erfolgt auch hier eine antibiotische Abschirmung der Patientin bzw. des Patienten zuerst intravenös und danach oral. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass für die Patientin bzw. den Patienten weniger Behandlungsstress besteht und der Krankenhausaufenthalt kürzer ist als beim mehrphasigen Wechsel. Daraus ergibt sich auch ein geringeres Risiko an operativen Komplikationen, da nur ein Eingriff notwendig ist. Auch sind die Kosten für einen Eingriff geringer als bei einer Zwei-Phasen Revision, weil die Patientin bzw. der Patient viel früher die Funktion des Gelenks zurück erlangt.

Voraussetzung für den Erfolg dieser Behandlungsmethode ist eine gute Knochenqualität der Patientin bzw. des Patienten. Unverzichtbar ist eine exakte Identifikation des/der Keime/s und der/en Resistenz. Lokal bietet sich ein gut Antibiotika (AB) freisetzender PMMA-Zement an, systemisch wird eine intravenöse

Langzeittherapie mit Antibiotika essentiell für eine erfolgreiche Behandlung (29). Der einzeitige Wechsel kann aber auch zementfrei erfolgen und ist verbunden mit einer hohen und bisweilen recht langen systemischen AB-Therapie.

1.5.3 Zwei-Phasen Revision:

Diese gilt für viele Autorinnen und Autoren als der Goldstandard der Revisionstherapie und wird am häufigsten bei tiefen Infektionen verwendet, für deren Erreger oft keine biofilmaktiven Antibiotika zur Verfügung stehen (19,27,30). Das Vorgehen während der ersten Operation beinhaltet die Explantation des infizierten Implantats (30), ein Debridement sowie gegebenenfalls eine Lavage. Nach der Implantatentfernung, Debridement und Lavagierung wird eine aus Knochenzement gefertigte temporäre Interimprothese, ein sogenannter Spacer, eingesetzt, dessen Aufgabe darin besteht, einerseits die Kontraktur des umliegenden Weichteilgewebes zu verhindern, andererseits durch gezielte lokale Wirkstoffabgabe die chirurgischen Maßnahmen adjuvant zu unterstützen. Nach einer „Beruhigungsphase“ ist ein weiterer, zweiter Eingriff notwendig. Dabei wird der Spacer wieder entfernt und ein neues Implantat eingesetzt. Diese Zeit zwischen den Eingriffen ist für die Abheilung der Infektion notwendig. Gute Ergebnisse werden bei einer Wartezeit bzw. Spacertragezeit von 6 Wochen erzielt (31).

Der Vorteil dieser Operationstechnik ist, dass man beim Initialeingriff lokal Antibiotika applizieren und eine intraoperative Kultur anlegen kann, um für die zweite Operation die am besten wirkende Antibiotikatherapie einsetzen zu können (29). Die Infektion kann abheilen, ohne dass die noch vorhandenen Restkeime das neue Implantat besiedeln. Die lange Immobilität der Patientin bzw. des Patienten, das Komplikationsrisiko, das zwei operative Eingriffe in sich bergen sowie die höheren Kosten sind die Nachteile. Bei dieser Behandlungsmethode zeigt sich jedoch eine Erfolgsrate von bis zu 96% (25,27) und sogar bis zu 100%, wenn ein Knochenzement-Spacer mit geeigneten Antibiotika und idealer Freisetzung für die Zeit zwischen den beiden Operationen eingesetzt wird (32).

Die Zwei-Phasen Revision wird vor allem bei schweren tiefen Infektionen durchgeführt, bei denen mehrere Keime identifiziert werden können, die für die jeweilige Infektion verantwortlich sind.

Die Revisionsprothese kann anschließend entweder zementiert oder auch zementfrei eingesetzt werden.

1.5.4 Permanente Extraktion infizierter Implantate, Arthrodesen und Amputation

Sollte die Infektion soweit fortgeschritten sein, dass keine der oben genannten Therapien mehr Aussicht auf Erfolg hat, bleibt oft nur mehr die Möglichkeit der permanenten Extraktion (33). Neben großzügigen Weichteildebridement und einer Lavage wird das Implantat entfernt und kein weiteres mehr eingesetzt. Ziel ist es, eine Schmerzfreiheit der Patientin bzw. des Patienten zu erreichen und so viel Narbengewebe wie möglich zu generieren, um eine gewisse Stabilität zu erreichen. Jedoch wird die Schmerzfreiheit nicht immer erreicht. Der Patient kann ohne Hilfsmittel nicht mehr gehen und es kommt zu einer Verkürzung des operierten Beines.

Um den Verlust der Weichteilintegrität und der Knochensubstanz entgegenzuwirken, besteht die Möglichkeit, das Gelenk mittels einer Arthrodesen (an der Wirbelsäule Spondylodese genannt) zu versteifen (34). Die Bewegungen im Gelenk werden damit komplett unterbunden. Dies trägt dazu bei, eine fehlende muskuläre Stabilisierung zu kompensieren. Neben einer intraartikulären Versteifung besteht auch die Möglichkeit der Fixation mittels äußeren Spanner (Fixateur externe) (35).

Sollten selbst diese Methoden keine Eindämmung der Infektion bringen bleibt als letzter möglicher Ausweg noch die Amputation der betroffenen Extremität.

1.6 Prophylaxe von postoperativen Infektionen

Implantat-assoziierte Infektionen führen bei den Patientinnen und Patienten zu einer Verschlechterung der Lebensqualität, angefangen beim längeren Klinikaufenthalt, über Revisionseingriffe bis hin zum totalen Funktionsverlust und Immobilität. Auch für die Chirurgen bzw. den Chirurgen bedeutet eine Infektion des Implantats Mehraufwand und schließlich auch höhere Kosten für das Gesundheitssystem. Die Kosten für Implantat-assoziierte Infektionen betragen in

den USA 150 bis 200 Millionen US-Dollar im Jahr (36). Aufgrund der therapeutischen Schwierigkeiten bei Implantat-assoziierten Infektionen besteht also ein großes Bestreben so viele Infektionen wie möglich zu verhindern.

Steriles Arbeiten im Operationssaal hat eine ganz entscheidende Bedeutung, da ein Großteil der Kontaminationen durch das Operationsteam und die Patientin bzw. den Patienten selbst ausgelöst wird. Dennoch werden mehr als 85 % aller Infekte perioperativ gesetzt (37). Mit der in den letzten Jahren für Operationssäle eingeführten Laminar Airflow Technologie versucht man die Kontamination über den Luftweg zu beeinflussen. Trotz dieser eingesetzten Technik zeigt eine Studie aus Schweden (Andersson et al., 2012) dass beispielsweise Bewegung und Anzahl von Personal im Operationssaal einen nachweisbaren Einfluss auf die koloniebildenden Bakterien-Einheiten (KBE) pro Kubikmeter OP Luft haben (38). Eine in der Literatur sehr gut beschriebene als Goldstandard geltende Möglichkeit zur Senkung der Infektionsgefahr ist der Einsatz von antibiotikahaltiger PMMA-Zemente (39) wie Palacos R+G. Diese werden schon seit vielen Jahren bereits im Primäreingriff unter anderem als lokale Wirkstoffträger verwendet (28). In der zementfreien Endoprothetik ist ein solcher lokaler anti-infektiver Schutz derzeit nicht möglich. Die antiinfektive Ausrüstung von Prothesen mit Antibiotika-Beschichtungen steht noch am Anfang der Entwicklung.

1.6.1 Systemische Verwendung von Antibiotika

In 95% der Operationen wird eine systemische Antibiotikatherapie durchgeführt (3). Die am häufigsten verwendeten Antibiotikaklassen sind β -Laktam-Antibiotika (Cephalothin, Cefuroxim, Dicloxacillin, Cloxacillin). Die prä- und postoperative systemische Gabe von Antibiotika reduziert das Risiko einer postoperativen Infektion deutlich (40). Jedoch ist durch die schlechte Vaskularisierung der Knochenregion die Wirkung von oral oder intravenös verabreichten Antibiotika lokal erheblich eingeschränkt.

Gentamicin wird nur in seltenen Fällen zur systemischen Prophylaxe verwendet. Es handelt sich dabei um ein Breitbandantibiotikum, das nur bei spezieller Indikation systemisch verabreicht wird. Außerdem kann eine längerfristige systemische Gabe von Gentamicin zu schweren Nebenwirkungen wie Nephro-

und Ototoxizität führen (41). Bei einer lokalen Gabe von Gentamicin treten diese Nebenwirkungen deshalb nicht auf, weil der systemische Spiegel extrem niedrig ist, während lokal hohe Wirkspiegel nachgewiesen sind (42).

1.6.2 Knochenzemente mit Antibiotika

PMMA-Knochenzemente werden hauptsächlich in der orthopädischen Chirurgie zur Verankerung von Prothesen verwendet. Sowohl bei der primären Prothesenverankerung als auch bei der Revisionsendoprothetik werden Knochenzemente mit antiinfektiver Beimischung verwendet. Zum ersten Mal wurden im Jahr 1970 von Buchholz und Engelbrecht Antibiotika Knochenzementen beigemischt, um das Infektionsrisiko zu senken (28). Es konnte gezeigt werden, dass die Zahl der Revisionen aufgrund von Infektionen bei antibiotikafreien Zementimplantaten signifikant höher war als bei jenen zementhaltigen Implantaten mit antiinfektiver Beimischung (43). Der Vorteil gegenüber einer systemischen Antibiotikatherapie ist die hohe Lokaldosis im Wundexsudat (44) und geringe systemische Dosis des Antibiotikums, die im Urin oder Serumkonzentration nachgewiesen werden kann (45). Daraus folgt ein geringeres Infektionsrisiko als ohne antibiotikahaltigen Zement. Dazu kommt, dass keine unerwünschten Systemwirkungen des Antibiotikums auftreten (44). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass antibiotisch angereicherte PMMA-Zemente eine niedrigere Rate an Adhärenz von Bakterien aufweisen als solche ohne Antibiotika (46). Gentamicin gilt hierbei als Antibiotikum der Wahl, einerseits wegen seines hervorragenden Spektrums und andererseits wegen seiner lokal begrenzten Wirkung, wobei die bekannten Komplikationen einer systemischen Applikation bei der lokalen Gabe nahezu unbekannt sind.

1.7 Antiinfektive Beschichtungen

Das Bestreben, Implantate antiinfektiv auszurüsten, ist groß. Bisher existiert im CE-Raum ein mit Polylaktid beschichteter Marknagel, in der Gentamicinsulfat (GS) eingebracht ist. Das Antibiotikum wird mit der Degradation der Polymilchsäure freigesetzt. Für zementfreie orthopädische Endoprothesen gibt es derzeit keine

zugelassene Beschichtungsalternative. Der technische Unterschied zum PMMA Zement ist der, dass zementfreie Prothesen zwar von Keimen leicht besiedelt werden können, aber die Prothese die Keime nicht aktiv abwehren kann. Die Prothese selbst müsste als Träger geeigneter Wirkstoffe dienen. Bisher ist aber kein Medium in Marktreife. Die einzige zielführende Möglichkeit ist, dass das Implantat selbst als Trägermedium für diverse Wirkstoffe fungiert.

Zementfreie Implantate bieten von sich aus keinen Schutz vor Adhäsion von Bakterien und in Folge der Bildung eines Biofilms. Nur mit einer antiinfektiven Beschichtung, die lokal kontinuierlich Antibiotika freisetzt, könnte die Adhärenzfähigkeit der Mikroorganismen herabgesetzt werden und die Bakterien eliminieren. Die lokale Freisetzung von Antibiotika hat – wie vom PMMA Zement in vergleichbarer Indikation bekannt – den großen Vorteil, dort hohe Wirkstoffspiegel zu produzieren, wo sie benötigt werden, also in unmittelbarer Implantatnähe.

Man erwartet sich von einer solchen Beschichtung eine kontinuierliche Freisetzung des Antibiotikums mit einer hohen Initialfreisetzung für die ersten Stunden, gefolgt von einer Freisetzung geringerer Mengen über mehrere Tage oder gar Wochen (47).

Eine solche Technologie wäre bei zementfreien Wechseloperationen hoch interessant und könnte bei entsprechenden Patientengut zur Senkung des Infektionsrisikos beitragen.

