

**Diplomarbeit**

**Wechselwirkungen von Antimycotika auf Stabilität  
und Wirksamkeit in PMMA**

eingereicht von

**Julia Christina Steiner**

zur Erlangung des akademischen Grades

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

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt auf der

**Univ. Klinik für Orthopädie und Traumatologie**

unter der Anleitung von

Univ. Prof. Dr. rer. Nat. Klaus-Dieter Kühn  
Univ. Prof. Dr. Andreas Leithner

Graz, 02.11.2019

*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 02.11.2019*

*Julia Christina Steiner eh*

### Ethikvotum

Da für diese Arbeit keine Forschung am oder mit Menschen bzw. Forschung mit menschlichem Körpermaterial oder personenbezogenen Daten durchgeführt wurde, entfällt die Notwendigkeit eines Ethikvotums.

### Finanzierung

Die vorliegende Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der Heraeus Medical GmbH (Philipp-Reis-Straße 8-13, 61273 Wehrheim, Deutschland) durchgeführt.

## Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle bei denjenigen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt haben. Einen wichtigen Beitrag leistete mein Prof. Dr. Klaus-Dieter Kühn wie auch Prof. Dr. Andreas Leithner bei der Betreuung der Arbeit. Außerdem gilt mein Dank der Firma Heraeus Medical GmbH und der Charité Berlin, ohne welche diese Testungen nicht zustande gekommen wären. Ein besonderes Dankeschön gilt den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Charité Berlin sowie auch den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Firma Heraeus Medical GmbH in Wehrheim für deren tatkräftige Unterstützung und Hilfe bei der technischen Durchführung der Versuche. Zudem möchte ich Herrn Dipl.-Ing. Christoph Rietz sowie meinem Vater Herrn Dipl.-Ing. Peter Steiner meinen herzlichen Dank aussprechen für das Korrekturlesen der Arbeit.

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Protheseninfektionen werden nur selten durch fungale Erreger verursacht. Sie können jedoch zu schwerwiegenden Komplikationen führen, da sie oft erst spät diagnostiziert werden. *Candida albicans* ist der dabei häufigste fungale Erreger und neigt zur Ausbildung eines widerstandsfähigen Biofilms. Eine suffiziente Behandlung ist mitunter auch deshalb so wichtig, da von fungalen Protheseninfektionen (FPI) meist immungeschwächte oder multimorbide Patientinnen und Patienten betroffen sind. Die Therapie sollte individuell an die Patientin oder den Patient angepasst werden. Es besteht die Möglichkeit dem Knochenzement lokale Antimykotika beizumischen. Dadurch können im Prothesengebiet höhere Wirkstoffkonzentrationen erreicht werden ohne systemische Nebenwirkungen zu erzeugen. Über die Auswirkungen der antifungalen Beimischungen auf die mechanische Stabilität der Prothese sowie über die Hemmwirkung der Antimykotika-Dosierungen ist bisher nicht viel bekannt.

**Material und Methoden:** Aus PMMA-Knochenzement wurden durch eine manuelle Beimischung verschiedener Dosierungen von Voriconazol, liposomalem Amphotericin B (LAB) und nicht-liposomalem Amphotericin B (NLAB) Prüfkörper hergestellt. Anschließend wurden sie in Druckfestigkeits-, Biegefestigkeits- und Schlagzähigkeitstests auf ihre mechanische Stabilität getestet (ISO 5833, DIN 53435). Zudem wurden die Prüfkörper in mikrobiologischen Hemmhofstests auf Sabouraud-Dextrose-Agarplatten gegen *Candida albicans* und *Candida glabrata* getestet.

**Ergebnisse:** Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Antimykotika-Dosierung und der Reduktion der mechanischen Stabilität. Dabei war die Dynstat-Schlagzähigkeit die empfindlichste mechanische Kenngröße. LAB wies im Vergleich zum NLAB eine bessere Schlagzähigkeit und Biegefestigkeit auf, während das NLAB bei der Druckfestigkeit bessere Ergebnisse aufzeigte. Bei den Hemmhofstests zeigte LAB und NLAB keinerlei hemmende Wirkung gegen die beiden *Candida*-Spezies. Voriconazol wirkte hingegen über den gesamten Zeitraum gut gegen *Candida albicans* und *Candida glabrata*.

**Diskussion:** Für eine ausreichende Wirkung der Antimykotika gegen die *Candida*-Spezies waren hohe Dosierungen notwendig. Um dennoch eine ausreichende mechanische Stabilität garantieren zu können sollten die PMMA-Zemente mit diesen beigemischten Dosierungen nicht zur Fixierung der Prothesen verwendet

werden. Es besteht jedoch die Option hohe Dosierungen von Antimykotika zu sogenannten 'Spacern' hinzuzufügen um eine gute lokale Hemmwirkung zu erreichen. Diese verbleiben als Interimsprothesen bei Revisionsoperationen nur temporär im Körper und sind zudem durch Metallstäbe mechanisch stabilisiert.

## Abstract

**Introduction:** Fungal prosthetic infections (FPI) are quite rare, yet they can lead to severe complications because of their frequently delayed diagnosis. *Candida albicans* is the most common fungal pathogen and it tends to develop a robust biofilm. A sufficient therapy is very important as FPI often affect immunocompromised or multimorbid patients. Therapeutic strategies should be adjusted individually onto every patient. There is the option of adding local antimycotics to the bone cement. Hereby higher loads of active substance can be reached locally without causing systemic side-effects. Not much is known about the impacts of antifungal admixtures onto the mechanical stability of the prosthesis and onto the inhibitory effects of the antifungal dosages.

**Material and Methods:** The specimen have been produced by adding different dosages of the antimycotics voriconazole, liposomal amphotericin B (LAB) and non-liposomal amphotericin B (NLAB) to the bone cement manually. Afterwards compressive-strength-, bending-strength- and impact-strength-tests have been performed to test their mechanical stability (ISO 5833, DIN 53435). Also, the specimen have been tested in microbiologic zone-of-inhibition-tests against *candida albicans* and *candida glabrata* on sabouraud-dextrose-agar-plates.

**Results:** A correlation could be seen between the amount of antimycotic dosages and the decline of mechanical stability. Here the most sensible test concerning was the impact-strength-test. LAB showed a better impact strength and bending strength compared to NLAB, while NLAB had better results in the compressive-strength-tests. In the zone-of-inhibition-tests amphotericin B showed no impact against the candida species. On the contrary voriconazole presented a good inhibitory effect on *candida albicans* and *candida glabrata* over the whole period of time.

**Discussion:** High dosages of the local antimycotics were necessary to receive a sufficient local inhibitory effect against the candida-species. In order to guarantee an adequate mechanical stability the PMMA bone cement with those admixed dosages should not be used for the fixation of the prosthesis. Yet there is the option to add those high dosages of antimycotics to so-called 'spacers' for the purpose of a good local inhibitory effect. They remain in the prosthetic joint as transitional prostheses in revision surgeries and they are mechanically stabilized with metal rods.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagungen .....	iii
Zusammenfassung .....	iv
Abstract .....	vi
Abkürzungen.....	x
Tabellenverzeichnis .....	xii
Abbildungsverzeichnis .....	xiii
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Pathogenese.....	2
1.2 Risikofaktoren.....	3
1.3 Klassifikation .....	4
1.4 Erreger .....	5
1.4.1 Bakterielle Protheseninfektionen.....	5
1.4.2 Fungale Protheseninfektionen .....	6
1.5 Diagnostik .....	8
1.6 Therapie .....	12
1.6.1 Prothesenerhalt und Débridement.....	13
1.6.2 Ein- oder zweizeitige Revisionsoperation.....	14
1.6.3 Medikamentöse Therapie .....	15
1.6.4 PMMA-Zement mit lokalen Antimykotika.....	16
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 PMMA-Knochenzemente.....	22
2.2 Additive Antimykotika.....	23
2.2.1 Nicht-liposomales Amphotericin B (NLAB).....	23
2.2.2 Liposomales Amphotericin B.....	24
2.2.3 Voriconazol.....	24
2.3 Dosierungen .....	25
2.3.1 Dosierungen für die mechanischen Stabilitätstests.....	25
2.3.2 Dosierungen für die mikrobiologischen Hemmhoftests .....	26
2.4 Herstellung der PMMA-Prüfkörper .....	27
2.5 Optische Auffälligkeiten bei der Herstellung .....	30
2.6 Mechanische Stabilitätstests.....	32
2.6.1 Druckfestigkeitsprüfung nach ISO 5833:2002 .....	33
2.6.2 Biegefestigkeitsprüfung und Biegemodul nach ISO 5833 .....	34
2.6.3 Dynstat-Schlagzähigkeit nach DIN 53435:1983 .....	35
2.7 Mikrobiologische Hemmhoftests .....	37
2.7.1 Vorbereitung .....	37
2.7.2 Durchführung .....	38
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>

3.1	<i>Mechanische Ergebnisse</i> .....	40
3.1.1	Druckfestigkeit .....	40
3.1.2	Biegefestigkeit und Biegemodul .....	43
3.1.3	Dynstat-Schlagzähigkeit .....	46
3.2	<i>Mikrobiologische Ergebnisse</i> .....	49
3.2.1	Voriconazol ( <i>Voriconazol</i> ®) .....	50
3.2.2	Amphotericin B - <i>NLAB</i> und <i>AmBisome</i> ® .....	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>56</b>
4.1	<i>Mechanische Stabilität</i> .....	57
4.2	<i>Mikrobiologische Wirkung</i> .....	59
4.3	<i>Implikationen für Theorie und Praxis</i> .....	60
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>61</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABD	Amphotericin-B-Desoxycholat
ADLF	'Alpha Defensin Lateral Flow'
allg.	allgemein
ASA	American Society of Anaesthesiologists)
Aspergillus spec.	Aspergillus species
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Maß-Index
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
C	Celsius
Cand.	Candida
CRP	C-reaktives Protein
DD	Differentialdiagnosen
ECDC	'European Centre for Disease Prevention and Control'
E.	Enterococcus
EPJIS	European Bone and Joint Infection Society
EPS	extrazellulärepolymere Substanzen
ESBL	'extended spectrum beta-lactamase'
FPI	fungale Protheseninfektionen/ 'fungal prosthetic infections'
HPBCD	Hydroxypropylbetadex
HPF	'high-power-fields'
HTEP	Hüfttotalendoprothese
IDSA	Infectious Diseases Society of America
i.v.	intravenös
kg	kilogramm
k.R.	kein Richtwert
KTEP	Knietotalendoprothese
LAB	liposomales Amphotericin B
mg	milligramm
MMA	Methylmethacrylat
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus

MSIS	Muskuloskeletal Infection Society
NLAB	nicht-liposomales Amphotericin B
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMMA	Polymethylmethacrylat
p.o.	peroral
PPI	periprothetische Infektion(en)
s.	siehe
spec.	species
Staph.	Staphylococcus
Tab.	Tabelle
vgl.	vergleiche

Maßeinheiten:

d	‚day‘ (englisch; Tag)
h	‚hour‘ (englisch; Stunde)
g	Gramm
J	Joule
mg/kg	milligramm/kilogramm
min	‚minute‘ (englisch; Minute)
µl	mikroliter
sec	‚second‘ (englisch; Sekunde)
Vol.-%	Volumenprozent (Anteil am Volumen der Zementmasse)

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inzidenzen von periprothetischen Infektionen (PPI)

Tabelle 2: Amphotericin B Literatur

Tabelle 3: Voriconazol Literatur

Tabelle 4: Dosierungen für die Stabilitätstests

Tabelle 5: Dosierungen für die mikrobiologischen Tests

Tabelle 6: Druckfestigkeit von *Palacos® R+G* nach Zugabe von *Voriconazol®*

Tabelle 7: Druckfestigkeit von *Palacos® R* sowie *Palacos® R+G* nach Zugabe von *Ambisome®*

Tabelle 8: Druckfestigkeit von *Palacos® R* , *Palacos® R+G* sowie *Copal® G+C* nach Zugabe von *NLAB*

Tabelle 9: Biegemodul von *Palacos® R* , *Palacos® R+G* sowie *Copal® G+C* nach Zugabe von *Voriconazol®*, *AmBisome®* und *NLAB*

Tabelle 10: Biegefestigkeit von *Palacos® R+G* nach Zugabe von *Voriconazol®*

Tabelle 11: Biegefestigkeit von *Palacos® R* sowie *Palacos® R+G* nach Zugabe von *AmBisome®*

Tabelle 12: Biegefestigkeit von *Palacos® R* , *Palacos® R+G* sowie *Copal® G+C* nach Zugabe von *NLAB*

Tabelle 13: Dynstat-Schlagzähigkeit von *Palacos® R+G* nach Zugabe von *Voriconazol®*

Tabelle 14: Dynstat-Schlagzähigkeit von *Palacos® R* sowie *Palacos® R+G* nach Zugabe von *AmBisome®*

Tabelle 15: Dynstat-Schlagzähigkeit von *Palacos® R* , *Palacos® R+G* sowie *Copal® G+C* nach Zugabe von *NLAB*

Tabelle 16: Durchmesser der Hemmhöfe gegen *Cand. albicans* [mm]

Tabelle 17: Durchmesser der Hemmhöfe gegen *Cand. glabrata* [mm]