1.7.1 Gentamycinpalmitat (GP)

Die Wirkstoffe zur Beschichtung eines metallischen Implantats müssen einige Kriterien erfüllen. Dazu zählen sowohl physikalisch-chemische als auch biologische:

- Die Beschichtung sollte eine Biofilmbildung perioperativ und Stunden bis Tage postoperativ verhindern
- Die Beschichtung sollte an der Implantatoberfläche haften
- Die Beschichtung sollte hydrophob sein
- Die Beschichtung sollte insbesondere in den ersten Minuten bis Stunden nach Implantation von der Implantatoberfläche abgelöst werden, damit die Osteoneogenese bzw. die Osseointegration nicht negativ beeinflusst wird

- Die Beschichtung sollte lokal zu einem nachweislich hohen Wirkspiegel führen
- Das beschichtete Implantat sollte sterilisierbar sein (z.B.: Gamma-Strahlung) und die Beschichtung sollte sich in geeigneten Dosierungen pro Zeiteinheit von der Implantatoberfläche lösen.
- Die Beschichtung sollte keine körperfremden Trägerstoffe enthalten: Antibiotika sollten mit körpereigenen Fettsäuren wie z.B. mit Palmitinsäure (als Träger) mischbar sein.
- Biologisch gesehen sollte das Antibiotikum für eine Primärimplantation ein breites Wirkspektrum an potentiellen Erregern abdecken, z.B. Gentamicin.
- Verwendete Antibiotika sollten keine hohe Resistenzentwicklungsrate aufweisen

Das in dieser Studie verwendete Gentamicinpalmitat erfüllt nahezu alle die hier angeführten Kriterien.

Da die meisten Antibiotika wasserlöslich sind und sie alleine nicht an der Oberfläche haften bleiben würden, benötigt man ein Trägermedium, das geeignet ist, um das Antibiotikum an der Oberfläche einer metallischen Prothese haftend zu machen. Eine beschriebene Idee ist die Verbindung aus Antibiotikum mit einer langkettigen Fettsäure wie Palmitinsäure. Gentamicinsulfat kann beispielsweise relativ einfach durch einen reziproken Salzaustausch in Gentamicinpalmitat umgewandelt werden (47). Im Gegensatz zum hydrophilen Gentamicinsulfat zeichnet sich das GP durch eine hydrophobe Löslichkeit aus. Eine Beschichtung mit Gentamicinpalmitat reduziert temporär die Adhäsion von Proteinen (48). Die Beschichtung verändert temporär die Oberfläche des Implantats, erschwert die Ansiedelung von Bakterien (49) und verhindert erfolgreich die Entstehung eines Biofilms perioperativ.

1.7.2 Alternative Implantatmodifikationen

Neben einer Reihe von Beschichtungen mit unterschiedlichsten Antibiotika gibt es auch alternative Oberflächenmodifikationen. Eine dieser möglichen Varianten ist es, mittels einer selektiven Haftung von antimikrobiellen Peptiden eine bakterielle

Adhäsion zu verhindern, jedoch die Osseointegration dabei nicht zu beeinträchtigen (50,51). Dafür können verschiedene Trägersubstanzen wie zum Beispiel Phospholipide verwendet werden (52).

Auch bei Oberflächen, die mit Selen beschichtet wurden, konnte eine antibakterielle Aktivität festgestellt werden. Es wurde auch kein inhibitorischer Einfluss auf das Osteoblasten-Wachstum detektiert (53).

Eine Implantatbeschichtung mit PVP Jod erwies sich ebenso als eine effektive Präventionsmaßnahme gegen bakterielle Adhäsion auf Titanoberflächen, ohne dabei den Jodhaushalt des Körpers beziehungsweise den Schilddrüsenhormonspiegel negativ zu beeinflussen (54). Bei beiden Wirkstoffen wurden keine zytotoxischen Nebenwirkungen beobachtet.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das Titan selbst zu modifizieren. In einer Studie von Cheng et al. wurden kontrollierte Mengen Silber-Nanopartikel in das Titanoxid oder Titan des Implantats eingearbeitet. Hier zeigte sich eine starke und langanhaltende antibakterielle Aktivität gegen die Testbakterien (55).

1.7.3 Unterschiede einer GP-Beschichtung gegenüber gentamicinhaltigen Knochenzement

Gentamicinhaltige PMMA Zemente eluieren eine gewünschte hohe Konzentration an Antibiotika je nach Dosierung. Dasselbe passiert bei zementfreien beschichteten Implantaten, die GP oberflächlich tragen (56). Im Gegensatz zu den PMMA-Zementen, bei denen lediglich nur geringe Wirkstoffmengen aus den äußeren Schichten der Zementmatrix freigesetzt werden, ist bei den mit Gentamicinpalmitat beschichteten Implantaten die Ablösung der gesamten Wirkstoffmengen der Beschichtung nach ca. 2 Wochen beendet. PMMA-Zemente können noch Jahre nach Implantation geringe Konzentrationen an Gentamicinsulfat abgeben, was als ein mögliches postoperatives Risiko einer Resistenzentwicklung endogener Bakterien sein könnte (57). Die zementfreien beschichteten Implantate decken durch ihre schnelle Freisetzung genau den Zeitabschnitt der höchsten Infektionsgefahr ab. Nach wenigen Tagen ist das ursprünglich beschichtete Implantat „unbeschichtet“. Die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklungen ist daher eher reduziert.

Beschichtete zementfreie Implantate, bei denen der Wirkstoff selbst der Träger ist, enthalten keine nicht resorbierbaren Materialien und sind daher auch kein Angriffspunkt für eine sekundäre Biofilmformation. Die Palmitinsäure als Bestandteil der GP-Beschichtung wird vom Körper durch β -Oxidation verstoffwechselt.

1.7.4 Mögliche Probleme

Die Beschichtung mit Gentamicinpalmitat hat eine geringe und temporäre Veränderung der Oberflächenrauigkeit zur Folge. Die Titanoberflächen von orthopädischen Implantaten zeichnen sich dadurch aus, dass die Osteoblasten des umliegenden Gewebes sehr gut an ihrer Oberfläche anhaften können (58,59). Die über dem Titan liegende Schicht aus Palmitinsäure könnte die primäre Besiedelung der Osteoblasten stören und somit eine Verlangsamung des Einwachsens des Implantats in den Knochen zur Folge haben. Dies wiederum würde das Risiko einer aseptischen Prothesenlockerung erhöhen.

Zusätzlich besteht die Gefahr, dass es durch den Einsatz von Antibiotika zu Überempfindlichkeitsreaktionen des Körpers kommt. Jedoch ist das Allergenpotential von Gentamicin viel geringer als jenes vieler β -Lactam-Antibiotika (60).

Außerdem können Aminoglykosid-Antibiotika eine Schädigung der Niere, des Gehör- und des Gleichgewichtsorganes verursachen (41). Die Studien zur Freisetzung von Gentamicin aus Knochenzement zeigen jedoch, dass die lokale Wirkung hoch und die systemischen Spiegel in so geringen Mengen vorhanden sind, dass es kaum zu unerwünschten Wirkungen kommt.

1.8 Fragestellung – Ziel der Studie

Ziel dieser Studie ist es, einerseits die Freisetzung von Gentamicinpalmitat (GP) innerhalb der ersten 24 Stunden in Hemmhoftestungen zu bestimmen. Des Weiteren soll die Wirksamkeit von Gentamicinpalmitat gegenüber gram+ und gram- Bakterien im Vergleich zu Gentamicinsulfat (GS) (Merck, Austria) vergleichend dargestellt werden.

Die Absterbekinetik mit *S.aureus* und *E.coli* soll ebenfalls im Vergleich zu Getamicinsulfat (Merck, Austria) untersucht werden. Außerdem wird versucht, die absolute Menge an GP-Wirkstoff aus der Beschichtung über eine mit GS hergestellte Eichgerade zu bestimmen.

Methodisch soll zudem geprüft werden, ob die Temperatur des Mediums für die Freisetzungsergebnisse eine Rolle spielt und damit die Körpertemperatur einen Einfluss auf das Elutionsverhalten hat. Weiterhin sollten Versuche durchgeführt werden, ob nahezu drei Jahre gelagerte (RT, 23°C) beschichtete Implantate noch wirksam sind: Zudem sollten Tests durchgeführt werden, die mit GP beschichteten Implantate zusätzlich mit einer Vancomycinbeschichtung zu versehen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Lösungen und Puffer

- **Pufferlösung Dulbecco 10xPBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺** (Biochrom AG, Austria)
- **Physiologischer Kochsalzlösung** (0,85% NaCl-Lösung)
- **Gentamicinsulfatlösung** >590 I.U./mg (1mg/ml in Aqua dest.) (Carl Roth GmbH + Co KG, Germany)

2.2 Nährmedien

- **Mueller-Hinton-Agar** (MH, Nährbodenküche Hygiene Graz): wird zur Empfindlichkeitsprüfung gegen Antibiotika mit dem Agardiffusionsverfahren verwendet und eignet sich zur Anzucht von anspruchslosen Bakterien. Durch den niedrigen Gehalt an Thymin-Thymidin wird die Hemmstoff-Bestimmung verbessert.

Zusammensetzung	Gram/Liter
• Rindfleischhydrolysat	4,0
• Caseinhydrolysat	1,5
• Stärke	17,5
• Agar	15,0

Tabelle 1: Zusammensetzung des verwendeten MH-Agar, Nährbodenküche Hygiene Graz

- **Blutagar** (Nährbodenküche Hygiene Graz): ist ein nährstoffreiches Mehrzweckmedium zur Isolierung und Anzucht von anspruchslosen und anspruchsvollen Mikroorganismen. Der Blutagar ermöglicht die Beurteilung der hämolysierenden Eigenschaften der kultivierten Bakterien. Außerdem lassen sich Kontaminationen durch andere Bakterien leicht feststellen.

Zusammensetzung	Gram/Liter
• Rindfleischhydrolysat	12,0
• Pepton aus Fleisch	10,0
• Natriumchlorid	5,0
• Agar	15,0
• Caseinhydrolysat	5,0
• Hefeextrakt	3,0
• Maisstärke	1,0
• Defibriniertes Schafblut	5%

Tabelle 2: Zusammensetzung des verwendeten Blutagar, Nährbodenküche Hygiene Graz

- **MUELLER-HINTON-Bouillon (MHB):**

Zusammensetzung	Gram/Liter
• Rindfleischhydrolysat	2,0
• Caseinhydrolysat	1,5
• Stärke	17,5

Tabelle 3: Zusammensetzung des verwendeten MHB, Nährbodenküche Hygiene Graz

2.3 Sonstige Substanzen

- **Palmitinsäure** (Heraeus Medical GmbH, Germany)

2.4 Teststämme:

- ***Staphylokokkus aureus*** subsp. ***aureus*** Rosenbach 1884 (DSMZ 799, ATCC 6538) ist aus humanen Wunden isoliert. Es ist ein definierter grampositiver Stamm, der geeignet ist für die Bestimmung von Antibiotika, Desinfektionsmittel sowie für Konservierungstests und Sterilitätstests nach Pharm. Eur. Außerdem ist er ein Kontrollstamm zur Prüfung von Kulturmedien nach DIN 58959-9.

- ***Escherichia coli*** (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 (DSMZ 1576, ATCC 8739) ist aus Fäkalien isoliert. Es handelt sich um einen gramnegativen Qualitätskontrollstamm nach DIN 58959-9 und Pharm. Eur.

Beide Stämme gelten als Gentamicin-sensible Stämme und spielen eine wichtige Rolle bei der Infektion von Wunden. Sie decken sowohl das Spektrum der grampositiven als auch das der gramnegativen Bakterien ab.

2.5 Verwendete Beschichtungen

In der Studie wurden 2,5cm lange, Gamma-bestrahlte, sterile Kirschnerdrähte der Firma Peter Brehm verwendet, die vor der Sterilisation durch ein Verfahren mit Gentamicinpalmitat der Firma Heraeus Medical GmbH beschichtet wurden. Kirschnerdrähte sind Drähte aus Titan oder Edelstahl von circa 3mm Dicke, die zur Osteosynthese verwendet werden. Sie sind besonders gut dafür geeignet, einzelne Knochenfragmente miteinander zu fixieren. Für die Versuchsreihen standen insgesamt 74 Drähte zur Verfügung. 17 Drähte wurden für die gesamte Studie verwendet.

Die beschichteten Kirschnerdrähte wurden nach Sterilisation im Jahr 2010 in einem Tierversuch an der Philipps-Universität in Marburg eingesetzt. (Roessler et al., Manuskript in Vorbereitung).

2.6 Beschichtungsverfahren

Alle Drähte wurden in einem Bedampfungsverfahren von der Firma Peter Brehm GmbH (Weisendorf, Deutschland) hergestellt und für die Untersuchungen beigestellt. Das Gentamicinpalmitat wurde durch reziproken Salzaustausch als Lösung in Methanol hergestellt (61). Methanolisches Gentamicinpalmitat wurde dann mithilfe einer Druckluftsprühpistole auf die Kirschnerdrähte aufgebracht, die vorher auf ca. 120°C erhitzt wurden. Alle Beschichtungsversuche wurden von der Firma Hemoteq AG (Aachen, Deutschland) durchgeführt. Beim Besprühen der Kirschnerdrähte verdampfte das

Methanol an der erhitzten Oberfläche. Das Gentamicinpalmitat bildete sich als eine dünne, gleichmäßige Schicht auf den Drähten aus. Die Masse der Beschichtung betrug $1000\mu\text{g}$ ($\pm 5\%$) Gentamicinpalmitat.

2.6.1 Ergebnisse

Auf den Abbildungen 3 bis 5 sind Kirschnerdrähte vor und nach dem Beschichtungsverfahren dargestellt. Am unbeschichteten Kirschnerdraht erkennt man die Rauigkeit und Struktur der Titanoberfläche, die ein wichtiger Faktor für die Osseointegration ist. Die Osteoblasten benötigen die raue Oberfläche des Titans um darauf besser zu haften. In Abbildung 4 wird ein beschichteter Draht mit GP dargestellt. Die Oberflächenrauigkeit ist zum Teil aufgehoben. Dies wird durch die Abbildung 5, die die Aufnahme eines Rasterelektronenmikroskops (REM) zeigt, verdeutlicht.

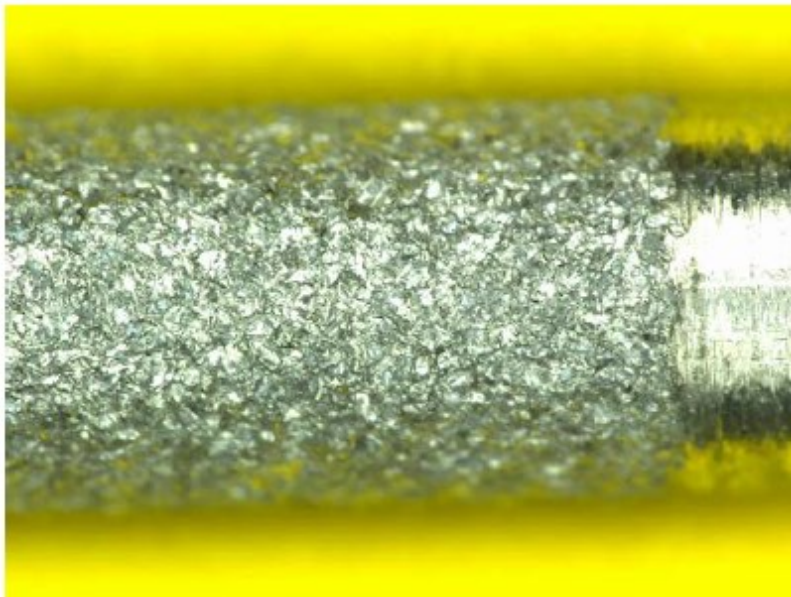


Abbildung 3: Unbeschichteter Kirschnerdraht (Heraeus Medical GmbH, Hemoteq AG)

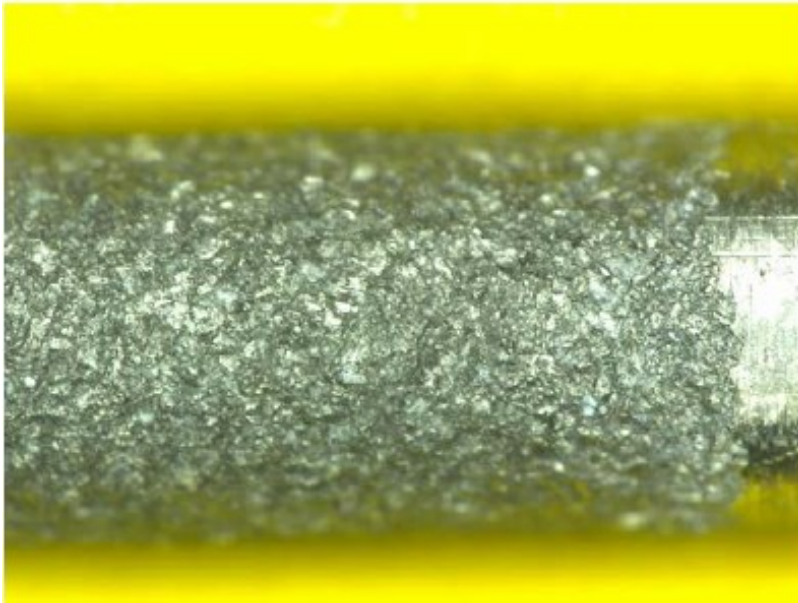
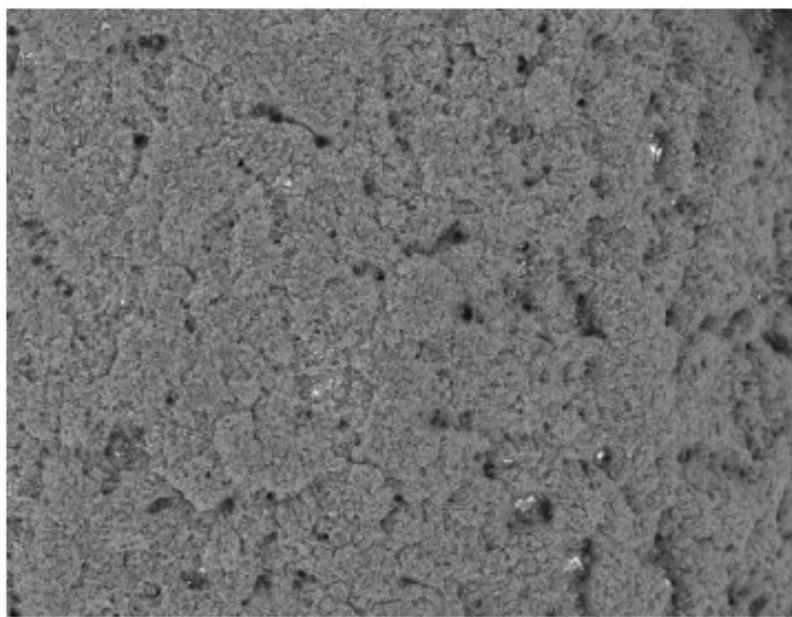


Abbildung 4: Beschichteter Kirschnerdraht (Heraeus Medical GmbH, Hemoteq AG)



Kirschner0005 2010.10.14 L D3.1 x250 300 um

Abbildung 5: Beschichteter Kirschnerdraht im REM (250-fache Vergrößerung, Heraeus Medical GmbH, Hemoteq AG)

2.7 Elutionsexperiment

Als Pufferlösung wurde Dulbecco 10xPBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Biochrom AG, Austria) verwendet. Zudem wurde eine 1xfache Pufferlösung hergestellt. Dazu wurden 1 Volumsanteil Puffer mit 9 Volumsanteil sterilem Wasser vermischt.

Anschließend wurden 10ml des PBS-Puffers in ein Reaktionsgefäß (Greiner, Bioone Austria) pipettiert. Die ersten beiden Elutionsversuche fanden bei Raumtemperatur (23°C) statt, weshalb auch die Puffer zuerst bei Raumtemperatur belassen wurden. Weitere Elutionen erfolgten in einem Brutschrank bei 37°C. Die Kirschnerdrähte wurden in die vorgewärmte Pufferlösung gegeben und während der gesamten Versuchszeit bei 37°C bzw. bei Raumtemperatur belassen (Brutschrank).

In festgelegten Zeitabständen wurden jeweils 200 Mikroliter (μl) mit einer Pipette (Eppendorf) in vorbeschriftete Mikroreaktionsgefäße (Eppendorf) gegeben. Die Zeitpunkte der Pipettierung waren 0 Minuten (min) (vor dem Kontakt des beschichteten Kirschnerdrahtes), 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 Stunde (h), 2 h, 3 h, 4 h und 24 h. Sämtliche Eluate wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Vor und nach den jeweiligen Elutionsverfahren wurden alle Kirschnerdrähte mit einer Feinanalysewaage (Cubis Sartorius, Austria) gewogen, um die Masse an antiinfektiver Beschichtung zu erheben. Dabei wurden die Drähte zuerst an der Luft getrocknet und dann für 24 Stunden in Methanol (Merck, Austria) eingelegt. Nach dem Abgießen und Abdampfen des Methanols wurden die Drähte erneut gewogen.

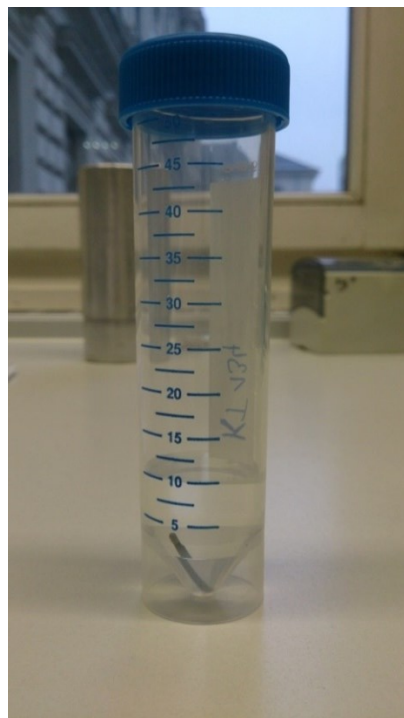


Abbildung 6: Elutionsversuch mit einem Kirschnerdraht im PBS-Puffer

2.8 Inokulation

Die verwendeten Bakterienstämme wurden für die Versuche jeweils frisch aufgetaut, auf Blutagar überimpft und für 24h bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Vor der Verwendung wurden die Agar Platten auf Reinheit und Kontamination überprüft.

2.9 Elutionstestung

Um die freigesetzte Menge an Antibiotikum zu testen, wurde ein Agardiffusionstest durchgeführt (in Anlehnung an EUCAST). Dabei werden die Testbakterien mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,85%NaCl) photometrisch auf 0,5 McFarland (McF, DensiCHEK, Biomerieux Austria) eingestellt.

Die Suspension wurde dann mittels eines Drehtisches (Retro C80 Platten Inoculator) auf Müller-Hinton-Agar Platten (MH, Nährbodenküche Hygiene Graz) ausplattiert. Aus dem Zentrum der Agarplatten wurde daraufhin mit einer Pasteur-Pipette Löcher mit 6mm Durchmesser gestanzt. In das gestanzte Loch jeder Agarplatte wurden 50µl des zu testenden Antibiotikaeluats hinein pipettiert.

Die ausplattierten, ausgestanzten Agarschalen mit den Eluaten wurden dann bei 37°C für eine Inkubationszeit 24 Stunden im Brutschrank belassen.