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Diagnostischer Algorithmus
- Abbildung 2: Flüssiges Monomer
- Abbildung 3: PMMA-Pulver: *Palacos® R*, *Palacos® R+G*, *Copal® G+C*
- Abbildung 4: Nicht-liposomales Amphotericin B (NLAB)
- Abbildung 5: Liposomales Amphotericin B (*AmBisome®*)
- Abbildung 6: *Voriconazol®*
- Abbildung 7: Material und Werkzeuge für PMMA-Herstellung
- Abbildung 8: Zementteig beim Herstellungsprozess
- Abbildung 9: Hydraulische Pressen
- Abbildung 10: Metallformen für die PMMA-Prüfkörper
- Abbildung 11: Mikrobiologische PMMA-Prüfkörper mit 0,2g NLAB
- Abbildung 12: Mechanische PMMA-Prüfkörper
- Abbildung 13: PMMA-Prüfzylinder mit 0,2g NLAB
- Abbildung 14: PMMA-Prüfzylinder mit 2,66g NLAB
- Abbildung 15: PMMA-Zement mit 10,5g *Voriconazol®*
- Abbildung 16: PMMA-Zementteig mit 10,5g *Voriconazol®*
- Abbildung 17: PMMA-Prüfzylinder mit 10,5 *Voriconazol®*
- Abbildung 18: Elektrische Schiebelehre
- Abbildung 19: Druckfestigkeitsmessung nach ISO 5833
- Abbildung 20: Biegefestigkeitsprüfung nach ISO5833
- Abbildung 21: Graphische Darstellung der 4-Punkt-Biegefestigkeitsprüfung
- Abbildung 22: DIN-Schlagzähigkeitsprüfung - Startposition
- Abbildung 23: DIN-Schlagzähigkeitsprüfung -Endposition
- Abbildung 24: Phosphate-Buffered-Saline Tablets
- Abbildung 25: PBS-Puffer
- Abbildung 26: *Falcon®*-Tube mit PMMA-Prüfkörper in PBS-Puffer
- Abbildung 27: Vorgang der mikrobiologischen Hemmhöftestung
- Abbildung 28: *Cand.-albicans*-Hemmhöfe von *Palacos® R+G* nach Zugabe von  
3,5 g *Voriconazol®* nach 1 h
- Abbildung 29: *Cand.-albicans*-Hemmhöfe von *Palacos® R+G* nach Zugabe von  
3,5 g *Voriconazol®* nach 42 d

Abbildung 30: *Cand.-albicans*-Hemmhöfe von *Palacos® R+G* nach Zugabe von 10,5 g *Voriconazol®* nach 1 h

Abbildung 31: *Cand.-albicans*-Hemmhöfe von *Palacos® R+G* nach Zugabe von 10,5 g *Voriconazol®* nach 7 d

Abbildung 32: *Cand.-albicans*-Hemmhöfe von *Palacos® R+G* nach Zugabe von 10,5 g *Voriconazol®* nach 42d

Abbildung 33: *Cand.-glabrata*-Hemmhöfe von *Palacos® R+G* nach Zugabe von 3,5 g *Voriconazol®* nach 1 h

Abbildung 34: *Cand.-glabrata*-Hemmhöfe von *Palacos® R+G* nach Zugabe von 3,5 g *Voriconazol®* nach 42 d

Abbildung 35: *Cand.-glabrata*-Hemmhöfe von *Palacos® R+G* nach Zugabe von 10,5 g *Voriconazol®* nach 1 h

Abbildung 36: *Cand.-glabrata*-Hemmhöfe von *Palacos® R+G* nach Zugabe von 10,5 g *Voriconazol®* nach 42 d

Abbildung 37: *Cand.-albicans*- Hemmhöfe von *Palacos® R+G* nach Zugabe von 2,66 g *NLAB* nach 1 h

# 1 Einleitung

Infektionen von Gelenksprothesen sind eine gefürchtete postoperative Komplikation und deren Behandlung stellt für Orthopäden und Orthopädinnen, Infektiologen und Infektiologinnen sowie für das Gesundheitssystem häufig eine große Herausforderung dar. Periprothetische Gelenksinfektionen (PPI), aseptische Lockerungen, Frakturen im Bereich der Prothese und mangelnde Stabilität zählen zu den Hauptursachen für das Versagen der Gelenksprothesen. Die aseptische Lockerung besitzt eine höhere Inzidenz, jedoch verläuft die periprothetische Gelenksinfektion oft schwerwiegender und ist komplizierter zu behandeln. [9, 13] Bei den Hüft-Totalendoprothesen (HTEP) und den Knie-Totalendoprothesen (KTEP) beträgt das Risiko etwa 0,5 - 1 % an einer Protheseninfektion zu erkranken, wobei hier verschiedene Studien leichte Abweichungen in der Inzidenzrate aufweisen. Ein Ausschnitt davon ist in Tabelle 1 aufgelistet. Bei den darauffolgenden Revisionsoperationen zeigt sich ein höheres Infektionsrisiko von bis zu 3 - 5 %. Das größte Risiko einer Infektion besteht in den ersten zwei postoperativen Jahren. In seltenen Fällen können Protheseninfektionen auch nach bis zu 4 Jahren noch auftreten. [1 - 3, 15, 18, 21, 23, 25, 36]

**Tabelle 1.** Inzidenzen von periprothetischen Infektionen (PPI)

PPI	Author	Inzidenz [%]	Erfassungszeitraum
allg.:	Renz et al. (2018) [15]	0,5 - 1	
	Lentino et al. (2003) [23]	1,5 - 2,5	
HTEP:	Blom et al. (2005) [22]	1,1	Nach 5-8 Jahren
	Phillips et al. (2003) [21]	0,2 - 1,1	Nach 5 Jahren
	Kurtz et al. (2012) [38]	1,99 - 2,18	
KTEP:	Blom et al. (2004) [24]	4,4	Nach 2,8 Jahren
	Laffer et al. (2006) [25]	0,5 - 2	Nach 2 Jahren
	Kurtz et al. (2012) [38]	2,05 - 2,18	

Aufgrund der immer älter werdenden Bevölkerung steigt die Anzahl der Gelenkersatzoperationen kontinuierlich an und simultan dazu steigt auch die Anzahl an Protheseninfektionen. Tatsächlich kam es in den letzten Jahren zu einer teilweise erhöhten Inzidenz der periprothetischen Infektionen trotz der

medizinischen Fortschritte und der fortlaufenden Optimierung der Therapie. [5, 12, 13, 18]

## 1.1 Pathogenese

Bei einer endoprothetischen Operation verbleibt die Prothese als Fremdkörper im Körper des Patienten oder der Patientin und bietet somit eine Angriffsfläche für Bakterien und Pilze. Wenn Keime perioperativ, durch eine Infektion im periprothetischen Gewebe oder durch Bakteriämie ins Wundgebiet gelangen, tendieren sie dazu einen Biofilm auszubilden und zu proliferieren. [2]

Die Entstehung eines Biofilms lässt sich in die folgenden vier Stadien einteilen: (1) die Zelladhäsion, (2) die Proliferation, (3) die Ausreifung des Biofilms und (4) die zelluläre Streuung. *Stadium 1:* Ab dem Zeitpunkt der Implantation akkumulieren auf der Prothese einige Plasmaproteine wie Fibronektin oder Fibrinogen. [19] Diese bilden eine Oberflächenschicht, welche es den Erregern ermöglicht sich dort festzuheften. Die Adhäsion ist abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit, der Hydrophilie und dem Material der Prothesenoberfläche. *Stadium 2:* Es kommt zur Proliferation der Erreger, Anheften weiterer Spezies und zur Organisation zwischen den Zellen. Die Bakterien oder Pilze bilden eine basale Schicht entlang der Oberfläche und produzieren extrazelluläre polymere Substanzen (EPS). [46] Diese Matrix ist noch nicht vollständig ausgebildet und zu diesem Zeitpunkt noch relativ leicht zu entfernen. [2, 4, 12, 18, 19] *Stadium 3:* Durch die Ausbildung von Zellfortsätzen und der Modifikation der EPS-Matrix erlangt der Biofilm mehr Stabilität und die Eradikation ist erschwert. *Stadium 4:* Aus einem ausgereiften Biofilm können sich einzelne Bakterien lösen und an einer Oberfläche in der Umgebung den Biofilmzyklus von neuem beginnen. [37]

Die Erreger schaffen sich durch den Biofilm ein eigenes Ökosystem, in dem für sie ideale Bedingungen herrschen. Der Biofilm bietet ihnen einen Schutz vor der körpereigenen Immunabwehr und einen idealen Nährboden. Durch die umgebende Schicht aus EPS und die darin eingelagerten Substanzen existiert eine Barriere, welche für Antibiotika nur schwer zu durchdringen ist. Zudem sind die Bakterien in der Matrix kaum sensibel auf Antibiotika. Der Grund hierfür liegt teilweise an der Sekretion von inaktivierenden Enzymen durch die Mikroorganismen und an der schweren Erreichbarkeit der Bakterien und Pilze in

der EPS-Schicht. Außerdem befinden sich die Erreger in einer Art stationären Wachstumsphase, ihre Replikationsgeschwindigkeit ist stark reduziert und das Nährstoffangebot vermindert. Dadurch sind sie weniger sensibel auf Antibiotika oder Antimykotika. [1, 6, 7, 9, 35, 37, 47]

## 1.2 Risikofaktoren

Es gibt zahlreiche Faktoren, die das Auftreten einer Infektion begünstigen.

Hierbei kann man zwischen exogenen und endogenen Risikofaktoren unterscheiden. Zu den exogenen Faktoren zählt unter anderem eine verlängerte Operationsdauer, eine unzureichende Hygiene im Operationsgebiet oder eine geringe Anzahl durchgeführter Operationen des Operateurs oder der Operateurin. Jede Viertelstunde intraoperativer Verzögerung kann das Risiko einer systemischen Infektion um nahezu 10 % erhöhen. Im Operationssaal sind normotherme Bedingungen anzustreben, da eine Hyperthermie mit dem erhöhten Auftreten von Infektionen assoziiert werden kann. [5]

Unter den endogenen Risikofaktoren versteht man die jeweiligen Komorbiditäten und Vorerkrankungen des Patienten oder der Patientin. Adipositas ab einem Body-Maß-Index (BMI) von über 30 kg/m<sup>2</sup> kann mit einem erhöhten Risiko einhergehen, während dies bei Präadipositas laut Correa-Valderrama et al. 2019 nicht bewiesen werden konnte. [32] Da Patienten und Patientinnen mit erhöhtem BMI vermehrt arthrotische Gelenksschäden aufweisen, sollte hier präoperativ eine Gewichtsreduktion angestrebt werden um potentielle Komplikationen zu reduzieren. Es wurde ein vermehrtes Auftreten beim männlichen Geschlecht beobachtet. Hohes Alter alleine kann nicht als eindeutiger Risikofaktor bewiesen werden. Die Operationsindikation sollte jedoch aufgrund der erhöhten Komplikationsrate mit steigendem Alter strenger gestellt werden. Regelmäßiger Nikotinkonsum kann ein vermehrtes Auftreten von Infektionen begünstigen, somit sollte prä- und postoperativ auf das Rauchen verzichtet werden. [31 - 33] Eine nasale Besiedlung mit *Staph. aureus* geht postoperativ mit einer erhöhten Rate an Infektionen mit *Methicillin-resistenten Staph. aureus (MRSA)* einher und sollte präoperativ saniert werden. [34] Zu den Komorbiditäten, welche einen Einfluss auf die Inzidenz von periprothetischen Infektionen haben können, zählen unter anderem Diabetes mellitus, rheumatoide Erkrankungen, chronisch obstruktive

Lungenerkrankungen, maligne Neoplasien, Leberinsuffizienzen, Bakteriämien sowie die Einnahme von Kortikosteroiden oder Immunsuppressiva. Bakteriämien können unter anderem bei Pneumonien, bei komplizierten Harnwegsinfekten oder bei Zahnabszessen vorliegen. [37] Außerdem vorbelastet sind Patienten und Patientinnen, die in ihrer Krankheitsanamnese eine Gelenkoperation infolge einer traumatischen Fraktur aufweisen. Auch invasive Eingriffe, eine parenterale Ernährung oder liegende Venen- oder Harnkatheter stellen ein zusätzliches Risiko dar. Ein reduzierter Allgemeinzustand des Patienten oder der Patientin wirkt sich negativ auf die Wundheilung aus. Eine Risikoeinstufung laut dem ASA-Score („American Society of Anaesthesiologists“) von über 2 spricht für eine Beeinträchtigung durch die zugrundeliegenden Komorbiditäten und somit für ein erhöhtes Infektionsrisiko. [1, 5, 9, 29]

Als Prophylaxe erhält jeder Patient und jede Patientin präoperativ ein Antibiotikum. Dabei handelt es sich meist um Breitbandantibiotika wie Cefazolin oder Cefuroxim. Bei Patienten und Patientinnen mit einer Allergie gegen Cephalosporine sowie bei MRSA-Infektionen kann bereits Vancomycin in Kombination mit einem weiteren Antibiotikum in der systemischen Prophylaxe zum Einsatz kommen. [17]

### 1.3 Klassifikation

Die Protheseninfektionen können anhand des Zeitpunktes ihres Auftretens in eine frühe Infektion (1), eine verzögerte Infektion (2) und eine späte Infektion (3) eingeteilt werden. Die frühe Infektion ist gekennzeichnet durch einen Auftritt innerhalb von 1 - 3 Monaten nach erfolgter Operation und ist in den meisten Fällen auf einen perioperativen Keimeintritt hoch-virulenter Bakterien zurückzuführen. Oft wird sie durch wie *Staphylococcus aureus* oder Gram-negative Bakterien wie *E. coli* oder *Klebsiella spec.* verursacht. Die verzögerte Infektion wird klassifiziert durch ein Auftreten zwischen drei und 24 Monaten postoperativ. Sie wird auch als „low-grade“ Infektion bezeichnet. Diese wird typischerweise durch niedrig-virulente Erreger wie *Cutibacterium acnes* oder koagulase-negative Staphylokokken verursacht. Diese sind Teil der physiologischen Hautflora und können unter anderem in das Wundgebiet verschleppt werden. Cutibakterien sind zum Beispiel eine der Haupterreger bei Schulterprotheseninfektionen, jedoch ein seltener Erreger bei anderen betroffenen Gelenken. [35] Die späte Infektion tritt erst nach

ein bis zwei Jahren auf. Sie wird zumeist durch eine Infektion im angrenzenden Gewebe oder hämatogen durch eine Bakteriämie verursacht. Eine hämatogene Keimverschleppung kann unter anderem durch eine Zahnbehandlung, einen Harnwegsinfekt oder einer Erkrankung der Atemwege provoziert werden. Die Einnahme von Immunsuppressiva kann eine Infektion zusätzlich begünstigen. [1, 19, 25, 26, 35, 36]

Die Symptomatik einer frühen Infektion äußert sich zumeist als akute Entzündung. Klinisch zeigt sich ein plötzlich geschwollenes, schmerzhaftes, gerötetes Gelenk. Eine Infektion kann auch zu Wundheilungsstörungen mit prolongierter Wundsekretion oder zu Fistelbildungen führen. Der Patient oder die Patientin ist teilweise febril, in einem reduzierten Allgemeinzustand und die Entzündungsparameter im Labor sind oft erhöht. Die verzögerte oder späte Reaktion hingegen äußert sich in einem subakuten, chronischen Krankheitsbild. Dabei kann es zu chronischen Gelenkschmerzen, Fistelbildungen und zur Prothesenlockerung kommen, jedoch zeigen sich zumeist keine systemischen Krankheitszeichen. Aufgrund der unspezifischen Symptomatik und der erschwerten Diagnostik wegen der geringen Keimanzahl werden subakute Protheseninfektionen oft verkannt. [25, 26]

## **1.4 Erreger**

### **1.4.1 Bakterielle Protheseninfektionen**

Die meisten Protheseninfektionen werden durch *Staphylococcus spec.* verursacht. Laut Tande et al. 2014 werden je 27 % der Hüft- und Knieprotheseninfektionen durch *Staph. aureus* sowie durch koagulase-negative Staphylokokken wie *Staph. epidermidis* hervorgerufen. [18, 43] Bei bis zu rund 10 % aller auftretenden Protheseninfektionen kann kein Erreger detektiert werden, bei etwa 30 % der Patientinnen und Patienten können hingegen mehrere Erreger festgestellt werden. [40] Ein zunehmendes Problem bei der Behandlung von Protheseninfektionen bilden Antibiotikaresistenzen. Innerhalb Europas bestand die Inzidenz der Resistenzen von *Staph. aureus* gegenüber Methicillin beispielsweise im Jahr 2018 laut der ‚European Centre for Disease Prevention and Control‘ (ECDC) bei circa 17 %. Parallel zu dieser Entwicklung kam es in letzter Zeit zu einer intensiven

Forschung in der Entwicklung neuer Antiinfektiva sowie in der Prävention weiterer Bakterienresistenzen. [20, 25]

### 1.4.2 Fungale Protheseninfektionen

Im Gegensatz zu bakteriellen Erregern sind Protheseninfektionen sehr selten durch Pilze verursacht. Fungale Infektionen machen nur bis zu 1 % aller Infektionen nach Prothesenoperationen aus. Davon werden etwa 80 % von Candida-Stämmen verursacht. [9, 12, 18, 39, 42] Der mit Abstand häufigste Pilz, welcher auf prothetischen Oberflächen detektiert wird, ist *Candida albicans* mit einem Anteil von nahezu 50 %. Danach folgen die fungalen Erreger *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* und *Candida tropicalis*. [9, 40, 44, 45, 55, 79] Eine Protheseninfektion durch *Candida spec.* kann nach bis zu vier Jahren postoperativ auftreten. [69] Es kann auch zu einer Superinfektion durch Pilze bei einer bereits bestehenden bakteriellen Protheseninfektion kommen. Die Pilze siedeln sich öfter an einen durch *Staphylokokken* oder *Cutibakterien* ausgebildeten Biofilm an. Durch die teilweise unspezifischen Symptome und die koexistierenden Bakterien sind die fungalen Erreger oftmals schwer feststellbar. Da bei Protheseninfektionen zumeist nur der bakterielle Erreger behandelt wird, kann es zu schweren Verläufen und therapieresistenten Infektionen kommen. Ein gemeinsames Auftreten der Candida-Stämme mit verschiedenen Bakterien kann beobachtet werden bei *Streptokokken*, *Enterokokken*, *Escherichia* oder *Staphylokokken*. Diese Mikroorganismen können sich über Signalmoleküle, durch direkten Zellkontakt und durch ein gegenseitiges Anpassen der umgebenden Bedingungen organisieren. [12, 43, 45]

Fungale Protheseninfektionen treten vermehrt bei immungeschwächten Patienten und Patientinnen, bei vorbestehenden Komorbiditäten oder bei koexistenten Begleiterkrankungen auf. [47] Eine zuvor aufgetretene bakterielle Protheseninfektion kann eine erneute Infektion ebenfalls begünstigen. In Kapitel 1.2 wird näher auf die Risikofaktoren eingegangen.

Candida-Stämme, und dabei vor allem *Candida albicans*, gehören zum physiologischen gastrointestinalen Mikrobiom. Sie können als Kommensalen auch eine nasale Besiedelung verursachen. Wenn der Patient oder die Patientin jedoch

prädisponierende Risikofaktoren aufweist und durch verschiedene Komorbiditäten einen geschwächten Allgemeinzustand besitzt, kann der sonst harmlose Kommensal zu aggressiven Infektionen führen. [51] Manche *Candida*-Arten neigen dazu sich in einem bestimmten Milieu anzusiedeln. *Candida parapsilosis* tritt beispielsweise vermehrt bei einer erhöhten Glukose-Konzentration auf. [55] Die fungalen Erreger können sich an allen implantierten körperfremden Oberflächen, wie Harnkathetern, Venenverweilkanülen, Herzklappen, Brustimplantaten, Kontaktlinsen und auch an prothetischen Implantaten ansiedeln. *Candida* besitzt zudem das Potential sich hämatogen auszubreiten, multiple Organe zu befallen oder eine systemische Infektion zu verursachen. [43, 46] Protheseninfektionen durch *Candida* können mit einer verlängerten Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation einhergehen und eine Mortalität von bis zu 40 % aufweisen. [54]

*Candida albicans* ist in der Lage einen sehr stabilen Biofilm auszubilden. [9] Durch die Expression von Hyphen können die Pilze untereinander Bindungen eingehen und der Biofilmmatrix so selbst auf glatten Oberflächenstrukturen mehr Stabilität verleihen. Die hartnäckigen Biofilme entstehen durch die vermehrte Expression von Genen für ATP-gebundene Ausströmpumpen, welche bei einem stabilen Biofilm kontinuierlich aktiv sind und Antibiotika ausschleusen sollen. Ebenso kommt es zur Bildung von Pilzzellen, welche aufgrund einer stark verlangsamten Replikation kaum auf Antimykotika ansprechen. Die physikalische Barriere des Biofilms, welche ebenfalls ein Hindernis für ein Ansprechen auf die Therapie darstellt, ist zuvor in Kapitel 1.1 beschrieben worden. [46, 54] *Candida albicans* bildet nachweislich die größten Mengen an EPS-Matrix und formt komplexe Oberflächenstrukturen im Biofilm. Dieser besteht aus einer basalen Schicht aus Blastosporen, auf der es zur Anheftung und Hyphenbildung vom *Candida albicans* kommt. [55]

Auch bei Pilzen kommt es vermehrt zum Auftreten von Resistenzen. Manche *Candida*-Stämme sind beispielsweise resistent gegenüber Fluconazol, Amphotericin B, Nystatin oder Chlorhexidin. Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen dem Stadium des Biofilms und der Prävalenz von Resistenzen. Ein Biofilm im Anfangsstadium spricht besser auf Antimykotika an als ein ausgereifter Biofilm. [42, 74]

## 1.5 Diagnostik

Die frühzeitige Diagnose einer Infektion kann den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen und dem Patienten oder der Patientin viele Komplikationen ersparen. Im klinischen Alltag werden unterschiedliche Diagnoseverfahren angewendet. Die ‚Musculoskeletal Infection Society‘(MSIS), die ‚Infectious Diseases Society of America‘(IDSA) und die ‚European Bone and Joint Infection Society‘(EBJIS) haben Leitlinien entwickelt, durch deren Hilfe nun eine frühere und präzisere Diagnosestellung möglich ist. Von diesen Diagnosekriterien hat sich eine Adaption der EBJIS-Kriterien, die sogenannten ‚proposed‘-EBJIS-Kriterien, als die sensitivste Diagnosemethode bewährt. [13, 15, 26, 27]

Laut diesen ‚proposed‘-EBJIS-Kriterien kann die Diagnose PPI gestellt werden, wenn mindestens eines der folgenden vier Kriterien zutrifft:

- (1) eine Fistel oder eine Eiteransammlung in der Umgebung der Prothese
- (2) eine erhöhte Leukozytenzahl (Anzahl > 2000/ $\mu$ l) oder ein Anteil von über 70 % an Granulozyten im Gelenkspunktat (\*)
- (3) eine auffällige Histopathologie mit einer Entzündungsreaktion im periprothetischen Gewebe (> 23 Granulozyten pro 10 ‚high-power-fields‘ (HPF)) [25]
- (4) ein Erregerwachstum in einer Kultur der synovialen Flüssigkeit, des periprothetischen Gewebes oder aus einer Sonifikationsprobe. [11, 15, 16, 28]

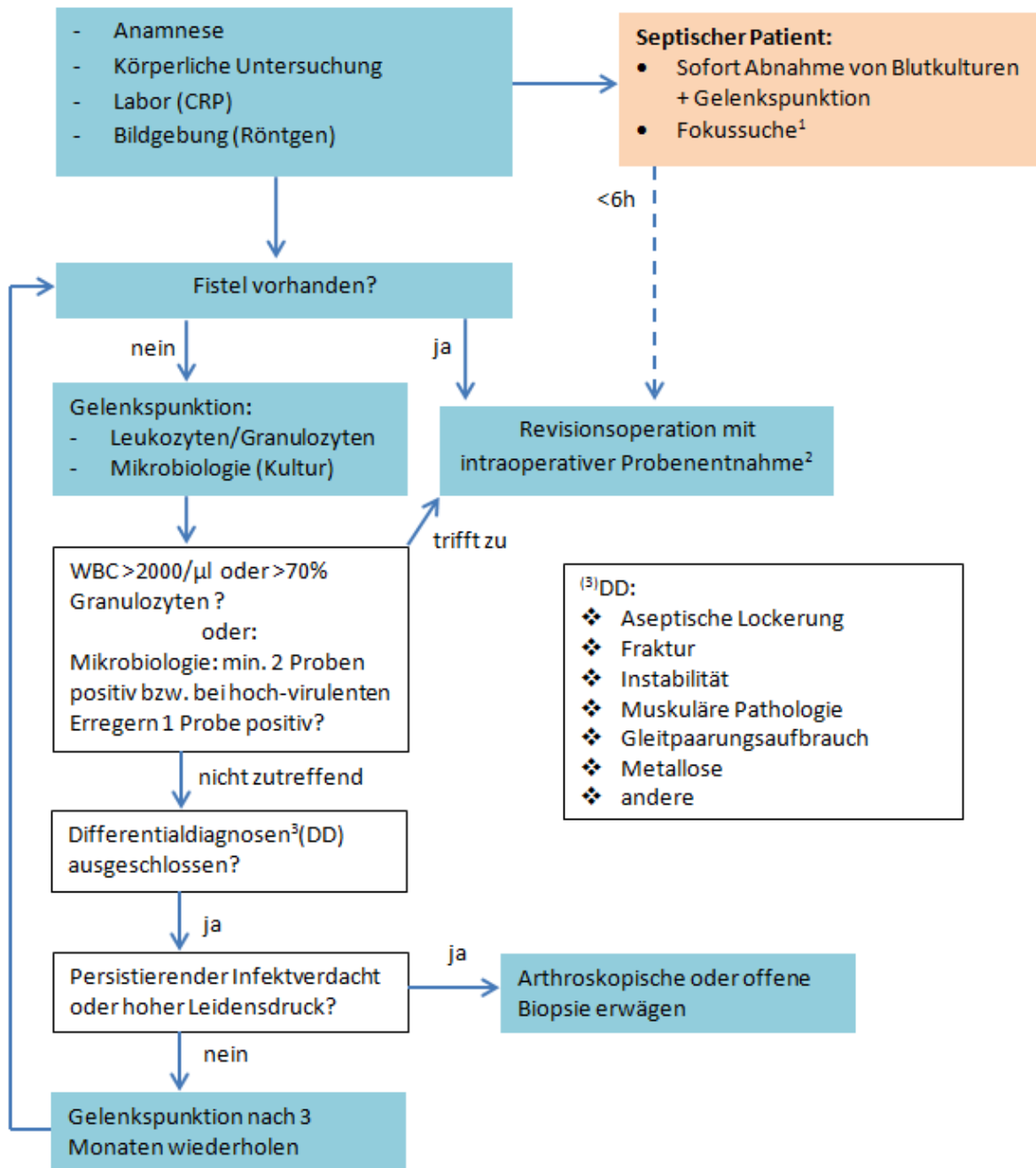
(\*) Die Aussagekraft der Leukozytenanzahl kann durch rheumatische Erkrankungen, bei Gelenkdislokationen oder gelenknahen Frakturen, bei lokalen Entzündungen sowie auch in den ersten 6 Wochen postoperativ eingeschränkt sein. Wenn eine Fistel vorhanden ist, kann die Leukozytenzahl und die Histopathologie durch den ständigen Abfluss der Gelenkflüssigkeit auch vermindert erscheinen. Jedoch kann die Diagnose PPI bereits durch das Vorhandensein einer Fistel oder eines Sinustrakts gestellt werden. [15]