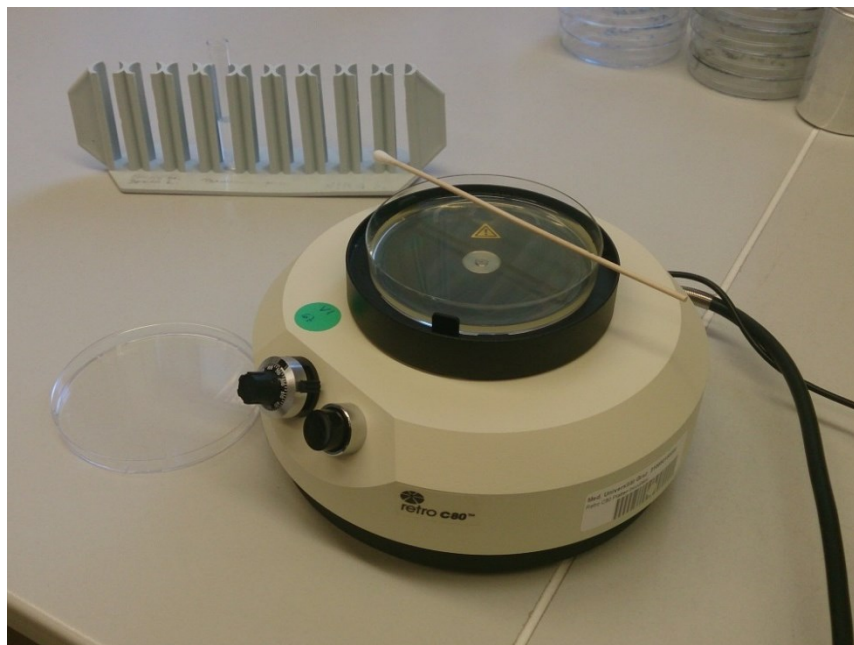


Abbildung 7: Rotator zum Ausplattieren von *S.aureus* Suspension auf Müller-Hinton-Platten

2.10 Eichreihe

Um einen Referenzwert an freigewordenen Gentamicin zu erhalten, erfolgte die Herstellung einer Eichreihe mit Gentamicinsulfat. Dazu wurde ebenfalls eine Bakteriensuspension mit *Staphylococcus aureus* (DSMZ 799) sowie mit *Escherichia coli* (DSMZ 1576) auf Müller-Hinton-Agar ausgestrichen und in der Mitte ein Loch gestanzt. Die verwendeten Konzentrationen waren 0,1-1,0 mg/ml. In 0,1 Schritten aufwärts.

2.10.1 Messung

Nach der Inkubationszeit wurden die durch das Gentamicin erzeugten Hemmhöfe ausgewertet. Mittels Lineal wurde pro Platte zweimal der Durchmesser des Hemmhofes jeweils im 90° Winkel zueinander gemessen und daraus der Mittelwert bestimmt. Die Angabe erfolgte in Millimeter (mm).

2.10.2 Bestimmung der Absolutmenge an Gentamycin

Durch die Erstellung einer Eichgerade aus einer Reihe mit bekannten Gentamicin Konzentrationen lassen sich vom Durchmesser der Hemmhöfe auf unbekannte Konzentrationen des Antibiotikums zurückrechnen. Gemäß der Formel $y = k * x + d$ kann man bei vorhandenem Durchmesser auf der y-Achse die dazugehörige Konzentration auf der x-Achse bestimmen (Die Formel ist aus Abb. 8 zu entnehmen). Ausgehend davon, dass die Beschichtung in 10ml PBS-Puffer gelöst wurde und für eine Hemmhofmessung 50µl Eluat verwendet werden, wird die Konzentration mit 200 multipliziert und kommt so auf die absolute Menge an Gentamicin aus der Beschichtung in Mikrogramm (µg).

2.11 Absterbekinetik

Aus einem Schrägagar mit Müller-Hinton-Medium wurde eine Stammsuspension mit 10^9 Bakterien pro ml hergestellt (KBE) und auf eine Ansatzlösung von 10^6 KBE mit MHB verdünnt. Danach wurde der Ansatz in 50ml Erlenmeyerkolben (Lactan

Austria) appliziert. Das Ansatzvolumen betrug 10ml. Insgesamt wurden jeweils 3 Ansätze für die Kirschnerdrähte und die Gentamicinsulfatlösung hergestellt.

Gleich nach dem Überimpfen wurde die erste Probe entnommen (t-1). Für jede Probenentnahme wurden 0,1ml aus dem Kolben pipettiert und auf MH-Agar gleichmäßig verteilt. Zur Regeneration der Bakterien werden die Kulturen nach dem Überimpfen für eine Stunde bei 36°C im Wasserbad bei 90 Rotationen pro Minute (rpm) inkubiert. Zusätzlich wurde eine Wachstumskontrolle angelegt.

Nach der Probenentnahme für die Startkeimzahl (t0) wurden die Kirschnerdrähte bzw. 500µl von einer Gentamicinsulfatlösung von 1mg/ml dazugegeben und gleich danach wieder eine Probe entnommen. Danach wurden die Proben weiter inkubiert.

Die Zeitpunkte für die weiteren Probenentnahmen waren nach 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 24 h.

Als Verdünnungsmedium zum Ausplattieren wurde MHB verwendet. Für den Doppelansatz wurden jeweils 0.1 ml auf MH-Agar aufgetragen und bei 37°C inkubiert und anschließend die Kolonien gezählt. Verdünnungsreihen wurden angelegt, um die Bakterien am Agar auszählen zu können.

2.12 Datenanalyse

Alle Daten, Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte wurden mit Microsoft Excel errechnet und Graphen erstellt. Die Graphen wurden ebenso mit GraphPadPrism™ 5.01 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com erstellt.

2.13 Beschichtung mit Vancomycin in Palmitinsäure

Als Vorbereitung für eine zusätzliche Beschichtung der Kirschnerdrähte mit Vancomycin wurde Palmitinsäure in einem Becherglas mittels einer temperaturgeregelten Thermoplatte (Yellowline MSC basic C) erhitzt. Die Versuche wurden bei 70°C, 80°C und 90°C durchgeführt.

Die mit GP beschichteten Kirschnerdrähte wurden in den Vorversuchen mittels einer „Kerzenziehmethode“ in eine Palmitinsäurelösung gehalten und vorsichtig herausgezogen. Des Weiteren wäre in den Hauptversuchen geplant gewesen, Vancomycin in die Palmitinsäure hinzuzufügen, um die geplante zusätzliche antibiotische Beschichtung zu erhalten. In den Versuchen wurden die Drähte in den ersten Versuchen für wenige Sekunden in den darauffolgenden für 1 Minute in Palmitat belassen. Vor und nach dem Beschichtungsversuch wurden die Drähte mit einer Feinanalysewaage (Cubis Sartorius, Austria) gewogen.

3 Resultate

3.1 Eichreihe

In Abb. 8 sind die berechneten Antibiotikakonzentrationen im Vergleich mit der Eichreihe aus GS dargestellt. Dabei wird vom Durchmesser der Hemmhöfe auf die Konzentrationen des Antibiotikums geschlossen. Die beiden Eichgeraden weisen einen hohen Korrelationskoeffizienten (R^2) auf (*S.aureus* $R^2 = 0,85$; *E.coli* $R^2=0,91$) und geben einen sehr guten linearen Zusammenhang zwischen Hemmhofdurchmesser und Antibiotikakonzentration wieder.

3.1.1 Eichgerade *S.aureus*

Für *S.aureus* befinden sich die Hemmhofdurchmesser zwischen 4-13,5mm, was die Spannweite der Gentamicinkonzentrationen zwischen 0,1-1,0mg/ml angibt. Die ermittelten Werte zeigen einen linearen Zusammenhang.

In Tab. 4 wurden die Mittelwerte der Ergebnisse von *S.aureus* für 0,25h und 1h der Elutionstests eingesetzt. Dabei ergibt sich eine Konzentration von Gentamicin von 0,47mg/ml nach 0,25h und 0,80mg/ml nach 1h Elution.

3.1.2 Eichgerade *E.coli*

Bei der Eichgerade von *E.coli* befinden sich die Hemmhofdurchmesser zwischen 0-8,9mm bei GS-Konzentration von 0,1-1,0mg/ml. Die Konzentrationen von 0,1mg/ml und 0,2mg/ml an GS waren zu gering um einen Hemmhof bei *E.coli* zu erzeugen. Das GS zeigt in Hinsicht auf die Hemmhofdurchmesser bei *E.coli* eine geringere Wirkung als bei *S.aureus*. Der höhere Korrelationskoeffizient erlaubt ein genaueres Ablesen der Werte hinsichtlich der Elutionstestungen mit *E.coli*.

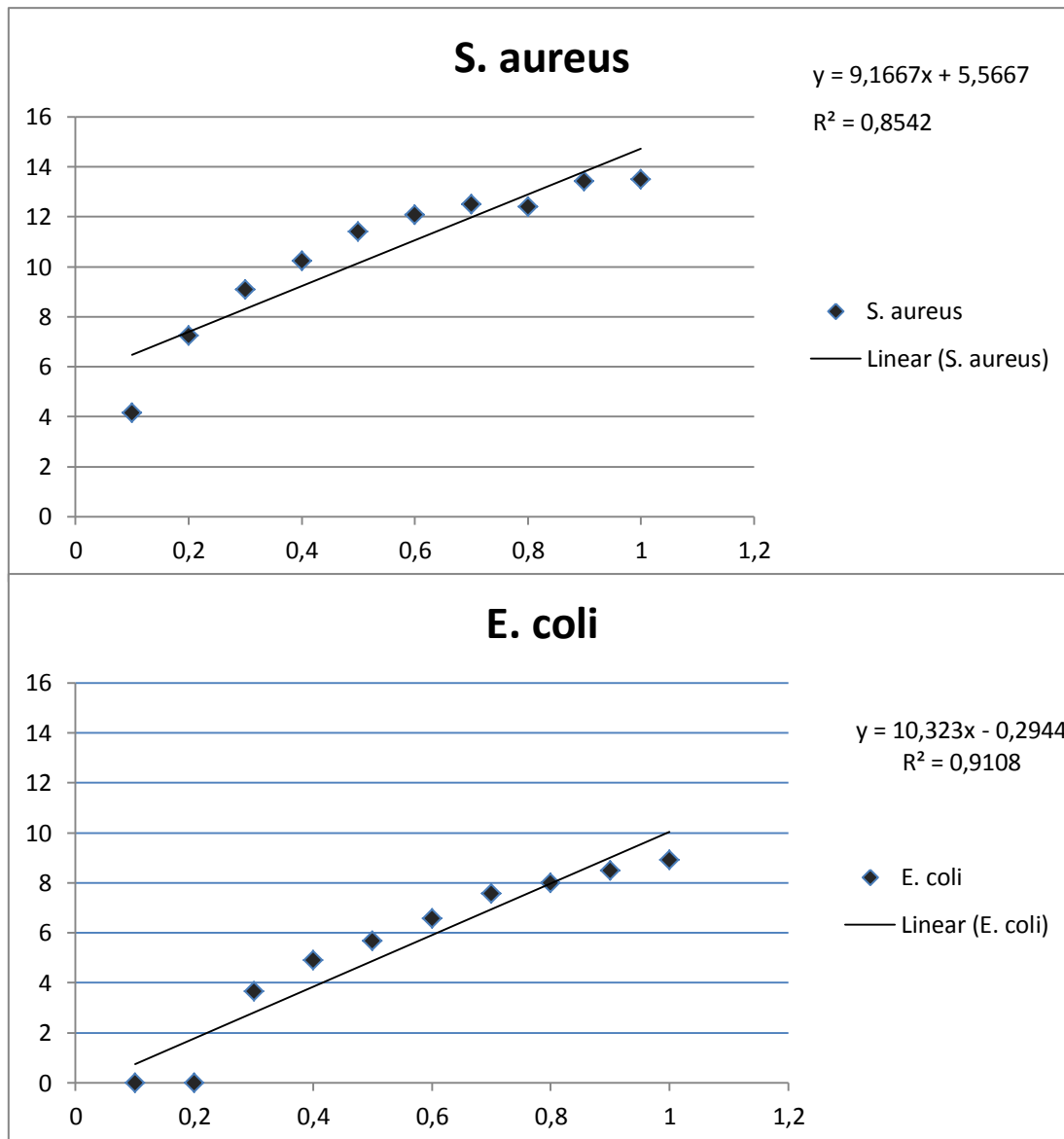


Abbildung 8: Eichgeraden der Teststämme: Darstellung der mittleren Hemmhofdurchmesser von *S.aureus* und *E.coli* auf der y-Achse. Die Genatmicinsulfat-Konzentrationen sind auf der x-Achse aufgetragen.

3.2 Bestimmung der Absolutmenge an Gentamicinbase (GB)

Mithilfe der Eichgerade konnten aufgrund der Hemmhofdurchmesser die Konzentrationen an Gentamicinbase aus Gentamicinpalmitat ermittelt werden, die von den Kirschnerdrähten eluiert wurden.