Der Nachteil der ‚proposed‘-EBJIS-Kriterien ist eine eingeschränkte Spezifität, insbesondere weil die Leukozytenanzahl bereits durch diverse andere Ursachen erhöht sein kann. Es kommt zu vermeidbaren antibiotischen Behandlungen und Revisionsoperationen. In solchen Fällen wäre es sinnvoll die falsch positiven Fälle zusätzlich mittels eines Bestätigungstests auszuschließen. Hierfür eignet sich der ‚Alpha Defensin Lateral Flow Test‘ (ADLF-Test) gut da er eine hohe Spezifität besitzt. Es wird das freigesetzte alpha-Defensin in der Synovialflüssigkeit

gemessen, welches durch neutrophile Granulozyten freigesetzt wird sobald sie mit pathogenen Erregern in Kontakt kommen. Eine weitere diagnostische Möglichkeit wäre die Messung der Leukozyten-Esterase. Das Ergebnis dieses Tests kann jedoch durch eine Kontamination mit Blut verfälscht werden. Somit scheint hier der ADLF-Test als Bestätigungstest der Leukozyten-Esterase-Messung überlegen zu sein. [15]

Es existieren offizielle Algorithmen, die jedem Facharzt und jeder Fachärztin eine Empfehlung bezüglich der Diagnosestellung vorgeben. Folgend obliegt es der Erfahrung und der Einschätzung der Fachleute, je nach den vorliegenden Befunden und Beschwerden des Patienten, von diesen teilweise abzuweichen. Der diagnostische Algorithmus nach dem ‚Pocket Guide zur Diagnostik und Behandlung von periprothetischen Infektionen‘ [28] ist in Abbildung 1 auf der folgenden Seite zu sehen.

**Abbildung 1:** Diagnostischer Algorithmus [28] (<sup>1</sup>Vorgehen bei Fokussuche je nach positivem / negativem Ergebnis der Blutkultur; <sup>2</sup>Granulozytenanzahl bzw. -anteil, Histopathologie und Mikrobiologie)



Bei akut auftretenden oder länger anhaltenden Schmerzen im Gelenkbereich nach einer Prothesenoperation besteht der Verdacht auf eine Protheseninfektion. Ebenfalls kann ein mit der Prothese kommunizierender Sinus, eine Wundheilungsstörung sowie klinisch feststellbarer Eiter im periprothetischen Gewebe Grund zur Annahme geben, dass ein lokaler Infekt vorliegen kann.

In einem solchen Fall sind eine ausführliche Anamnese und eine körperliche Untersuchung angebracht. Wichtig dabei ist die Frage nach bestehenden Komorbiditäten oder Risikofaktoren, welche bereits im Kapitel 1.2 beschrieben wurden. [26] Als erste diagnostische Maßnahme sollte Blut abgenommen werden um den CRP-Wert, die Leukozytenanzahl und eventuell zusätzlich das Serum-Procalcitonin zu bestimmen. Als Bildgebung sollte immer ein Röntgenbild des betroffenen Gelenks erstellt werden. Zur genaueren Abklärung kann optional dazu eine Magnetresonanz- oder Computertomographie erstellt werden. Dies ist besonders bei Schulter- oder Hüftgelenken ratsam. [47]

Von dem standardisierten Vorgehen ausgenommen sind septische Patientinnen und Patienten, da bei diesen ein schnelles Handeln von großer Bedeutung ist. Bei diesen Notfallpatienten und -patientinnen sollten umgehend Blutkulturen abgenommen werden und ein Gelenkspunktat durchgeführt werden um daraufhin ohne Verzögerung mit einer Antibiotikatherapie zu beginnen. Die weitere Fokussuche gestaltet sich je nach dem Ergebnis der Blutkulturen. Bei einer positiven Kultur kann man von einem hämatologisch gestreuten Infekt ausgehen und zur Abklärung unter anderem ein transösophageale Echokardiographie, eine Urinanalyse beziehungsweise ein Lungenröntgen durchführen lassen. Wenn die Blutkultur negativ ausfällt, sollten vor allem lokale Infektionen ausgeschlossen werden. [28]

Bei den nicht-septischen Patientinnen und Patienten kann bei der körperlichen Untersuchung bereits auf Flüssigkeits- oder Eiteransammlungen, Fistelbildungen, Schwellungen, Schmerzen und eventuell dadurch verursachte Bewegungseinschränkungen geachtet werden.

Ist eine Fistelbildung vorhanden, so ist eine septische Revisionsoperation die Therapie der Wahl. Intraoperativ sollten Proben aus dem periprothetischen Gewebe entnommen werden um histopathologische und mikrobiologische Untersuchungen durchführen zu können. Eventuell ist auch eine Sonikation der Proben von Vorteil. Die Sonikation weist auch bei bereits erfolgter Antibiotikaeinnahme und somit falsch negativer Mikrobiologie eine hohe Sensitivität auf. Sie kann unter anderem Erreger detektieren, welche sonst aufgrund des Biofilms nicht auffindbar wären. Mittels niederfrequenten Ultraschalles werden Teile des Biofilms gelöst, sodass die Sonikationsflüssigkeit auf pathologische Mikroorganismen untersucht werden kann. Durch den Einsatz

der Sonikation können viele vermeintlich aseptische Prothesenlockerungen als ‚low-grade‘-Infektionen diagnostiziert werden. [48, 49]

Ohne sichtbare Fistelbildung besteht der nächste diagnostische Schritt aus einer Punktion des betroffenen Gelenks inklusive einer Probenentnahme. Finden sich in dieser Probe eine erhöhte Leukozytenzahl ( $> 2000/\mu\text{l}$ ), ein erhöhter Anteil von Granulozyten ( $> 70\%$ ), hoch-virulente Erreger in der Mikrobiologie (wie zum Beispiel *Staph. aureus* oder *E. coli*) oder finden sich zwei niedrig-virulente Erreger (wie zum Beispiel *Staph. epidermidis* oder *Cutibakterium acnes*), so besteht das weitere Vorgehen in einer Revisionsoperation. Bei chronischen Infektionen oder einer bereits erfolgten Antibiotikatherapie ist die präoperative Kultur nicht sehr spezifisch. Wenn keiner der genannten Befunde vorliegt, sollte an weitere mögliche Ursachen für die Beschwerden gedacht werden und alle möglichen Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden. Bei einem dennoch persistierenden Verdacht auf eine Protheseninfektion und einem hohen Leidensdruck des Patienten oder der Patientin kann zur Diagnosesicherung eine arthroskopische oder eine offene Biopsie in Betracht gezogen werden. Ohne bestehenden Leidensdruck oder einen begründeten Verdacht sollte die Gelenkspunktion nach drei Monaten zur Verlaufskontrolle und um eine eventuell bestehende ‚low-grade‘-Infektion detektieren zu können wiederholt werden. Auf diese Art der Infektion wurde zuvor in Kapitel 1.3 näher eingegangen. [12, 13, 28 - 30]

Das genaue Vorgehen zur Diagnosesicherung einer periprothetischen Infektion wird stets vom behandelnden Arzt oder der Ärztin beschlossen. Dieses ist abhängig vom Zustand des Patienten oder der Patientin, vom Profit der diagnostischen Maßnahme im Vergleich zu den Kosten, den möglichen Nebenwirkungen auf den Patienten oder die Patientin sowie vom individuellen Krankheitsverlauf.

## 1.6 Therapie

Beim Auftreten einer periprothetischen Infektion ist eine erfolgreiche Therapie von zahlreichen Einflussfaktoren des Patienten oder der Patientin betreffend abhängig. Dazu zählen unter anderem das Alter, der Allgemeinzustand, vorhandene Komorbiditäten und auch vorhergehende Operationen am betroffenen Gelenk,

welche durch die reduzierte Knochenmasse die Stabilisierung der Prothese erschweren können. [2] Bei der Planung der Therapiemaßnahmen sollte man alle Einflussfaktoren berücksichtigen und die Therapie auf den Patienten oder die Patientin individuell anpassen. Das Ziel der Therapie umfasst die Schmerzfreiheit, die Eradikation der pathogenen Erreger und falls möglich den Erhalt der Prothese oder alternativ einen sterilen Prothesenwechsel.

### **1.6.1 Prothesenerhalt und Débridement**

Bei einer akuten Infektion kann versucht werden die Prothese zu erhalten, wenn folgende vier Kriterien erfüllt sind:

- (1) die Stabilität der Prothese ist vorhanden,
- (2) die umgebenden Weichteile und Knochen zeigen keine Beteiligung mit Fistelgängen oder Abszessen,
- (3) die Symptome dauern nicht länger als drei Wochen an,
- (4) die Erreger sind sensibel auf die Antibiotikatherapie und es handelt sich dabei nicht um Problemerreger. Unter problematischen Erregern versteht man unter anderem Pilze wie *Candida spec.*, Rifampicin-resistente Staphylokokken oder Ciprofloxacin-resistente gramnegative Bakterien. Generell bedeutet eine Resistenz eines Erregers gegenüber ein oder mehreren Antibiotika eine Komplikation im Verlauf einer Protheseninfektion. [27]

Wenn alle oben genannten Kriterien zutreffen, wird ein operatives Débridement des periprothetischen Gewebes durchgeführt, die mobilen Teile werden ersetzt und die festen Anteile der Prothese können im Gelenk belassen werden. Nach der durchgeführten Operation sollte eine zweiwöchige i.v.-Therapie mit Antibiotika durchgeführt werden, auf welche die Erreger ansprechen. Danach folgt eine Erhaltungstherapie von Antibiotika p.o. für eine Dauer von 10 Wochen. [27, 28, 36, 50] Auf die medikamentöse Therapie mit Antibiotika wird in Kapitel 1.6.3 genauer eingegangen. Absolute Kontraindikationen für eine Erhaltung der Prothese sind vorhandene Wundheilungsstörungen, Fistelgänge oder eine Lockerung der Prothese. [27]

## 1.6.2 Ein- oder zweizeitige Revisionsoperation

Bei einer chronischen Infektion mit einer Symptombdauer von mehr als drei Wochen ist ein Wechsel der Prothese das Mittel der Wahl. Man unterscheidet zwischen ein-, zwei- oder dreizeitigem Wechsel der Prothesenteile.

Bei einer ‚low-grade‘-Infektion, also einer chronischen Infektion ohne Problemkeime, kann man einen **einzeitigen Revisionseingriff** durchführen. Die Voraussetzungen dafür sind gut verheiltes Weichteilgewebe und ein gutes Ansprechen der pathogenen Mikroorganismen auf Antibiotika. Sonst besteht das Risiko einer persistierenden Infektion bei hartnäckigen Erregern. Bei der Operation werden alle Teile der Prothese inklusive dem Knochenzement gründlich entfernt. Das nekrotische, umliegende Gewebe wird chirurgisch entfernt. Dann wird eine neue Prothese eingesetzt. Daraufhin folgen zwei Wochen intravenöse und anschließend weitere zehn Wochen orale Antibiotikatherapie. Durch den einzeitigen Wechsel wird den Patienten und Patientinnen der zweite chirurgische Eingriff erspart, wodurch deren Mobilität früher wiederhergestellt wird. Dieser Eingriff wird bevorzugt an Patienten und Patientinnen durchgeführt, welche sich in einer guten körperlichen Verfassung befinden. [28, 36, 50]

Der **zweizeitige Revisionseingriff** ist der Goldstandard bei einer vorliegenden Wundheilungsstörung, bei Abszessen oder Fisteln im umliegenden Gewebe oder bei Vorliegen eines Problemkeims. Bei Problemkeimen, zu welchen auch fungale Erreger zählen, ist diese Therapie indiziert um den Biofilm vollständig zu entfernen. [9, 37, 45, 75] Bei dieser Operation werden die infizierten Prothesenteile und der Knochenzement entfernt. Anschließend wird das Gelenksgebiet intraoperativ gespült und es erfolgt ein lokales Débridement der nekrotischen Wundränder. Bei der zweizeitigen Revisionsoperation kann optional ein ‚Spacer‘ als Platzhalter im Gelenkbereich verwendet werden. Er wird nach der Säuberung des Wundgebietes eingesetzt und verbleibt bis zur Implantation einer neuen Prothese im Gelenk. Durch den Platzhalter wird eine Verschmälerung des Gelenkspalts, welche durch Wundheilungsprozesse entstehen kann, verhindert. [37] Der ‚Spacer‘ besteht aus Polymethylmethacrylat (PMMA)-Knochenzement. Diesem kann laut internationalen Empfehlungen ein Anteil von 10 Vol.-% aus antimikrobiellen Wirkstoffen zugesetzt werden. [28] Die Antibiotika werden je nach Art des Erregers und dessen Resistenztestung auf antimikrobielle Wirkstoffe

ausgewählt. Wie lange der Platzhalter im Gelenk verbleibt hängt vom Zustand des periprothetischen Weichteilgewebes sowie von der Pathogenität der Erreger ab. Bei problematischen Erregern und schlecht heilendem Gewebe wird ein langes Intervall von sechs bis acht Wochen bevorzugt. Bei unproblematischen Erregern und gut verheilendem Wundgewebe wird hingegen ein kurzes Intervall von zwei bis drei Wochen präferiert. Während der zwei Eingriffe ist die Mobilität der Patienten oder Patientinnen eingeschränkt. Eine leichte Beweglichkeit ist dank des ‚Spacers‘ jedoch vorhanden. Nach dem kurzen oder langen Intervall erfolgt der zweite Teil der Revisionsoperation. Nun wird der ‚Spacer‘ operativ entfernt und eine neue Prothese wird steril implantiert. Die Entscheidung ob eine einzeitige oder zweizeitige Revisionsoperation durchgeführt werden soll, obliegt letzten Endes dem behandelnden Facharzt oder der behandelnden Fachärztin. Beide Methoden weisen Vor- und Nachteile auf und die Therapie wird daher individuell an den Patienten oder die Patientin angepasst. Bei fungalen Protheseninfektionen zeigen die Behandlungen mit einem zweizeitigen Wechsel die besten Langzeitergebnisse. [1, 12, 28, 36, 37, 41]

Der verwendete ‚Spacer‘ wirkt sich vorteilhaft auf das Operationsgebiet aus. Er ermöglicht eine kontinuierliche, hochdosierte Abgabe von Antibiotika im Gelenkbereich. Diese lokale Applikation ist vor allem bei hartnäckigen Erregern notwendig, um den Biofilm durchdringen und längere Zeit lokal in einer hohen Dosis einwirken zu können. Zudem zeigen sich weniger Nebenwirkungen im Vergleich zur systemischen Verabreichung von Antibiotika. [12, 42, 53] Besonders bei Pilzinfektionen erweist sich diese lokale Applikation von Antimykotika als vorteilhaft, da *Candida spec.* einen stabilen Biofilm ausbilden und daher lokal hochdosiert behandelt werden sollten. [41]

### **1.6.3 Medikamentöse Therapie**

Zusätzlich zur chirurgischen Therapie erhält der Patient oder die Patientin eine antibiotische Therapie. Ein frühzeitiger Beginn ist hier besonders bei fungalen Infekten von großer Bedeutung, da der Wirkungseintritt von Antimykotika meist verzögert ist. Als empirische Therapie eignet sich bei bakteriellen Infekten laut Renz et al. 2018 die Kombination aus drei Mal 3 g Ampicillin und Sulbactam p.o. täglich. Bei MRSA-Trägern, bei multiplen Operationen in der Anamnese, bei

Sepsis oder falls der Verdacht auf einen ‚low-grade‘-Infekt besteht, kann zusätzlich täglich zwei Mal 1 g Vancomycin i.v. gegeben werden. Bei einer fungalen Infektion ist Fluconazol das Mittel der Wahl. [28] Sobald die mikrobiologischen Kulturen ausgewertet worden sind, passt man die medikamentöse Therapie dementsprechend an. [51] Postoperativ wird die intravenöse Therapie noch für ein bis zwei Wochen so fortgeführt und anschließend auf eine orale Therapie umgestellt. Insgesamt sollte die medikamentöse Antibiotikatherapie ab dem Zeitpunkt des operativen Eingriffs möglichst immer zwölf Wochen betragen. [1, 12, 28, 36]

#### **1.6.4 PMMA-Zement mit lokalen Antimykotika**

Die Einführung der standardmäßigen Verwendung von beigemischten Antibiotika im PMMA-Zement bei Prothesenoperationen ist ein großer Fortschritt zur Vermeidung und zur Therapie von Protheseninfektionen gewesen. Der Knochenzement dient der Verankerung der Prothesenteile im Knochen. Die Beimischung von Antibiotika oder Antimykotika im PMMA-Zement ermöglicht eine kontinuierliche, verzögerte Freisetzung der Wirkstoffe im Gelenkbereich. Durch die Aufnahme von Körperflüssigkeiten quillt der Zement gering auf, wodurch die oberflächennahen Antibiotikapartikel in die Umgebung diffundieren können. [6, 8] Studienergebnisse belegen eine gute Freisetzung der Wirkstoffe in der Umgebung des Knochenzements und eine mit zunehmendem Abstand zum Gelenkbereich proportional abnehmende Dosis in der Umgebung. Die Wirkung und Diffusion der Antibiotika werden beeinflusst durch die Dosierung der additiven Medikamente, die Hydrophilie der PMMA-Zemente sowie die Viskosität und die Porosität des Zements. Eine höhere Dosierung der Medikamente führt in der Regel zu einer höheren Wirkstofffreisetzung am gleichen Zement. Ebenso haben eine erhöhte Hydrophilie, Viskosität und Porosität der Antibiotika oder Antimykotika eine bessere Freisetzung aus dem Knochenzement zur Folge. [8, 77]

Knochenzemente mit Antibiotikabeimischung gelten als Medizinprodukte der Klasse III. Ein Beispiel hierfür ist der Goldstandard *Palacos® R*. Dieser seit über 60 Jahren im Markt befindliche PMMA-Zement wird mit Gentamicinzusatz, in Kombinationen von Gentamicin und Clindamycin sowie Gentamicin und Vancomycin angeboten. Da jedoch zurzeit noch keine Knochenzemente mit

additiven Antimykotika als Medizinprodukte zugelassen sind, müssen diese im Operationssaal manuell dem Knochenzementpulver beigemischt werden. Man kann sich dabei auf bereits bestehende Empfehlungen bezüglich der Dosierung und der Auswahl der antimykotischen Medikamente beziehen. [1, 8] Bei der manuellen Beimischung ist zu beachten, dass eine zu hohe Dosierung des Medikaments negative Auswirkungen auf die mechanische Stabilität des Zements haben kann. Fügt man mehr als die empfohlenen 10 Vol.-% an Wirkstoff hinzu, können dabei Biege-, Druck- oder Schlagfestigkeit negativ beeinflusst werden. Es besteht auch die Option die Antimykotika mit dem PMMA-Zement zu einem sogenannten ‚Spacer‘ zu formen (siehe hierzu Kapitel 1.6.2). In diesem Fall können höhere Dosierungen verwendet werden, da die Stabilität zugunsten der antimikrobiellen Eradikation vernachlässigt werden kann. [12]

Bei fungalen Protheseninfektionen existieren kontroverse Daten bezüglich der Beimischung von Antimykotikum zu PMMA-Zement. Die beigemischten Antimykotika müssen bei Temperaturen bis zu 90°C hitzestabil sein. Zudem sollten sie eine ausreichende Hydrophilie besitzen, die es dem Wirkstoff ermöglicht aus dem Knochenzement zu diffundieren. Jedoch sollte durch diese Eigenschaft nicht der gesamte Wirkstoff bereits innerhalb einer kurzen Zeitspanne abgegeben werden. Optimalerweise ist eine suffiziente Freisetzung über sechs Wochen vorhanden. [37] Die ‚Pro-implant Foundation‘ empfiehlt bei einer fungalen Protheseninfektion *Palacos® R+G* zu verwenden, der zu den beigefügten Antimykotika zusätzlich das Antibiotikum Gentamicin enthält. So kann das Antibiotikum im Knochenzement bakterielle Infektionen verhindern, welche einer fungalen Infektion oft vorausgehen. Zudem besitzt das enthaltene Gentamicin laut Czuban et al. 2019 den Vorteil, dass es im Knochenzement eine poragene Wirkung besitzt und die Freisetzung von den Antimykotika dadurch erleichtert. [77] Diesem PMMA-Zement sollte zusätzlich liposomales Amphotericin B oder alternativ Voriconazol manuell beigemischt werden. [28]

#### **1.6.4.1 Amphotericin B**

Amphotericin B eignet sich gut als lokales Antimykotikum im PMMA-Zement. Es ist bis 170°C hitzestabil, wirkt fungizid gegen ein breites Spektrum an fungalen Erregern und es ist als steriles Pulver verfügbar. [12, 62, 73] Eine Übersicht der Literatur zur lokalen Freisetzung von Amphotericin B aus dem PMMA-Zement ist

in der folgenden Tabelle 2 ersichtlich. Dabei wurde Amphotericin B, falls nicht anders angegeben, zu 40 g PMMA-Zement beigemischt. Laut Marra et al. 2001 kann im PMMA-Zement beigemischt Amphotericin B in aktiver Form in der Wundflüssigkeit von Patienten oder Patientinnen nachgewiesen werden. [64] Ein Nachteil von nicht-liposomalem Amphotericin B, auch Amphotericin-B-Desoxycholat (ABD) genannt, sind seine hydrophoben Eigenschaften. Dadurch neigt diese Variante dazu chemische Bindungen mit PMMA einzugehen und kann folglich nur schwer aus dem Knochenzement diffundieren. [10, 62] Um dennoch eine gute Freisetzung zu erzielen, werden in der Regel hohe Dosierungen von Amphotericin-B-Desoxycholat eingesetzt. [61, 63, 77] Im Vergleich dazu zeigt das liposomale Amphotericin B (LAB) eine bessere Wirkstoffelution. [60] Durch das liposomale Amphotericin B entsteht ein Poragen-Effekt im PMMA-Knochenzement. Der Wirkstoff kann sich somit leichter vom Zement lösen. [60] Durch das Beimischen von poragenen Stoffen kann eine erhöhte Porosität des Knochenzements bewirkt werden, welche die Wirkstoffe leichter diffundieren lässt. Jedoch reduziert sich mit zunehmender Porosität die mechanische Stabilität des Knochenzements. [10, 60, 77] Eine zunehmende Druckfestigkeit konnte laut Goss et al. 2007 bei der Zumischung von hohen Dosen Amphotericin-B-Desoxycholat beobachtet werden. [62] Dies unterstützt die Hypothese, dass es zwischen Amphotericin-B-Desoxycholat und PMMA zu chemischen Verbindungen kommt und somit eine kompaktere Zementstruktur entsteht. [62] Bei der Zumischung von liposomalen Amphotericin B hingegen reduziert sich die Druckfestigkeit mit steigender Dosierung. [60] Die lokale Verwendung von N-Methyl-D-Glucamin-Amphotericin-B (MAB) führte laut Czuban et al. 2019 [79] ebenfalls zu einer besseren Wirkstofffreisetzung. Diese konnte zudem durch die Beimischung von Gentamicin als Poragen signifikant verbessert werden.

**Tabelle 2:** Amphotericin B Literatur

Literatur	Amphotericin B	Ergebnisse	Freisetzung [%]
Marra et al. 2001 [64]	- ca. 0,175 g ABD	Freigesetztes ABD in Wundflüssigkeit (in vivo)	k.R.
Goss et al. 2007 [62]	zu je 60 g PMMA: - 0,025 g ABD - 0,05 g ABD - 0,1 g ABD - 0,2 g ABD	Keine ausreichende Freisetzung von ABD	- 0,03 - 0,01 - 0,007 - 0,003
Kweon et al. 2011 [10]	- 0,2 g ABD - 0,2 g ABD +10 g Cefazolin (Poragen)	Höhere Freisetzung mit additivem Poragen	- 0,5 - 0,04
Cunningham et al. 2012 [60]	- 0,2 g LAB - 0,8 g LAB - 0,8 g ABD	Freisetzung von LAB besser als von ABD	k.R.
Deelstra et al. 2013 [63]	0,5 g Gentamicin + 1 g Vancomycin + 1 g Voriconazol + 0,25 g ABD	Gute Freisetzung von ABD	k.R.
Houdek et al. 2015 [61]	zu 20 g PMMA: - 1,5 g ABD	Gute Freisetzung von ABD bei 7,5 Vol.-% Dosierung	- 0,2
Wu et al. 2010 [80]	- 1,2 g ABD	Gute Hemmwirkung bei Cand.-albicans-PPI	k.R.