Wie in Abschnitt 2.10.2 erläutert, kann die Absolutmenge an Gentamicin aus der Konzentration errechnet werden. Tab.4 stellt zunächst die Hemmhofdurchmesser von 5 Eluaten mit *S.aureus* dar. Aus den Durchmessern wurde der Mittelwert

bestimmt und mittels der Eichgerade konnte die Konzentration an GB aus GP festgestellt werden. Zusätzlich stellt die Tab. 4 die errechneten absoluten Mengen von GB aus GP da, die nach 0,25h; 1h und 24h freigesetzt wurden.

Nach den ersten Minuten wird das Gentamicin schnell von den Kirschnerdrähten gelöst. Nach 15min sind durchschnittlich ca. 40,5% der 24h-Menge gelöst. Nach einer Stunde ist schon über 2/3 freigesetzt, wobei hier auf den 24h-Wert Bezug genommen wird und nicht auf die gesamte Beschichtung. Wie in Tabelle 4 ersichtlich wurde der 24h-Wert daher mit >95% angegeben. Es ist jedoch ein kontinuierlicher Anstieg der Konzentration bis zur letzten Eluatentnahme zu erkennen.

	0,25h	1h	24h
KT127 K1 [mm]	9,92	12,92	16,33
KT134 K2 [mm]	10,08	12,33	15,67
KT135 K3 [mm]	10,92	13,00	15,67
KT126 K4 [mm]	9,50	12,50	16,33
KT136 K5 [mm]	9,00	14,08	17,08
Mittelwert [mm]	9,88	12,97	16,22
Konzentration [mg/ml]	0,47	0,80	1,16
Absolutmenge Genta [µg]	94,18	161,45	232,36
Anteil 24 Stunden	40,50%	69%	>95%

Tabelle 4: Die Konzentrationen an Gentamicin errechnet aus den Mittelwerten der Hemmhöfe von *S.aureus* in mm nach 0,25h, 1h und 24h. Man sieht auf die Absolutmenge an Gentamicin in µg und den prozentuellen Anteil der Menge in Bezug auf den 24h-Wert, der mit >95% angegeben wird

3.3 Menge an freigesetzten Gentamicin aus GP

Die Tab. 5 zeigt die Gewichte (Massen) der beschichteten Kirschnerdrähte mit Beschichtung, diese nach Elution unter Lufttrocknung und solche nach Behandlung im Methanolbad. Durchschnittlich gehen in den ersten 24h im PBS-Puffer 0,55mg der Beschichtung in Lösung. Auch nach 24h Elution kann noch immer ein beträchtlicher Teil der Beschichtung am Kirschnerdraht nachgewiesen werden.

ID-Nr	Chargen-Nr	Freisetzung GP 24h[mg]	Gesamt GP [mg]	Anteil 24h [%]
R2	KT128	0,45	1,7	26,47
R3	KT129	0,15	1	15,00
K1	KT130	0,75	1,3	57,69
K2	KT134	0,6	1,15	52,17
K3	KT135	0,2	0,4	50,00
K4	KT126	0,65	1,4	46,43
K5	KT136	1,4	2,15	65,12
K6	KT146	0,6	0,9	66,67
K7	KT140	0,75	1,05	71,43
K8	KT081	0,4	1,15	34,78
K9	KT082	0,35	0,95	36,84
K10	KT083	0,35	0,75	46,67
Mittelwert		0,55	1,16	47,44

Tabelle 5: Gewichte der Kirschnerdrähte vor bzw. nach 24h Elution und nach weiteren 24h Methanolbad (zur Ermittlung der Gesamtmenge an GP auf den Kirschnerdrähten). Die unterste Zeile der Tabelle zeigt die Mittelwerte.



Abbildung 9: Die verwendeten Kirschnerdrähte mit GP-Beschichtung, nach Lufttrocknung nach der Elution im PBS-Puffer (bei der weißen Schicht handelt es sich um die Salzreste des Puffers), und nach der Elution in Methanolbad (v.l.n.r.)

3.4 Elutionstest

3.4.1 Elutionstest von GP-beschichteten Kirschnerdrähten mit *S.aureus*

Die Ergebnisse des Elutionstest mit *S.aureus* sind in Abb. 10 dargestellt (Darstellung der Hemmhofdurchmesser). In der ersten Stunde konnte eine schnelle Freisetzung des Antibiotikums beobachtet werden. Im Vergleich mit der Eichgerade konnte nach 5min eine GB-Konzentration von 0,21mg/ml ermittelt werden. Danach steigen die Hemmhofdurchmesser zwar kontinuierlich an, aber mit einer signifikant geringeren Geschwindigkeit. Auch nach 24 h ist noch ein erkennbar Anstieg der Wirksamkeit nachweisbar. Allerdings ist der beobachtete Anstieg geringer als in den ersten Stunden.

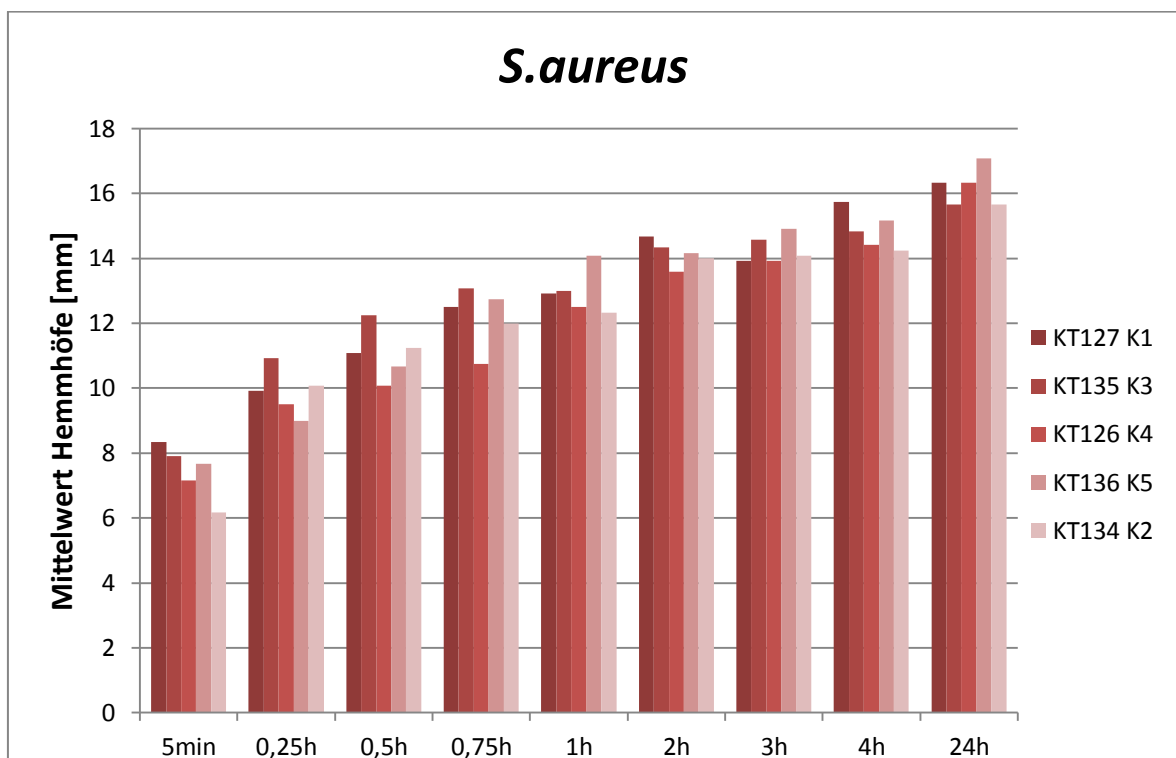


Abbildung 10: Hemmhöfe *S.aureus*. Die y-Achse zeigt die mittleren Hemmhofdurchmesser der Eluate von jeweils 3 Agarplatten. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte der Eluatentnahme dargestellt.

3.4.2 Vergleich zwischen Raumtemperatur und Körpertemperatur

In Abbildung 11 sind die Hemmhofdurchmesser von *S.aureus* bei Raumtemperatur und Körpertemperatur gegenübergestellt. Dabei wird deutlich, dass bei jeder Probenentnahme die Hemmhöfe bei 37°C größer sind als bei 23°C. Vor allem in den ersten 5 Minuten (in der Abb. als 0,083h bezeichnet) der Elution wird bei 39,2% mehr von der Beschichtung freigesetzt als bei Raumtemperatur. Nach einer Stunde liegt die Differenz immer noch bei 20,7% und nach 24 Stunden bei 10,4%.

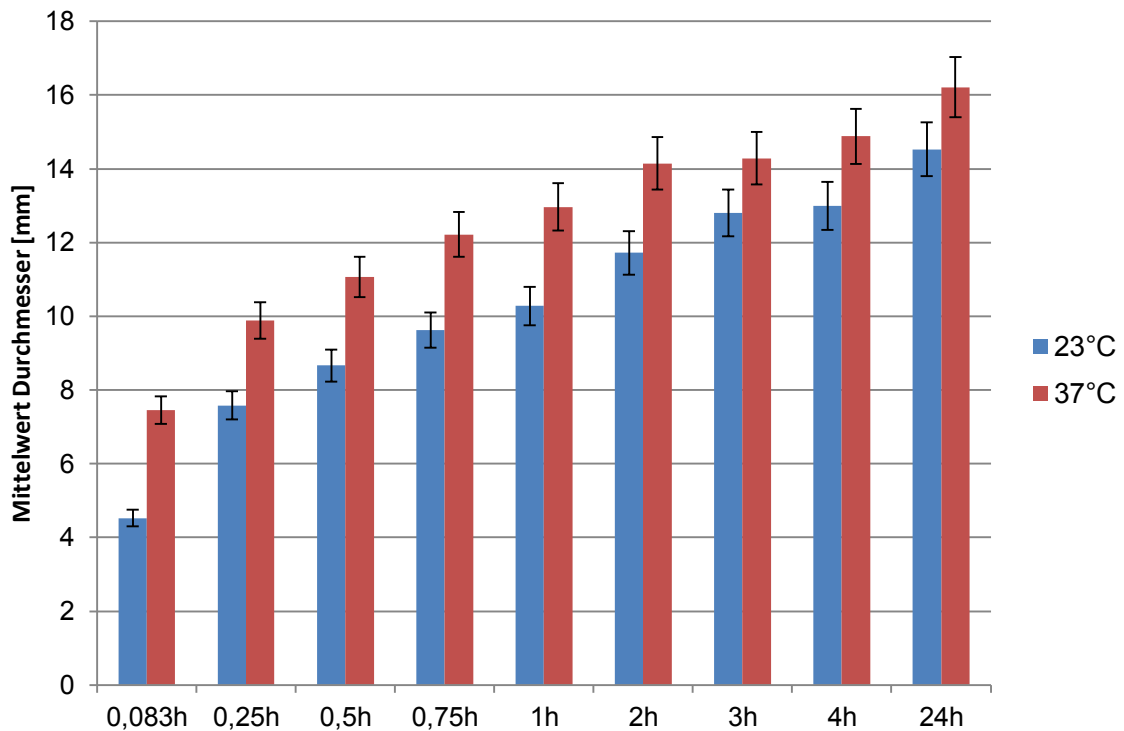


Abbildung 11: Temperaturdifferenz bei *S.aureus*. Die y-Achse zeigt die mittleren Hemmhofdurchmesser der Eluate bei Temperaturen von 23°C und 37°C bei Elution mit *S.aureus*. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte der Eluatentnahme dargestellt.

3.4.3 Elutionstest mit *E.coli*

Die Ergebnisse des Elutionstest mit *E.coli* sind in Abb. 12 dargestellt. Bei *E.coli* wurde in den ersten 5 Minuten zu wenig Antibiotikum freigesetzt um einen Hemmhof zu erzeugen. Es folgten weitere Hemmhofwerte, die kontinuierlich anstiegen. Der beobachtete Anstieg war deutlich langsamer als bei den gleichen Versuchen mit *S.aureus*.