Die systemische Gabe vom nicht liposomalen Amphotericin B kann unerwünschte Nebenwirkungen verursachen wie akute Impfreaktionen, Übelkeit, akutes Nierenversagen, Hypotension, Anämie, Hypokaliämie, Leukopenie oder Thrombopenie. Die maximal empfohlene Tagesdosis beträgt 1,5 mg/kg. [65, 75] Marra et al. 2001 beschreibt keine derartigen Nebenwirkungen bei der lokalen Applikation von hochdosiertem Amphotericin-B-Desoxycholat. [64] Im Gegensatz dazu wurde laut Harmsen et al. 2011 in einem Mäuse-Versuch eine hohe lokale Zytotoxizität beschrieben. [66] Es kam dabei vorrangig zum Zelluntergang von Osteoblasten und Fibroblasten. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Antimykotikum durch zytotoxische Effekte lokale Wundheilungsstörungen verursacht. [66] Liposomales Amphotericin B führt bei systemischer Verabreichung weniger häufig zu Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität und ist dem

Amphotericin-B-Desoxycholat hier somit überlegen. [65, 67, 68, 75, 79] Auch bei der lokalen Applikation von der liposomalen Variante kann eine geringere Toxizität gegenüber Fibroblasten und Osteoblasten beobachtet werden. [65]

#### **1.6.4.2 Voriconazol**

Voriconazol wird ebenfalls als lokales Antimykotikum eingesetzt. Es ist als steriles Pulver verfügbar und gegen ein breites Spektrum an Pilzen wirksam. Bei Voriconazol sind hohe Dosierungen erforderlich um den Biofilm wirksam zu bekämpfen. [56] Durch den großen Anteil an Zusatzstoffen wie Cyclodextrin befindet sich die Dosierung über den empfohlenen 10 Vol.-% der Zementmasse. Dadurch erhöht sich die Porosität des PMMAs und die mechanische Stabilität wird vermindert. [56] Laut Rouse et al. 2010 wird Voriconazol auch ohne Zusatzstoffe gut freigesetzt. [71] In der genannten Studie wurde hochkonzentriertes Voriconazol mit nur 2 Vol.-% Zusatzstoffen verwendet. Einen Überblick über die Literatur bezüglich der Freisetzung Voriconazol aus dem PMMA-Zement bietet Tabelle 3 auf der nachfolgenden Seite. Voriconazol besitzt im Vergleich zum Amphotericin B weniger Nebenwirkungen, unter anderem eine geringere Nephrotoxizität. [12, 47] Zudem weist es eine weit geringere lokale Toxizität auf laut den experimentellen Versuchen an Mäusen von Rouse et al. 2010. [71]

**Tabelle 3:** Voriconazol Literatur

Literatur	Voriconazol	Ergebnisse	Freisetzung [%]
Rouse et al. 2010 [71]	zu 2 g PMMA: - 0,153 g	Gute Freisetzung von Voriconazol	- ca. 5,6
Grimsrud et al. 2011 [70]	zu 10 g PMMA: 0,2 g (+3,2 g Zusatzstoffe)	Aktives Voriconazol freigesetzt	k.R.
Miller et al. 2012 [56]	zu 40 g PMMA: - 0,3 g - 0,6 g	Bei Dosierungen über 10 Vol.-% zeigt sich eine gute Freisetzung	- 57 - 63
Deelstra et al. 2013 [63]	0,5 g Gentamicin + 1 g Vancomycin + 0,25 g ABD + 1 g Voriconazol	Gute Freisetzung von Voriconazol	k.R.

## 2 Material und Methoden

In diesem Kapitel wird beschrieben wie Prüfkörper mit additiven Antimykotika aus Polymethylmethacrylat (PMMA) manuell hergestellt wurden. Diese wurden anschließend in ISO-Druckfestigkeits-, ISO-Biegefestigkeits- und DIN-Schlagzähigkeitstests auf ihre mechanische Stabilität getestet. Zudem wurde ihre hemmende Wirkung in mikrobiologischen Hemmhofstests gegen *Candida albicans* und *Candida glabrata* gemessen.

### 2.1 PMMA-Knochenzemente

Das Polymethylmethacrylat, auch Acryl- oder Plexiglas genannt, ist ein thermoplastischer Kunststoff. PMMA Knochenzement besteht aus zwei Komponenten, einem Pulver (Polymer) und einer Flüssigkeit (Monomer). Beide Komponenten wurden im Rahmen der Diplomarbeit in einem Anmischgefäß oder in einem Mischsystem zusammen gebracht wodurch Polymerisation gestartet wurde. Dabei entstand zunächst eine plastische Masse. Bei *Palacos® R* wurden 20 ml flüssiges Monomer (Abbildung 2) mit 40 g Polymerpulver vermischt.

**Abbildung 2:** Flüssiges Monomer



Im PMMA sind weitere Additive wie das Röntgenkontrastmittel Zirkondioxid enthalten. Chlorophyll (E141) ist ein weiterer Zusatzstoff und dient zur Einfärbung des Zements. Für diese Studie wurden jeweils 40 g Packungen hochviskose und röntgendichte Knochenzemente der Heraeus Medical GmbH verwendet. Neben antibiotikafreien Knochenzementen wie *Palacos® R* existieren weitere Knochenzemente mit bereits beigemischten Antibiotika. Dazu zählt *Palacos® R+G* mit 0,5 g Gentamicinsulfat und *Copal® G+C* mit jeweils 1 g Gentamicinsulfat

sowie 1 g Clindamycinhydrochlorid. Die verschiedenen Zementpackungen sind in der nachfolgenden Abbildung 3 ersichtlich.

**Abbildung 3:** PMMA-Pulver: *Palacos® R*, *Palacos® R+G*, *Copal® G+C*



## 2.2 Additive Antimykotika

Im Gegensatz zu bakteriellen Protheseninfektionen ist die Inzidenz fungaler Infekte sehr gering. [9] Aus diesem Grund sind Knochenzemente mit additiven Antimykotika bislang nicht kommerziell als Medizinprodukte erhältlich. Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden daher dem Polymerpulver, wie auch im Operationssaal praktiziert, manuell Antimykotika beigemischt. Als lokale Antimykotika wurden die in Kapitel 1.6.4 beschriebenen Medikamente Amphotericin B (nicht-liposomal), Amphotericin B (liposomal) und Voriconazol verwendet.

### 2.2.1 Nicht-liposomales Amphotericin B (NLAB)

Das verwendete orange nicht-liposomale Amphotericin B (Abbildung 4) besitzt eine Wirkstoffmenge von 86 Vol.-%. Der restliche Anteil setzt sich aus Zusatzstoffen zusammen. Das verwendete Antimykotikum wurde von 'Heraeus Medical GmbH' aus China erworben, daher zeigte es sich als unmöglich die genaue Zusammensetzung sowie den Hersteller ausfindig zu machen.

#### Abbildung 4: Nicht-liposomales Amphotericin B (NLAB)



### 2.2.2 Liposomales Amphotericin B

Als liposomales Amphotericin B wurde das Produkt *AmBisome*® der Pharmafirma Gilead Sciences Inc. verwendet (s. Abbildung 5). Ein Fläschchen des Medikaments enthält 1,33 g gelbes Pulver, wovon 0,05 g Wirkstoff sind. Der restliche Anteil setzt sich laut Beipackzettel aus Zusatzstoffen wie hydriertem (Phosphatidyl)-Cholin, Cholesterol, Distearoylphosphatidylglycerol,  $\alpha$ -Tocopherol, Sucrose, Natriumsuccinat, Natriumhydroxid und Salzsäure zusammen.

#### Abbildung 5: Liposomales Amphotericin B (*AmBisome*®)



### 2.2.3 Voriconazol

Als drittes Antimykotikum wurde *Voriconazol*® der Firma 'Xellia Pharmaceuticals ApS' verwendet (Abbildung 6). Jedes Fläschchen enthält 3,5 g weißes Pulver, wovon der Wirkstoff nur 0,2 g beträgt. Der restliche Anteil besteht hier aus Zusatzstoffen wie Hydroxypropylbetadex (HPBCD). Durch diese erhält das Pulver seine stärkeähnliche Konsistenz.

Abbildung 6: Voriconazol®



## 2.3 Dosierungen

Bei der Herstellung der PMMA-Prüfkörper wurden für mechanische Stabilitätstests sowie für mikrobiologische Hemmhoftests verschiedene Dosierungen der Antimykotika verwendet.

### 2.3.1 Dosierungen für die mechanischen Stabilitätstests

Die Dosierungen der drei Antimykotika sind in Tabelle 4 auf der nächsten Seite dargestellt. Dabei ist der Anteil des Wirkstoffs in Klammer mit angegeben. Auffallend ist, dass der Wirkstoffanteil bei *AmBisome*® und bei *Voriconazol*®, wie in Kapitel 2.2.2 und Kapitel 2.2.3 bereits beschrieben, sehr gering ist.

**Tabelle 4:** Dosierungen für die Stabilitätstests

PMMA-Zemente	NLAB	AmBisome®	Voriconazol®
<i>Palacos® R</i>	+0,2 g (0,17 g)	-	-
	+0,8 g (0,69 g)	0,8 g (0,02 g)	-
<i>Palacos® R+G</i>	+0,2 g (0,17 g)	-	-
	+0,8 g (0,69 g)	+0,8 g (0,02 g)	-
	+2,66 g (2,29 g)	+2,66 g (0,1 g)	-
	-	-	+3,5 g (0,2 g)
	-	-	+10,5 g (0,6 g)
<i>Copal® G+C</i>	+1,33 g (1,14 g)	-	-

### 2.3.2 Dosierungen für die mikrobiologischen Hemmhoftests

Die Dosierungen der drei Antimykotika für die mikrobiologischen Tests sind in Tabelle 5 auf der folgenden Seite dargestellt. Auch hier ist der Anteil des Wirkstoffs in Klammer mit angegeben. Für *Palacos® R* und *Palacos® R+G* wurden im Vergleich zu den mechanischen Tests mehr Dosierungen verwendet.

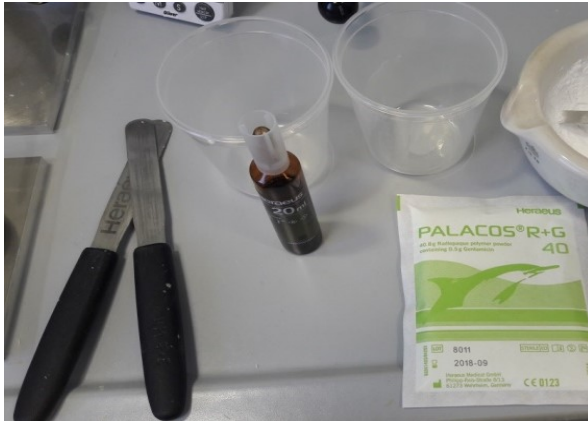
**Tabelle 5:** Dosierungen für die mikrobiologischen Tests

<b>PMMA-Zemente</b>	<b>NLAB</b>	<b>AmBisome®</b>	<b>Voriconazol®</b>
<i>Palacos® R</i>	+0,2 g (0,17 g)	-	-
	+0,8 g (0,69 g)	+0,8 g (0,02 g)	-
	+1,33 g (1,14 g)	-	-
	+2,66 g (2,29 g)	-	-
<i>Palacos® R+G</i>	+0,2 g (0,17 g)	-	-
	+0,8 g (0,69 g)	+0,8 g (0,02 g)	-
	+1,33 g (1,14 g)	+1,33 g (0,05 g)	-
	+2,66 g (2,29 g)	+2,66 g (0,1 g)	-
	-	-	+3,5 g (0,2 g)
	-	-	+10,5 g (0,6 g)
<i>Copal® G+C</i>	+1,33 g (1,14 g)	-	-

## 2.4 Herstellung der PMMA-Prüfkörper

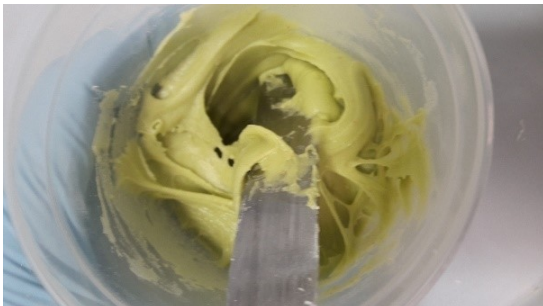
Nachdem die Zusammensetzung der PMMA-Prüfkörper in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde, soll nun genauer auf die manuelle Herstellung dieser eingegangen werden. Bei der Herstellung wurden die Medikamente dem Knochenzement möglichst homogen beigemischt. Um dies zu erreichen wurden grobkörnige Wirkstoffbestandteile vorab mithilfe eines Mörsers zu einer homogenen Masse zerkleinert. Abbildung 7 zeigt die Materialien und Werkzeuge, die für die Anmischung benötigt wurden. Dabei handelte es sich jeweils um 20 ml flüssiges Monomer, 40 g trockenes PMMA-Pulver, Metallspatel und Becher.

**Abbildung 7:** Material und Werkzeuge für PMMA-Herstellung



Zunächst entstand ein plastischer Teig, welcher später aushärtete. Zur Kontrolle wurde mit einer Stoppuhr gearbeitet, um die Herstellerangaben exakt einhalten zu können. Die beiden Zementkomponenten wurden für ca. 30 Sekunden vermischt bis ein niedrigviskoser, klebriger Zementteig entstand (Abbildung 8).

**Abbildung 8:** Zementteig beim Herstellungsprozess



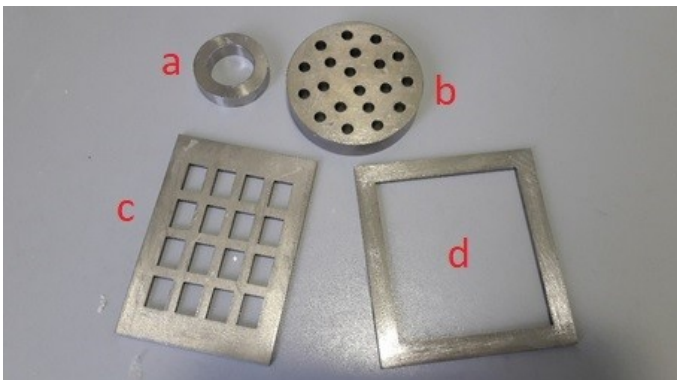
Anschließend wurde der Zementteig zur Bestimmung der Klebefreiheit alle fünf Sekunden nach dem „*doctor-fingers-test*“ untersucht. Sobald der Zementteig dabei oberflächlich klebefrei erschien, konnte er zwischen den Händen gerollt werden. Nach insgesamt 90 Sekunden wurde der Zementteig in verschiedene ISO- und DIN-konforme Metallformen gegeben und mit Hilfe einer hydraulischen Presse (Firma Wassermann, Abbildung 9) in die gewünschten Formen gepresst. Dieser Vorgang dauerte 30 Minuten und wurde bei einem Druck von 3 bar und Umgebungstemperatur durchgeführt.

**Abbildung 9:** Hydraulische Pressen



Anschließend wurden die Metallformen aus der Presse entnommen und die Prüfkörper daraus entnommen. Einige der Prüfkörper mussten für das Erreichen ihrer endgültigen Form noch mithilfe eines Lasers der Firma 'zing' nachbearbeitet werden. Insgesamt wurden vier verschiedene Arten von Prüfkörpern hergestellt. Die dafür verwendeten Metallformen sind in Abbildung 10 ersichtlich.

**Abbildung 10:** Metallformen für die PMMA-Prüfkörper



Die Metallformen dienen der Herstellung von Prüfkörpern für die mikrobiologischen Testungen (a), Druckfestigkeitstests (b), Dynstat-Schlagzähigkeitstests (c) sowie Biegefestigkeitstests (d). Die Maße der zylindrischen Prüfzylinder für die mikrobiologischen Tests betragen 25 mm im Durchmesser und 10 mm in der Höhe (Abbildung 11).

**Abbildung 11:** Mikrobiologische PMMA-Prüfkörper mit 0,2 g *NLAB*



Die Metallformen der PMMA-Prüfkörper für die Dynstat-Schlagzähigkeitstests, Biegeprüfungen und für die Druckfestigkeitstests sind in der Abbildung 12 abgebildet. ISO-Druckfestigkeitsprüfkörper (a) wiesen 6 mm im Durchmesser und 12 mm in der Höhe auf. Die Prüfkörper für die DIN-Schlagzähigkeitsprüfung (b) waren mit 3x10x15 mm bemaßt und die ISO-Biegefestigkeitsprüfkörper (c) mit 3x75x10 mm.

**Abbildung 12:** Mechanische PMMA-Prüfkörper



## 2.5 Optische Auffälligkeiten bei der Herstellung

Durch die Beimischung der drei Antimykotika kam es zu optischen Veränderungen des PMMA-Zements. Ein Beispiel bildet die Verfärbung des Knochenzements bei der Beimischung von *NLAB*. Die ursprüngliche grüne Farbe von *Palacos® R*, *Palacos® R+G* und *Copal® G+C* wurde hier bei steigender Dosierung zunehmend grün-orange (Abbildung 13) bis hin zu dunkelorange (Abbildung 14).

**Abbildung 13:** PMMA-Prüfzylinder mit 0,2 g NLAB

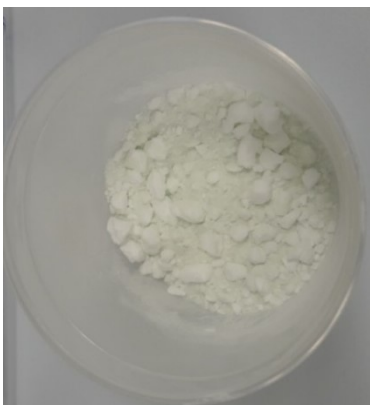


**Abbildung 14:** PMMA-Prüfzylinder mit 2,66 g NLAB

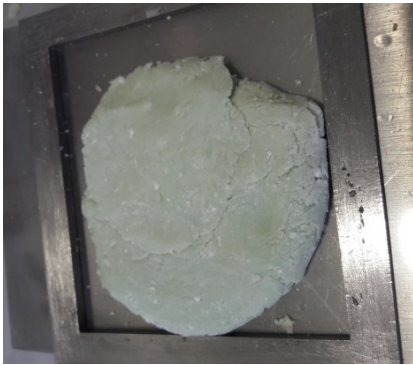


Eine weitere Rolle bei der Herstellung der PMMA-Prüfkörper spielte die veränderte Homogenität des PMMA-Zements bei der Zumischung von *Voriconazol*®. Trotz des Versuchs das grobkörnige Pulver (Abbildung 15) vor der Verarbeitung mithilfe eines Mörsers zu zerkleinern, war der Zement durch den hohen Stärkeanteil des *Voriconazols* merklich in seiner Konsistenz beeinflusst. Der PMMA-Zement zeigte sich dadurch beim Herstellungsvorgang sehr trocken und kaum homogen gebunden. (Abbildung 16) Aus diesem Grund neigte er dazu zu zerfallen und es waren mehrere Versuche nötig um ihn in die gewünschte Form zu bringen.

**Abbildung 15:** PMMA-Zement mit 10,5 g *Voriconazol*®



**Abbildung 16:** PMMA-Zementteig mit 10,5 g *Voriconazol*®



In den fertig gepressten Prüfkörper zeigten sich trotz der vorherigen Bearbeitung des Wirkstoffpulvers mit dem Mörser makroskopisch sichtbare Wirkstoffbestandteile. (Abbildung 17) Es kam hier vermehrt zum Auftreten von Defekten wie ausgebrochenen Randteilen oder Einrissen in den Prüfkörpern und dies trotz vorheriger manueller Bearbeitung mit dem Mörser.

**Abbildung 17:** PMMA-Prüfzylinder mit 10,5 g *Voriconazol*®



## 2.6 Mechanische Stabilitätstests

Nach erfolgter Herstellung der PMMA-Prüfkörper wurden diese nun auf ihre mechanische Stabilität getestet. Dabei kamen verschiedene Dosierungen, wie zuvor in Kapitel 2.3.1 beschrieben, zum Einsatz. Die Prüfungen wurden bei Umgebungstemperatur durchgeführt.

### 2.6.1 Druckfestigkeitsprüfung nach ISO 5833:2002

Die Druckfestigkeitsprüfung wurde nach der ISO-Norm 5833:2002 an einer Prüfmaschine der Firma 'Zwick Roell' durchgeführt. [78] Mit dieser Prüfung sollte bestimmt werden ab welcher Druckbelastung die verschiedenen Zementkörper ihre Stabilität verlieren und zerbrechen. Hierfür wurde jeder zylindrische Prüfkörper zunächst mit Hilfe einer elektrischen Schieblehre der Firma Mitutoyo® (Abbildung 13) vermessen. Die Messwerte wurden dabei automatisch in eine Software übertragen. Nachdem der Prüfkörper vertikal in die Maschine eingespannt worden ist (Abbildung 14), wurde die mechanische Prüfung gestartet. Dabei übte die Maschine einen axialen Druck auf den Prüfkörper aus, der stetig erhöht wurde bis der Zementkörper zerbrach. Der zum Zeitpunkt des Zerbrechens anliegende Druck beschreibt dabei die maximale Druckfestigkeit des Prüfkörpers und bewirkte hier gleichzeitig das Ende der Prüfung. Diese Messung wurde für je zehn Prüfkörper jeder Dosierung durchgeführt.

**Abbildung 13:** Elektrische Schieblehre



**Abbildung 14:** Druckfestigkeitsprüfung nach ISO 5833



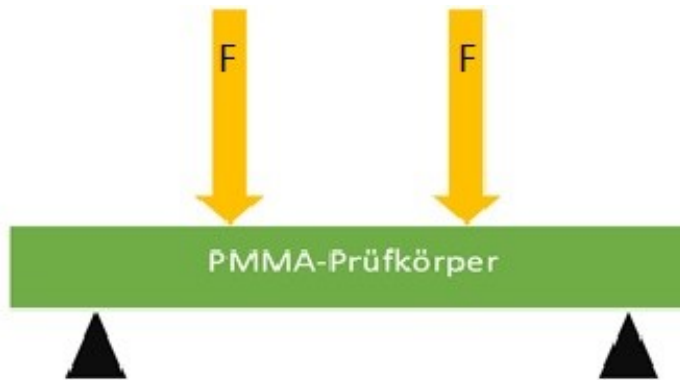
### **2.6.2 Biegefestigkeitsprüfung und Biegemodul nach ISO 5833**

Die Biegefestigkeitsprüfung wurde ebenfalls nach der ISO-Norm 5833:2002 an einer Prüfmaschine der Firma 'Zwick Roell' (Abbildung 15) durchgeführt. [78] Es wurden dabei je sechs Prüfkörper jeder Dosierung mit Hilfe der elektronischen Schiebelehre vermessen. Jeder Prüfkörper wurde anschließend in die Maschinenvorrichtung so positioniert, dass er an zwei Punkten auflag. Nun wurde von oben an zwei weiteren Punkten ein kontinuierlich ansteigender Druck auf den Prüfkörper ausgeübt (Abbildung 16). Es handelte sich hierbei um eine 4-Punkt-Biegefestigkeitsprüfung. Auch diese Prüfung wurde automatisch beendet sobald der Prüfkörper zerstört wurde. Die maximale Biegefestigkeit ist hier definiert als der angewendete Druck, der für den Bruch des Zementkörpers durch Verformung erforderlich ist. Aus diesem Wert wurde zusätzlich das Biegemodul automatisch berechnet.

**Abbildung 15:** Biegefestigkeitsprüfung nach ISO 5833



**Abbildung 16:** Graphische Darstellung der 4-Punkt-Biegefestigkeitsprüfung



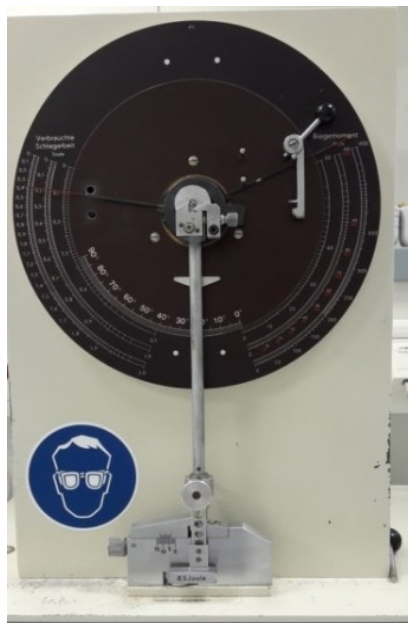
### 2.6.3 Dynstat-Schlagzähigkeit nach DIN 53435:1983

Der Schlagzähigkeitstest wurde nach der DIN 53435 (1983) Spezifikation durchgeführt. Je acht Prüfkörper pro Dosierung wurden mit der elektronischen Schiebelehre gemessen. Dabei wurden die Prüfkörper auf Bruchspuren oder optische Auffälligkeiten untersucht. Der jeweilige Prüfkörper wurde in die vorgesehene Position gebracht (Abbildung 17) und anschließend wurde ein Pendelkörper aus seiner Startposition gelöst (Abbildung 18). Dieser traf mit einer Energie von 0,5 J auf den Prüfkörper auf. Nach dem Aufprall konnte man die für den Bruch des Prüfkörpers aufgebrachte Schlagenergie  $A_n$  in Joule am Gerät ablesen.

**Abbildung 17:** DIN-Schlagzähigkeitsprüfung - Startposition



**Abbildung 18:** DIN-Schlagzähigkeitsprüfung - Endposition



Aus der Schlagenergie wurde anschließend die Schlagzähigkeit ( $a_n$ ) mittels folgender Formel berechnet:

$$a_n = 1000 * \frac{A_n}{b * h}$$

In dieser Formel steht b für die gemessene Breite und h für die gemessene Dicke der Prüfkörper in mm. Die Schlagzähigkeit wird in kJ/m<sup>2</sup> angegeben.

## 2.7 Mikrobiologische Hemmhoftests

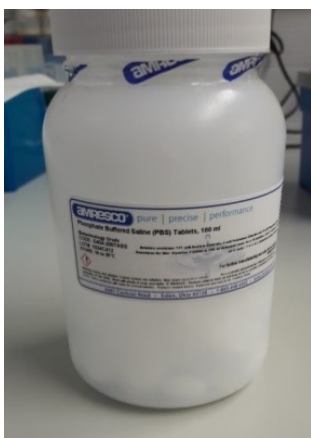
Es wurden mikrobiologische Hemmhoftests durchgeführt um die Wirksamkeit der Antimykotika in den PMMA-Prüfkörpern zu bestimmen. Dabei wurden je drei Prüfkörper pro Dosierung in-vitro in einer Pufferlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den vorgegebenen Messzeitpunkten wurde ein Teil dieser Lösung, hier als Eluat bezeichnet, entnommen und auf zuvor angezüchtete Pilzkolonien auf Agarplatten aufgetragen. Diese wurden dann bei 37°C für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen Hemmhöfe gemessen.

### 2.7.1 Vorbereitung

Für die kulturelle Anzucht von Candida-Spezies eignen sich Müller-Hinton-Agar (+2 % Glukose) sowie Sabouraud-Dextrose-Agar. [57 - 59] In einem ersten Prüfdurchgang sind keine signifikanten Wachstumsunterschiede der Candida-Spezies zwischen den beiden Agarplatten festgestellt worden und daher fiel die Entscheidung aus Kostengründen auf die Sabouraud-Dextrose-Agarplatten.

Als Vorbereitung auf die mikrobiologischen Tests wurde zunächst die zuvor beschriebene Pufferlösung hergestellt. Diese bestand aus ‚Phosphate-Buffered-Saline‘(PBS)-Tabletten der Pharmafirma 'amresco Inc.' (Abbildung 19), welche in Wasser aufgelöst wurden. (Abbildung 20)

**Abbildung 19:** Phosphate-Buffered-Saline Tablets



**Abbildung 20:** PBS-Puffer



Zeitgleich wurden Sabouraud-Dextrose-Agarplatten hergestellt und die Testkeime *Candida albicans* und *Candida glabrata* auf diesen angezüchtet. Die Pilzkolonien wurden bei 37°C gelagert.