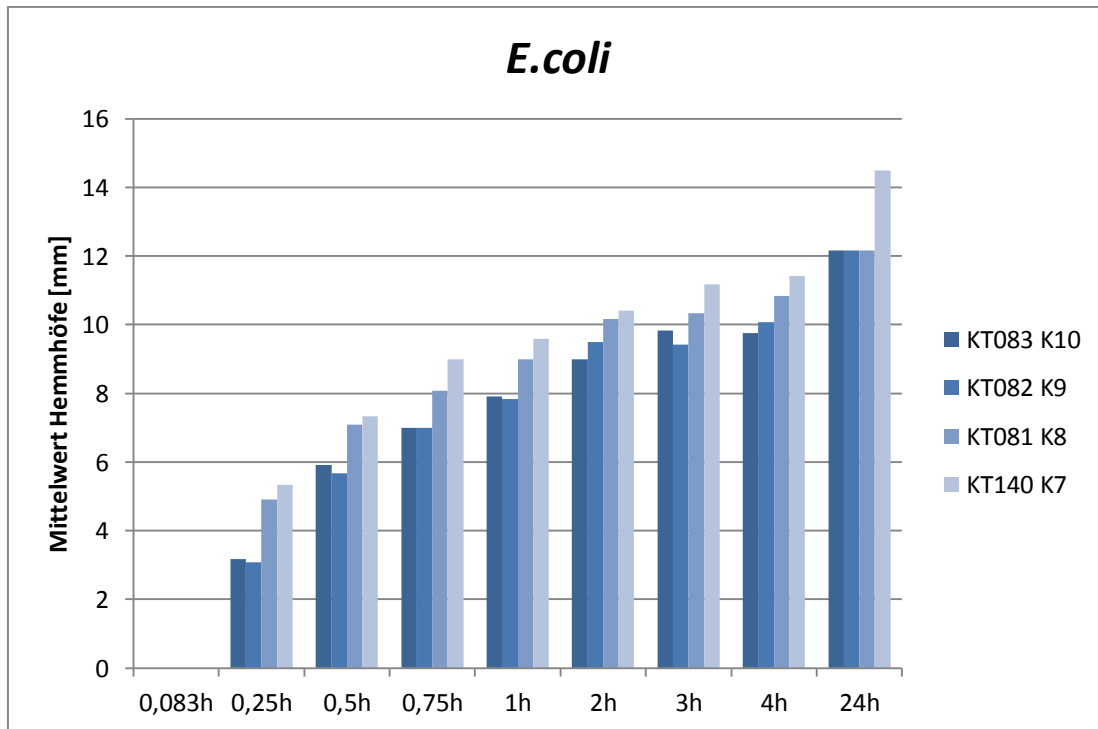


Abbildung 12: Hemmhöfe *E.coli*: Die y-Achse zeigt die mittleren Hemmhofdurchmesser der Eluate von jeweils 3 Agarplatten. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte der Eluatentnahme dargestellt.

3.5 Absterbekinetik von *Staphylococcus aureus*

Die Abb. 13 zeigt die Absterbekurve von *S.aureus* unter Einfluss von Gentamicinpalmitat aus den Kirschnerdrähten im Vergleich mit 500µl Gentamicinsulfatlösung.

Die Startkeimzahl beläuft sich rechnerisch auf 10^7 KBE. In der ersten Stunde nimmt die Keimzahl sowohl bei den Kirschnerdrähten als auch beim GS rapide ab. Nach circa 3 Stunden sind fast keine Bakterien in der Suspension am Leben.

Nach 4 Stunden liegt die Keimzahl bei beiden untersuchten Antibiotikasalze zwischen 10^1 und 10^2 KBE. Dieser KBE Wert bleibt auch nach 24 Stunden nahezu konstant.

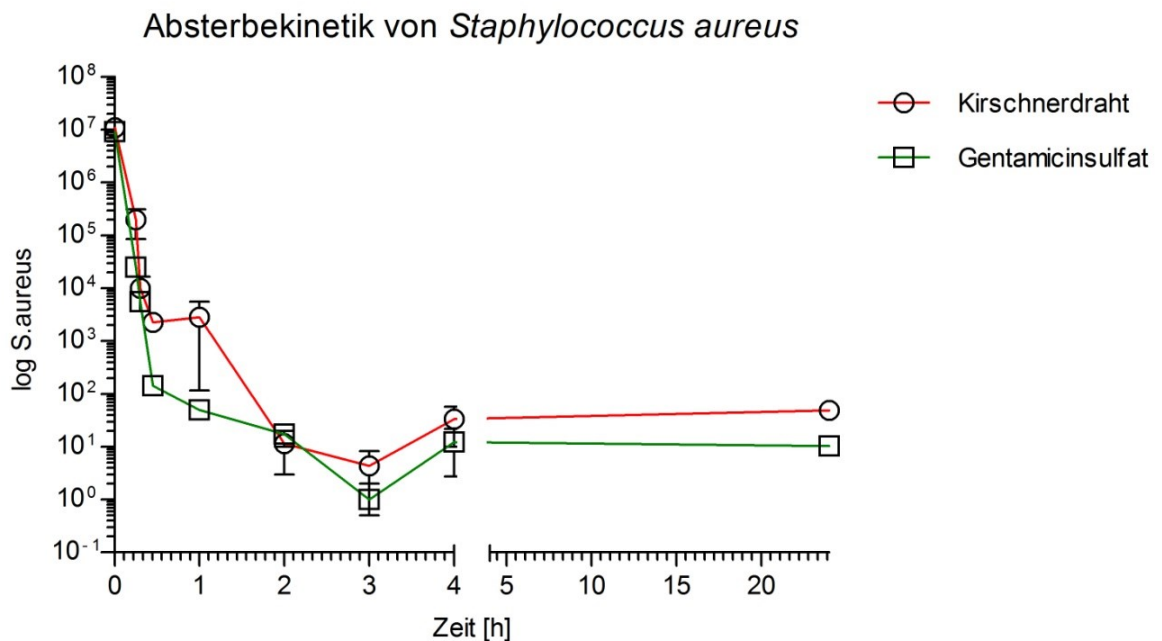


Abbildung 13: Absterbekinetik von *Staphylokokkus aureus* über 24h. Auf der y-Achse ist die mittlere KBE in log-Stufen angegeben. Auf der x-Achse sind die Entnahmezeitpunkte eingetragen.

3.6 Zusatzbeschichtung mit Vancomycinpalmitat (VP)

Die Gewichtsmassen der Beschichtungen sind aus Tab. 6 zu entnehmen. Die Vorversuche für die Beschichtung mit der Kerzenziehmethode, in der der Draht nur für eine Sekunde im Palmitat verbleibt, führt zu einer bis zu 14mal schwereren Masse der untersuchten Drähte. Drähte, die eine Minute im Palmitat belassen wurden, wiesen lediglich die Hälfte der Beschichtungsmasse auf. Bei einer Verweildauer von über 1min wurde auch ein Unterschied in der Temperatur deutlich. Bei 80°C und 1min Beschichtungsdauer ergibt sich ein mittleres Beschichtungsgewicht von 7,15mg. Bei 90°C und 1min Beschichtungsdauer betrug das mittlere Beschichtungsgewicht 3,1mg. Jedoch konnte bei den Versuchen mit 1min keine homogene Beschichtung hergestellt werden. Es

entstanden Brocken und ausgesparte Areale, eine gleichmäßige Beschichtung konnte nicht auf die Drähte aufgebracht werden.

Zusätzlich wurde bei den Vorversuchen beobachtet, dass sich die ursprüngliche Schicht aus GP, die auf den Kirschnerdrähten schon vorhanden war, von der Oberfläche zu lösen begann.

ID	Gewicht vorher [g]	Gewicht nachher [g]	Differenz [g]	Differenz [mg]
B1 70°C	0,29480	0,30570	0,01090	10,9
B2 70°C	0,31180	0,32580	0,01400	14
B3 80°C	0,30305	0,31660	0,01355	13,55
B4 80°C	0,29405	0,30450	0,01045	10,45
B5 90°C	0,28720	0,29760	0,01040	10,4
B6 90°C	0,28455	0,29220	0,00765	7,65
B7 80°C 1min	0,24035	0,24875	0,00840	8,4
B8 80°C 1min	0,25705	0,26295	0,00590	5,9
B9 90°C 1min	0,30075	0,30450	0,00375	3,75
B10 90°C 1min	0,30565	0,30815	0,00250	2,5

Tabelle 6: Gewichte der Eigenbeschichtungsversuche bei unterschiedlicher Temperatur und Verweildauer im flüssigen Palmitat



Abbildung 14: Kirschnerdraht nach dem Selbstbeschichtungsversuch. Man erkennt deutlich die dicke Schicht an Palmitat, welche die gesamte Oberfläche bedeckt.

4 Diskussion

4.1 Elution des GP

4.1.1 Diffusionstestung mit *S.aureus*

Beschichtungen mit GP führen zu einem Implantat, welches gut ausgerüstet ist, um einer Biofilmbildung auf deren Oberfläche entgegen zu wirken. Zudem erweist sich das von der Implantatoberfläche gelöste Gentamicin als ausreichend wirksam gegen gentamicinsensible Keime. Die Elutionstestungen bei *S.aureus* haben schon bei dem 5-Minuten-Eluat einen Hemmhofdurchmesser von ca. 7,5mm. Das entspricht einer Konzentration von 0,20mg/ml Gentamicin und bedeutet, dass schon eine gut nachweisbare Menge des Antibiotikums nach kürzester Zeit freigesetzt wird. Eine weitere Zunahme der Hemmhofdurchmesser des 24 Stunden-Eluats im Vergleich zum 4 Stunden-Eluat ist deutlich erkennbar. Dies zeigt, dass sich auch nach 24 Stunden immer noch eine ausreichende Menge an Gentamicinpalmitat auf der Oberfläche der Kirchnerdrähte befindet, um das Bakterienwachstum zu hemmen. Unter in-vivo Bedingungen wird das hydrophobe GP auch nach 24h noch auf der Implantatoberfläche vorhanden sein, langsam freigesetzt werden und somit für eine längere Zeit ein lokaler antibakterieller Implantatschutz bestehen.

4.1.2 Diffusionstestung mit *E.coli*

Bei *E.coli* erkennt man nach den ersten 5-Minuten-Elutionswert noch keinen Hemmhof. Daraus folgt, dass der Keim unter dieser Gentamicinkonzentration im Gegensatz zu *S.aureus* noch ungehindert wachsen kann, sofern das System nicht weitere Mengen an Antibiotikum nachliefert. Die Sensibilität von Bakterienstämmen variiert, besonders zwischen unterschiedlichen Spezies (62). Dies äußert sich auch in einer unterschiedlichen MHK von *S.aureus* und *E.coli*. Die MHK für *E. coli* ist höher als für *S.aureus* (63) und daher muss erst eine höhere lokale Konzentration an GB vorliegen, damit auch *E.coli* eliminiert wird. Jedoch zeigt sich bei *E.coli* schon nach 15-Minuten GP-Freisetzungseluat ein

deutlicher Hemmhof. Bei beiden Testbakterien steigen die Hemmhofdurchmesser mit steigender Gentamicin-Konzentration im Medium kontinuierlich an.

4.1.3 Analyse der Elution

Die Ergebnisse der Elutionstests in Kombination mit den Gewichtsmessungen zeigen, dass in den ersten 24 Stunden lediglich 40,5% der GP-Beschichtung freigesetzt werde. Damit verbleiben noch ca. 600µg GP auf den Kirschnerdrähten die für einen weiteren Zeitraum von 5 – 7 Tagen (Ergebnisse aus den Tierversuchen an der Philipps-Universität in Marburg eingesetzt, Manuskript in Vorbereitung) einen antibiotischen Schutz über der MHK von z.B. *Staphylokokkus aureus* bieten. Diese verbleibende Menge an GP würde in der postoperativen Phase eine Kolonisierung mit Mikroorganismen verhindern. Die hydrophoben Eigenschaften erschweren des Weiteren der GP Beschichtung auch die Anhaftung von Mikroorganismen auf der Oberfläche der Kirschnerdrähte (64).

Die Elutionstests zeigen, dass die Hemmhofdurchmesser und daher das freigesetzte GP in der ersten Stunde am stärksten ansteigen. Die mittlere Operationszeit von zum Beispiel unzementierten Knieendoprothesen beträgt zwischen 27 und 47 Minuten (65). Das größte Risiko für die Kontamination der Operationswunde besteht perioperativ (11). Genau in dieser Phase wird eine große Menge an Gentamicin aus GP freigesetzt. Daraus kann geschlossen werden, dass die in einer Wunde eingedrungenen Bakterien eliminiert werden und somit auch konsequent eine Besiedelung und damit die Bildung eines Biofilms verhindert werden kann.

4.1.4 Gewichtsmessung

Aufgrund verschiedener Faktoren ergeben sich einige Probleme bei der Messung der Gewichte. Durch das spezielle Sprühverfahren, mit dem die Beschichtung auf die Drähte aufgebracht wurde, entsteht zwar eine kontinuierliche aber keine vollständig homogene Beschichtung, die auf allen Drähten exakt ident ist. Daraus ergibt sich eine Schwankung im Gewicht der Beschichtungen.

Durch die Elution im PBS-Puffer entsteht eine geringe Salzablagerung auf den Kirschnerdrähten, wie die Abb. 9 deutlich zeigt. Diese Ablagerungen können einen signifikanten Einfluss auf die Gewichtsmassen nach den Elutionen haben. Jedoch sind nach dem Methanolbad der Kirschnerdrähte alle Anteile der Salze und auch der Beschichtung abgelöst. Dies erlaubt es, eine Betrachtung der übergebliebenen Schicht nach 24h anzustellen.

4.1.5 Auswirkung der Temperatur

Das GP löst sich signifikant schneller, wenn man unter in vivo Bedingungen die Elutionen durchführt. Die Unterschiede zwischen Raumtemperatur und Körpertemperatur zeigen, dass die Freisetzung erhöht ist, wenn Temperaturverhältnisse simuliert werden, die auch tatsächlich im Körper vorkommen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die Palmitinsäure bei höherer Temperatur an Viskosität verliert und daher schneller von den Kirschnerdrähten gelöst wird. Elutionstestungen sollten allenfalls unter den für den menschlichen Organismus physiologischen Temperaturen durchgeführt werden

4.2 Genauigkeit der Eichgerade

Die Eichgeraden von *S.aureus* und *E.coli* erlauben durch den hohen Korrelationskoeffizienten eine Interpretation der Gentamicinkonzentrationen der Eluate.

Die Methode der Messung der Hemmhofdurchmesser unterliegt jedoch einigen Schwankungen. In seltenen Fällen kann es vorkommen, dass trotz geringerer Elutionsdauer ein größerer Hemmhof entsteht als bei einer späteren Elution des gleichen untersuchten Drahtes. Diese Streuung der Werte ist zum Teil in der maximalen Ablesegenauigkeit des Lineals begründet (ca. 1mm). Zusätzlich wird der Hemmhof sehr stark von der Qualität der Ausplattierung beeinflusst. So kann durch einen stellenweise dünneren Bakterienrasen die Ablesegenauigkeit reduziert werden. Eine weitere Fehlerquelle sind die Agarplatten, da diese nicht immer exakt dieselbe Menge an MH-Agar pro Platte beinhalten und die

Diffusionsgeschwindigkeit in direkter Abhängigkeit zu den Schichtdicken des Nährmediums steht.

Trotz der angeführten Störfaktoren erlaubte diese Methode eine Eichgerade zu erstellen, die einen hohen Korrelationskoeffizienten besitzt. Der einschränkende Faktor ist jedoch, dass die Eichreihe immer nur in einem schmalen Konzentrationsbereich linear bleibt. Die Eichreihe wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,1-1,0mg/ml durchgeführt, was einen Maximaldurchmesser von 13,5mm bei *S.aureus* ergab. Dies war auch der Bereich, der von großem Interesse war, da sich in dieser Hemmhofspanne die Großzahl der Elutionstest befand. Die Durchmesser der Eluate brachten aber auch größere Durchmesser hervor. Der größte gemessene Wert lag nach 24h bei 17,5mm. Man kann nicht davon ausgehen, dass die Linearität der höheren Konzentrationen im gleichen Maß größere Durchmesser erzeugt, wie die Berechnungen aus der verwendeten Formel es nahelegen würden. Vielmehr muss man annehmen, dass die Durchmesser in Konzentrationen zwischen 1,1-2,0mg/ml einen geringeren Anstieg verzeichnen würden als sie es bei niedrigeren Konzentrationen machen. Läge man eine logarithmische Trendlinie über die Eichergebnisse erhalten wir sogar einen Korrelationskoeffizienten von 0,99. Es besteht also bei höheren Konzentrationen keine Linearität im klassischen Sinne.

Eine Möglichkeit, die korrelierenden Konzentrationen der größeren Durchmesser zu erhalten, wäre eine neue Eichreihe durchzuführen, die den Bereich von 1,1-2,0 mg/ml abdecken würde. Die Unterschiede der Durchmesser werden jedoch vergleichsweise gering sein, sodass die Ablesung in diesem Bereich deutlichen Schwankungen unterliegen würde. Darüber hinaus kann der MH-Agar nur eine gewisse Konzentration aufnehmen, sodass die Diffusion mit höheren Konzentrationen gestört wäre. Eine andere Option besteht darin, bei Verdacht auf höhere Konzentrationen eine Verdünnung der Eluate durchzuführen und dann bei Durchmessern rechnerisch auf die tatsächliche Konzentration rückschließen zu können. Diese zweite Variante ist eindeutig zu bevorzugen, da die Ablesefehler mit dem Lineal geringer sind als bei einer zusätzlichen Eichreihe in höherer Konzentration.

4.3 Absterbekinetik

Die Ergebnisse der Absterbekinetik korrelieren mit denen der Elutionsversuche. Die GP-Beschichtung der Kirschnerdrähte beginnt sich unmittelbar nach Flüssigkeitskontakt von der Oberfläche zu lösen. Das freigesetzte Gentamicin, gelöst aus GP, tötet die Keime in ähnlicher Geschwindigkeit wie das reine GS-Pulver ab. Die eingesetzte GS-Menge lag deutlich oberhalb der MAK der relevanten Keime und kann daher als ausreichend angesehen werden, Keime abzutöten. Eine geringe Überlebensrate von Bakterien konnte allerdings trotz der hohen Konzentrationen an Gentamicin beobachtet werden. Beide Systeme zeigen, dass die Wirkung des GP mit der des GS gleichzusetzen ist. Sowohl GP als auch GS töten den getesteten Laborstämmen.

Als Begründung für die überlebenden Bakterien trotz nachgewiesener Empfindlichkeit gegenüber Gentamicin gibt es mehrere Erklärungsmodelle.

Die Zugänglichkeit des Gentamicin ist nicht für alle Bakterien in gleichem Maße gegeben. Eine Eigenschaft der Staphylokokken ist, dass sie in unregelmäßigen traubenförmigen Haufen angeordnet sind. Außerdem ist *S.aureus* ein Biofilmbildner. Vor allem die Bakterien im Inneren solcher Aggregationen sind für Gentamicin kaum erreichbar. Das bedeutet, dass nicht alle Bakterien abgetötet werden können.

Wenn Bakterien antibiotischen Substanzen ausgesetzt sind, stirbt der Großteil der Population ab. Ein geringer Teil der Bakterien überlebt die Konfrontation mit den Antibiotika. Es handelt sich dabei um eine „Subpopulation“, die entweder keine oder nur eine äußerst geringe Vermehrungsrate aufweist. Sie befinden sich in einer Art „Scheintod“ und verharren in dieser stationären Phase, solange sie dem Antibiotikum ausgesetzt sind (66). Dadurch besteht die Möglichkeit, dass eine geringe Zahl an Keimen in der Suspension überlebt und nach dem Auftragen auf ein Nährmedium wieder zu wachsen beginnt.

„Aminoglykosidmolekülen binden an die 30S-Untereinheit der Ribosomen und verursachen Fehlsteuerungen („Misreading“) der Proteinsynthese. Diese Wirkung ist konzentrationsabhängig. Außerdem sieht man einen konzentrationsabhängigen „postantibiotischen Effekt“: nach Exposition bleibt die Aktivität der Bakterienzelle für 3 – 6h gehemmt.“ (60)

Mit der Zeit nimmt die Konzentration an freiem Gentamicin ab und die überlebenden Bakterien produzieren neue Ribosomen. „Außerdem können Aminoglykoside von modifizierten Enzymen (Phosphotransferasen, Acetyltransferasen) inaktiviert werden.“ (60)

Bei der Absterbekinetik ist eine signifikante Reduktion der Bakterien um mehrere log-Stufen entscheidend. Dies konnte erfolgreich demonstriert werden, da die beschichteten Kirschnerdrähte mit GP den gleichen Eliminationseffekt auf *S.aureus* zeigten wie das als Referenz untersuchte Gentamicinsulfat. Beide Gentamicinsalze weisen eine eindeutige Wirksamkeit gegen *S.aureus* auf.

Klinisch ist zu erwarten, dass die Bakterien in Implantatnähe durch das gelöste GP vernichtet werden bzw. daran gehindert werden, sich auf der Prothese anzuhängen bzw. dort zu vermehren. Dies zeigen die Untersuchungen zur Absterbekinetik, bleibt die Zahl der Bakterien zwischen dem 4-Stunden-Eluatwert und dem 24 Stunden-Eluatwert doch nahezu konstant. Unter in vivo-Bedingungen würde das Immunsystem jedoch seinen Beitrag leisten und noch überlebende Bakterien vernichten. Die GP Beschichtung kann als adjuvante Maßnahme zur Reduktion des Infektrisikos dienen.

4.4 Folgen für die Osseointegration

Die Elutionstest zeigen, dass die Menge an freigesetztem GP vor allem in den ersten Minuten besonders groß ist. Dies bedeutet, dass die ursprüngliche Oberfläche eines Titandrahtes besonders schnell wieder freigelegt ist. Die Titanoberflächen solcher Implantate besitzen ein hohes Maß an Rauigkeit, welche ein wichtiger Parameter für die Osseointegration der Osteoblasten darstellt (58,59). Diesen fällt es auf rauen Oberflächen leichter sich anzulagern und somit das Implantat in den noch vorhandenen Knochen zu integrieren. Da die durchgeführten Versuche zeigen, dass die Freisetzung der Beschichtung schnell geschieht, besteht also kaum Gefahr, dass die Osseointegration durch das GP verlangsamt wird. Aus diesem Grund ist das Risiko einer aseptischen Lockerung des Implantats nicht erhöht.

4.5 Versuche zur Selbstbeschichtung

Es wäre für die Chirurgin bzw. den Chirurgen von Vorteil, wenn er kurz vor dem Eingriff für jede Patientin bzw. jeden Patienten eine individuelle Zusammensetzung von Antibiotika in einer Beschichtung mischen könnte. Eine einfache Methode wäre dabei sicher die hier durchgeführte Kerzenziehmethode. Jedoch zeigten die Versuche, dass es nicht möglich ist, eine ausreichend geringe Menge an Beschichtung auf die jeweils benötigte Metalloberfläche aufzubringen. Dabei ist aus den Ergebnissen zu entnehmen, dass die Temperatur, bei der die Drähte in die Beschichtung gegeben werden, nicht so entscheidend ist wie die Zeit, die die Drähte in das Palmitat gehalten werden. Andererseits kann man mit dieser Form der Beschichtung bei längerem Verbleib im erhitzten Wachs keine homogene Beschichtung aufbringen. Auch muss darauf hingewiesen werden, dass durch zu starkes Erhitzen bzw. durch eine längere Beschichtungsdauer die Gefahr besteht, dass die Originalbeschichtung und damit das vorhandene Gentamicin verloren gehen. Aufgrund der schlechten Ergebnisse mit reinem Palmitat wurde davon Abstand genommen, in weiteren Versuchen Vancomycin in das geschmolzene Palmitat hinzuzufügen. Die einzig sinnvolle Möglichkeit besteht darin, den antibiotischen Schutzmantel mittels Sprühverfahren auf der Oberfläche gleichmäßig zu verteilen.

4.6 Klinische Relevanz

Die Beimischung von Antibiotika in Konchenzementen hat sich im Management von Infektionen in der orthopädischen Chirurgie schon etabliert. Eine zementfreie Alternative, die dieselben präventiven und therapeutischen Eigenschaften besitzt, stellt eine wichtige zusätzliche Option in der Chirurgie von Endoprothesen dar. Die postoperative Kontamination über den Blutweg, in der der Organismus und damit auch das Immunsystem durch die Belastung des operativen Eingriffs geschwächt sind, kann durch die prophylaktischen Maßnahmen im Operationssaal nicht vollständig verhindert werden. Jedoch erschwert die kontinuierliche lokale Freisetzung von Gentamicin direkt an der Prothese die Ansiedelung von Bakterien.

Die Verwendung von Antibiotika als Wirksubstanz von Prothesenbeschichtungen ist eine von vielen Möglichkeiten, zementfreie Prothesen auszurüsten. Die Vorteile zeigen sich in der Effizienz und im leichten Abbau von Gentamicinpalmitat im Organismus.

Referenzen:

(1) Antti-Poika I, Josefsson G, Kontinen Y, Lidgren L, Santavirta S, Sanzen L. Hip arthroplasty infection. Current concepts. Acta Orthop Scand 1990 Apr;61(2):163-169.

(2) Rand JA, Fitzgerald RH, Jr. Diagnosis and management of the infected total knee arthroplasty. Orthop Clin North Am 1989 Apr;20(2):201-210.

(3) 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.

(4) Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, Ong K, Vail TP, Berry DJ. The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the United States. J Bone Joint Surg Am 2009 Jan;91(1):128-133.

(5) Wirtz DC. Hip revision endoprosthesis. More often--more important. Orthopade 2009 Aug;38(8):665-666.

(6) An YH, Friedman RJ. Prevention of sepsis in total joint arthroplasty. J Hosp Infect 1996 Jun;33(2):93-108.

(7) Frommelt L. Principles of systemic antimicrobial therapy in foreign material associated infection in bone tissue, with special focus on periprosthetic infection. Injury 2006 May;37 Suppl 2:S87-94.

(8) Laffer RR, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W. Outcome of prosthetic knee-associated infection: evaluation of 40 consecutive episodes at a single centre. Clin Microbiol Infect 2006 May;12(5):433-439.

(9) 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.

- (10) Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987 Sep 25;237(4822):1588-1595.
- (11) von Eiff C, Heilmann C, Herrmann M, Peters G. Basic aspects of the pathogenesis of staphylococcal polymer-associated infections. *Infection* 1999;27 Suppl 1:S7-10.
- (12) Gotz F. Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol* 2002 Mar;43(6):1367-1378.
- (13) Sugarman B, Young EJ. Infections associated with prosthetic devices: magnitude of the problem. *Infect Dis Clin North Am* 1989 Jun;3(2):187-198.
- (14) Naparstek L, Carmeli Y, Navon-Venezia S, Banin E. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2014 Jan 9.
- (15) Coenye T, Nelis HJ. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2010 Nov;83(2):89-105.
- (16) Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 2005 Feb;43 Spec No:93-100.
- (17) Banit DM, Kaufer H, Hartford JM. Intraoperative frozen section analysis in revision total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2002 Aug;(401)(401):230-238.
- (18) Spangehl MJ, Younger AS, Masri BA, Duncan CP. Diagnosis of infection following total hip arthroplasty. *Instr Course Lect* 1998;47:285-295.
- (19) Winkler T, Trampuz A, Hardt S, Janz V, Kleber C, Perka C. Periprosthetic infection after hip arthroplasty. *Orthopade* 2014 Jan;43(1):70-78.
- (20) Schafer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis* 2008 Dec 1;47(11):1403-1409.

- (21) Nilsson-Augustinsson A, Briheim G, Herder A, Ljunghusen O, Wahlstrom O, Ohman L. Inflammatory response in 85 patients with loosened hip prostheses: a prospective study comparing inflammatory markers in patients with aseptic and septic prosthetic loosening. *Acta Orthop* 2007 Oct;78(5):629-639.
- (22) Ince A, Rupp J, Frommelt L, Katzer A, Gille J, Lohr JF. Is "aseptic" loosening of the prosthetic cup after total hip replacement due to nonculturable bacterial pathogens in patients with low-grade infection? *Clin Infect Dis* 2004 Dec 1;39(11):1599-1603.
- (23) 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.
- (24) Tunney MM, Patrick S, Curran MD, Ramage G, Anderson N, Davis RI, et al. Detection of prosthetic joint biofilm infection using immunological and molecular techniques. *Methods Enzymol* 1999;310:566-576.
- (25) Johnson DP, Bannister GC. The outcome of infected arthroplasty of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 1986 Mar;68(2):289-291.
- (26) Jackson WO, Schmalzried TP. Limited role of direct exchange arthroplasty in the treatment of infected total hip replacements. *Clin Orthop Relat Res* 2000 Dec;(381)(381):101-105.
- (27) Vavrik P, Landor I, Jahoda D. Experience in the treatment of infections of the total knee arthroplasty. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2000;67(2):121-127.
- (28) Buchholz HW, Engelbrecht H. Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. *Chirurg* 1970 Nov;41(11):511-515.
- (29) Zeller V, Lhotellier L, Marmor S, Leclerc P, Krain A, Graff W, et al. One-stage exchange arthroplasty for chronic periprosthetic hip infection: results of a large prospective cohort study. *J Bone Joint Surg Am* 2014 Jan 1;96(1):e1.

- (30) Kraay MJ, Goldberg VM, Fitzgerald SJ, Salata MJ. Cementless two-staged total hip arthroplasty for deep periprosthetic infection. *Clin Orthop Relat Res* 2005 Dec;441:243-249.
- (31) Haddad FS, Masri BA, Campbell D, McGraw RW, Beauchamp CP, Duncan CP. The PROSTALAC functional spacer in two-stage revision for infected knee replacements. Prosthesis of antibiotic-loaded acrylic cement. *J Bone Joint Surg Br* 2000 Aug;82(6):807-812.
- (32) Siebel T, Kelm J, Porsch M, Regitz T, Neumann WH. Two-stage exchange of infected knee arthroplasty with an prosthesis-like interim cement spacer. *Acta Orthop Belg* 2002 Apr;68(2):150-156.
- (33) Bittar ES, Petty W. Girdlestone arthroplasty for infected total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1982 Oct;(170)(170):83-87.
- (34) Francesco I, Francesco RG, Danilo B, Mirco LP, Bharat S, Ibrahim A, et al. Arthrodesis After Infected Revision TKA: Retrospective Comparison of Intramedullary Nailing and External Fixation. *HSS J* 2013 Oct;9(3):229-235.
- (35) Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P. *Orthopädie und Unfallchirurgie*. 6th ed.: Thieme; 2009.
- (36) Sculco TP. The economic impact of infected total joint arthroplasty. *Instr Course Lect* 1993;42:349-351.
- (37) Nasser S, Markel DC. Inexpensive methods of repairing cortical defects in cemented total joint replacement. *J Arthroplasty* 1999 Jun;14(4):514-516.
- (38) Andersson AE, Bergh I, Karlsson J, Eriksson BI, Nilsson K. Traffic flow in the operating room: an explorative and descriptive study on air quality during orthopedic trauma implant surgery. *Am J Infect Control* 2012 Oct;40(8):750-755.
- (39) Parvizi J, Saleh KJ, Ragland PS, Pour AE, Mont MA. Efficacy of antibiotic-impregnated cement in total hip replacement. *Acta Orthop* 2008 Jun;79(3):335-341.

- (40) Gillespie WJ, Walenkamp GH. Antibiotic prophylaxis for surgery for proximal femoral and other closed long bone fractures. *Cochrane Database Syst Rev* 2010 Mar 17;(3):CD000244. doi(3):CD000244.
- (41) Abou-Zeid AA, Shehata YM. Gentamicins. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg* 1977;132(2):97-108.
- (42) Wahlig H. Gentamicin-PMMA beads: a drug delivery system in the treatment of chronic bone and soft tissue infections. *J Antimicrob Chemother* 1982 Nov;10(5):463-465.
- (43) Engesaeter LB. Increasing incidence of infected THA in Norway despite improved antibiotic prophylaxis. In: Kienapfel, H. and Kühn, K.D., editor. *The Infected Implant*: Springer Medizin Verlag, Heidelberg; 2009. p. 3-6.
- (44) Josefsson G, Kolmert L. Prophylaxis with systematic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. A ten-year survey of 1,688 hips. *Clin Orthop Relat Res* 1993 Jul;(292)(292):210-214.
- (45) Wahlig H, Dingeldein E. Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthop Scand* 1980 Feb;51(1):49-56.
- (46) Oga M, Arizono T, Sugioka Y. Inhibition of bacterial adhesion by tobramycin-impregnated PMMA bone cement. *Acta Orthop Scand* 1992 Jun;63(3):301-304.
- (47) Vogt S, Kühn KD, Gopp U, Schnabelrauch M. Resorbable Antibiotic Coatings for Bone Substitutes and Implantable Devices. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 2005;36(12):814-819.
- (48) Erli HJ, Marx R, Paar O, Niethard FU, Weber M, Wirtz DC. Surface pretreatments for medical application of adhesion. *Biomed Eng Online* 2003 Sep 18;2:15.
- (49) Clauss M, Trampuz A, Borens O, Böhner M, Ilchmann T. Biofilm formation on bone grafts and bone graft substitutes: comparison of different materials by a standard in vitro test and microcalorimetry. *Acta Biomater* 2010 Sep;6(9):3791-3797.

- (50) Bruellhoff K, Fiedler J, Moller M, Groll J, Brenner RE. Surface coating strategies to prevent biofilm formation on implant surfaces. *Int J Artif Organs* 2010 Sep;33(9):646-653.
- (51) Warnke PH, Voss E, Russo PA, Stephens S, Kleine M, Terheyden H, et al. Antimicrobial peptide coating of dental implants: biocompatibility assessment of recombinant human beta defensin-2 for human cells. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013 Jul-Aug;28(4):982-988.
- (52) Kazemzadeh-Narbat M, Lai BF, Ding C, Kizhakkedathu JN, Hancock RE, Wang R. Multilayered coating on titanium for controlled release of antimicrobial peptides for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials* 2013 Aug;34(24):5969-5977.
- (53) Holinka J, Pilz M, Kubista B, Presterl E, Windhager R. Effects of selenium coating of orthopaedic implant surfaces on bacterial adherence and osteoblastic cell growth. *Bone Joint J* 2013 May;95-B(5):678-682.
- (54) Tsuchiya H, Shirai T, Nishida H, Murakami H, Kabata T, Yamamoto N, et al. Innovative antimicrobial coating of titanium implants with iodine. *J Orthop Sci* 2012 Sep;17(5):595-604.
- (55) Cheng H, Li Y, Huo K, Gao B, Xiong W. Long-lasting in vivo and in vitro antibacterial ability of nanostructured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 2013 Nov 1.
- (56) Kühn KD. In vitro release of gentamicinpalmitate coating in uncemented titanium implants. *IJNBM* 2010;3(1):94-106.
- (57) Neut D, van de Belt H, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials* 2003 May;24(10):1829-1831.
- (58) Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009 Sep;20 Suppl 4:172-184.

- (59) Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. Clin Oral Implants Res 2009 Sep;20 Suppl 4:185-206.
- (60) Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K editors. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10th ed. München: Urban & Fischer/Elsevier GmbH; 2009.
- (61) Matl FD, Zlotnyk J, Obermeier A, Friess W, Vogt S, Buchner H, et al. New anti-infective coatings of surgical sutures based on a combination of antiseptics and fatty acids. J Biomater Sci Polym Ed 2009;20(10):1439-1449.
- (62) Hof H, Dörries R. Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag; 2009.
- (63) EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Available at: <http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=dif&NumberIndex=50&Antib=49&Specium=-1>.
- (64) Kittinger C, Marth E, Windhager R, Weinberg AM, Zarfel G, Baumert R, et al. Antimicrobial activity of gentamicin palmitate against high concentrations of Staphylococcus aureus. J Mater Sci Mater Med 2011 Jun;22(6):1447-1453.
- (65) Akan B, Karagüven D, Guclu B, Yildirim T, Kaya A, Armangil M, et al. Cemented versus Uncemented Oxford Unicompartmental Knee Arthroplasty: Is There a Difference? Adv Orthop 2013;2013:245915.
- (66) Johnson PJ, Levin BR. Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in Staphylococcus aureus. PLoS Genet 2013;9(1):e1003123.