### **2.7.2 Durchführung**

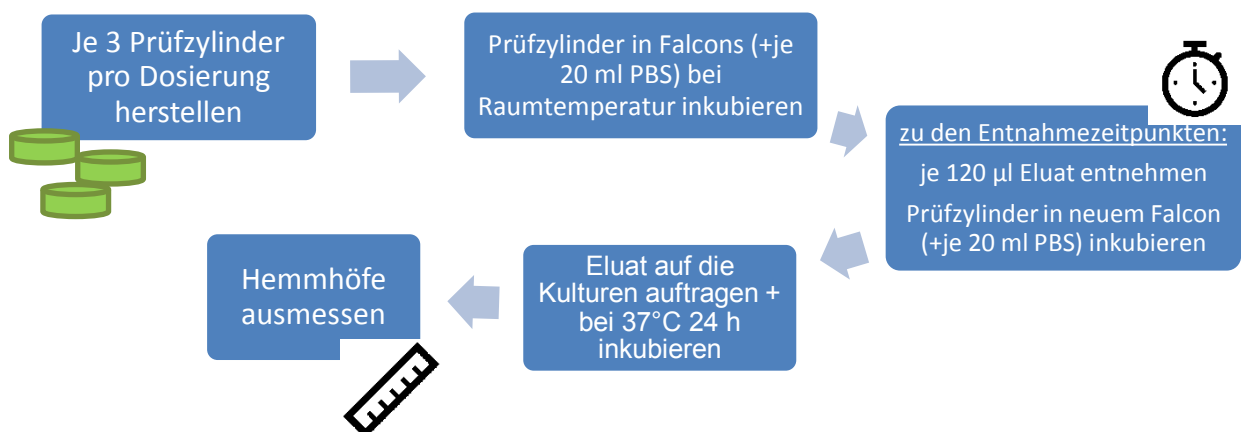
Die PMMA-Prüfkörper wurden gemeinsam mit jeweils 20 ml PBS-Puffer in den Falcon®-Tuben bei Raumtemperatur inkubiert. (Abbildung 21) Für die Durchführung der mikrobiologischen Tests sind Messzeitpunkte definiert worden, zu denen die Prüfkörper aus den Falcon®-Tuben entnommen wurden. Diese Messzeitpunkte wurden auf eine Stunde, einen Tag, 7 Tage, 15 Tage, 28 Tage und 42 Tage festgelegt. Zu den eben genannten Entnahmezeitpunkten wurden die Prüfkörper mit einer Pinzette aus den Falcon®-Tuben entnommen und erneut mit 20 ml frischem PBS-Puffer in den Tuben inkubiert. Von dem benutzten PBS-Puffer wurden dann aus jeder Falcon®-Tube 120 µl Puffer (Eluat) in kleine Epruvetten pipettiert und aus Kapazitätsgründen des Labors bei -20°C für eine kurze Zeitperiode zwischengelagert. Der restliche PBS-Puffer wurde verworfen.

**Abbildung 21:** Falcon®-Tube mit PMMA-Prüfkörper in PBS-Puffer



Anschließend wurden aus jeder Eprovette je 60 µl Eluat pro Candida-Spezies auf die Sabouraud-Dextrose-Agarplatten aufgetragen. Die Agarplatten sind zuvor optisch in drei Bereiche mit Stanzlöchern geteilt worden. Nun wurden diese Agarplatten für 24 h bei 37°C inkubiert und danach die entstandenen Hemmhöfe gemessen und dokumentiert. Ist bei einer Probe zu zwei aufeinanderfolgenden Entnahmezeitpunkten kein Hemmhof gemessen worden, so wurden bei dieser Probe keine weiteren Messungen mehr durchgeführt. Eine schematische Darstellung des Vorgangs zeigt Abbildung 22.

**Abbildung 22:** Vorgang der mikrobiologischen Hemmhofstestung



## 3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse aus den durchgeführten mechanischen Stabilitätstests und der mikrobiologischen Hemmhoftests dargestellt.

Zum besseren Verständnis der Ergebnisse sei nochmals auf die unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen der verwendeten Antimykotika in Kapitel 2.2 verwiesen. Auf die optischen Farbveränderungen des PMMA-Zements bei der Zumischung der Antimykotika sowie die dabei entstandenen makroskopisch sichtbaren Inhomogenitäten ist in Kapitel 2.5 bereits näher eingegangen worden.

### 3.1 Mechanische Ergebnisse

In den folgenden Tabellen der mechanischen Ergebnisse ist der ISO-Grenzwert als rote Linie eingezeichnet dargestellt. Alle darunterliegenden Werte sind rot hervorgehoben. *Palacos® R* zeigt sich in den Tabellen als antibiotikafreier Zement sowie inklusive der Beimischungen der verschiedenen Antimykotika grau angefärbt. *Palacos® R+G* ist dagegen dunkelblau und *Copal® G+C* grün gefärbt dargestellt.

#### 3.1.1 Druckfestigkeit

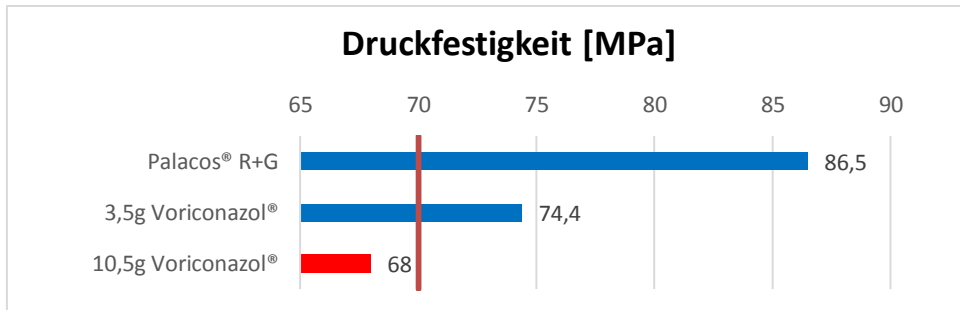
Die Ergebnisse der Druckfestigkeits-Prüfung entsprachen bis auf eine Ausnahme den Normvorgaben von ISO 5833. [78] Der hierin geforderte Grenzwert beträgt mindestens 70 MPa. Die Ausnahme wurde durch die Zumischung von 10,5 g *Voriconazol®* gebildet.

##### 3.1.1.1 Voriconazol (*Voriconazol®*)

*Voriconazol®* bildete mit der Zumischung von 10,5 g zu die zuvor genannte Ausnahme außerhalb der ISO-Norm. (Tabelle 6) Die Zumischung von 3,5 g *Voriconazol®* zeigte ebenfalls eine reduzierte Druckfestigkeit auf, lag jedoch mit 74,4 MPa noch oberhalb der Normvorgaben. Die vertikale Achse beschreibt hier den verwendeten PMMA-Zement *Palacos® R+G* als Referenzwert. Darunter

aufgelistet befindet sich eben genannter Zement mit den jeweils zusätzlich beigemischten Dosierungen von *Voriconazol*®.

**Tabelle 6:** Druckfestigkeit von *Palacos*® R+G nach Zugabe von *Voriconazol*®

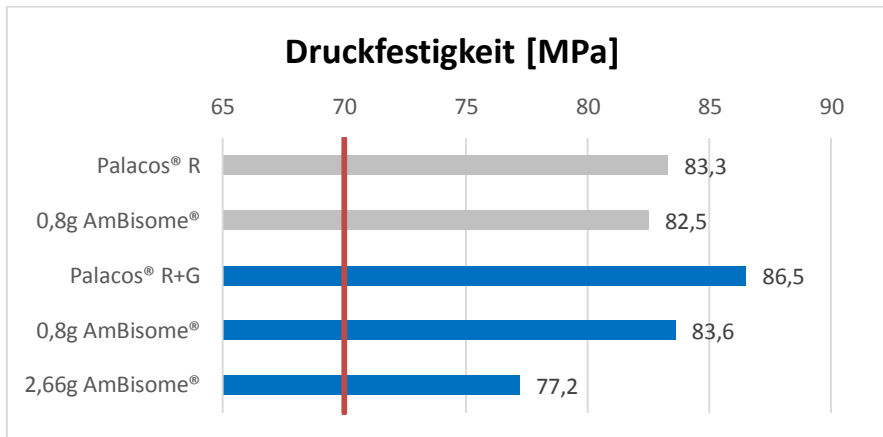


[Legende: *Palacos*® R+G (Referenz); *Palacos*® R+G plus 3.5 g *Voriconazol*®; *Palacos*® R+G plus 10.5 g *Voriconazol*®]

### 3.1.1.2 Liposomales Amphotericin B (*AmBisome*®)

Alle verwendeten Beimischungen vom liposomalen Amphotericin B lagen über der ISO-Normgrenze. Die Beimischung von *AmBisome*® bewirkte eine Reduktion der Druckfestigkeit, besonders bei der hohen Beimischung von 2,66 g. Der PMMA-Zement *Palacos*® R+G mit dem additiven Gentamicin zeigte generell bessere Endergebnisse als *Palacos*® R. Somit lag die 0,8 g Beimischung zu *Palacos*® R+G um 1,1 MPa über der gleichen Beimischung zu *Palacos*® R. In Tabelle 7 sind *Palacos*® R sowie *Palacos*® R+G als Referenz angegeben sowie jeweils darunter die den beiden Zementen beigemischten Dosierungen an liposomalem Amphotericin B.

**Tabelle 7:** Druckfestigkeit von *Palacos® R* sowie *Palacos® R+G* nach Zugabe von *Ambisome®*

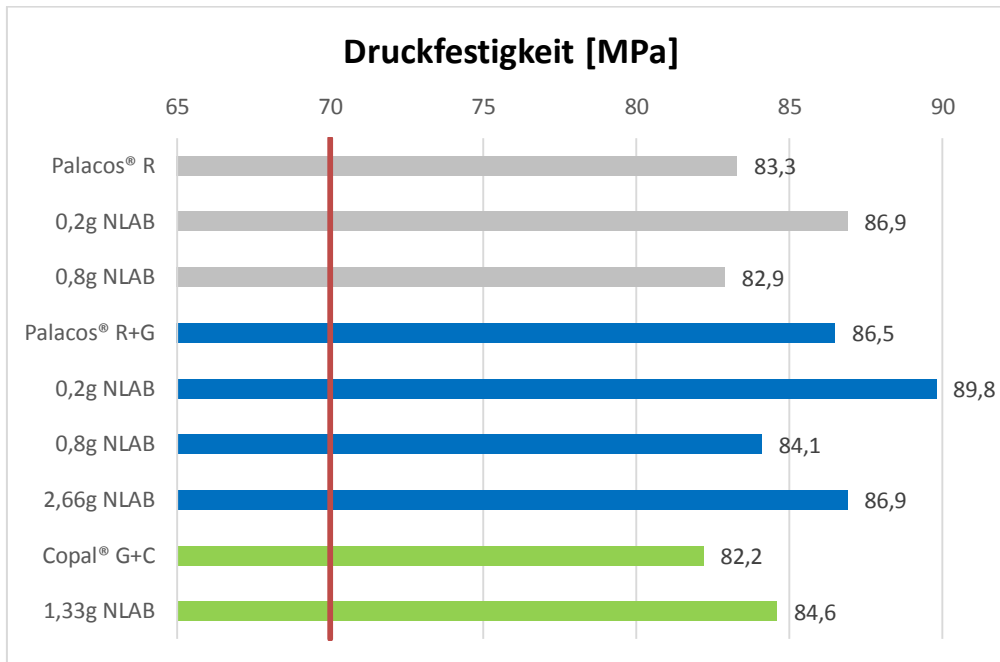


[Legende: *Palacos® R* (Referenz); *Palacos® R* plus 0,8 g *Ambisome®*; *Palacos® R+G* (Referenz); *Palacos® R+G* plus 0,8 g *Ambisome®*; *Palacos® R+G* plus 2,66 g *Ambisome®*]

### 3.1.1.3 Nicht-liposomales Amphotericin B (*NLAB*)

Die Zumischungen von *NLAB* führten teilweise zu einer Erhöhung der Druckfestigkeit im Vergleich zu den reinen Knochenzementen ohne Antimykotika-Beimengung (Referenzwerte). Dabei zeigte sich bei den 0,2 g Dosierungen zu *Palacos® R* und *Palacos® R+G* ein Anstieg von ca. 4 % im Vergleich zu den Referenzwerten. Auch bei der Dosierung von 1,33 g *NLAB* zu *Copal® G+C* zeigte sich ein Anstieg der Druckfestigkeit von 2,9 %. Bei der Zumischung von 2,66 g *NLAB* zum *Palacos® R+G* war die Druckfestigkeit relativ konstant im Vergleich zum Referenzwert von 86,5 MPa. Die Zumischung von 0,8 g *NLAB* zeigte eine leicht reduzierte Druckfestigkeit im Vergleich zum jeweiligen Knochenzement ohne Beimengungen. In Tabelle 8 sind *Palacos® R*, *Palacos® R+G* sowie *Copal® G+C* als Referenz angegeben sowie darunter die den PMMA-Zementen jeweils beigemischten Dosierungen an nicht liposomalem Amphotericin B (*NLAB*).

**Tabelle 8:** Druckfestigkeit von *Palacos® R* , *Palacos® R+G* sowie *Copal® G+C* nach Zugabe von *NLAB*



**[Legende:** *Palacos® R* (Referenz); *Palacos® R* plus 0,2 g *NLAB*; *Palacos® R* plus 0,8 g *NLAB*; *Palacos® R+G* (Referenz); *Palacos® R+G* plus 0,2 g *NLAB*; *Palacos® R+G* plus 0,8 g *NLAB*; *Palacos® R+G* plus 2,66 g *NLAB*; *Copal® G+C* (Referenz); *Copal® G+C* plus 1,33 g *NLAB*]

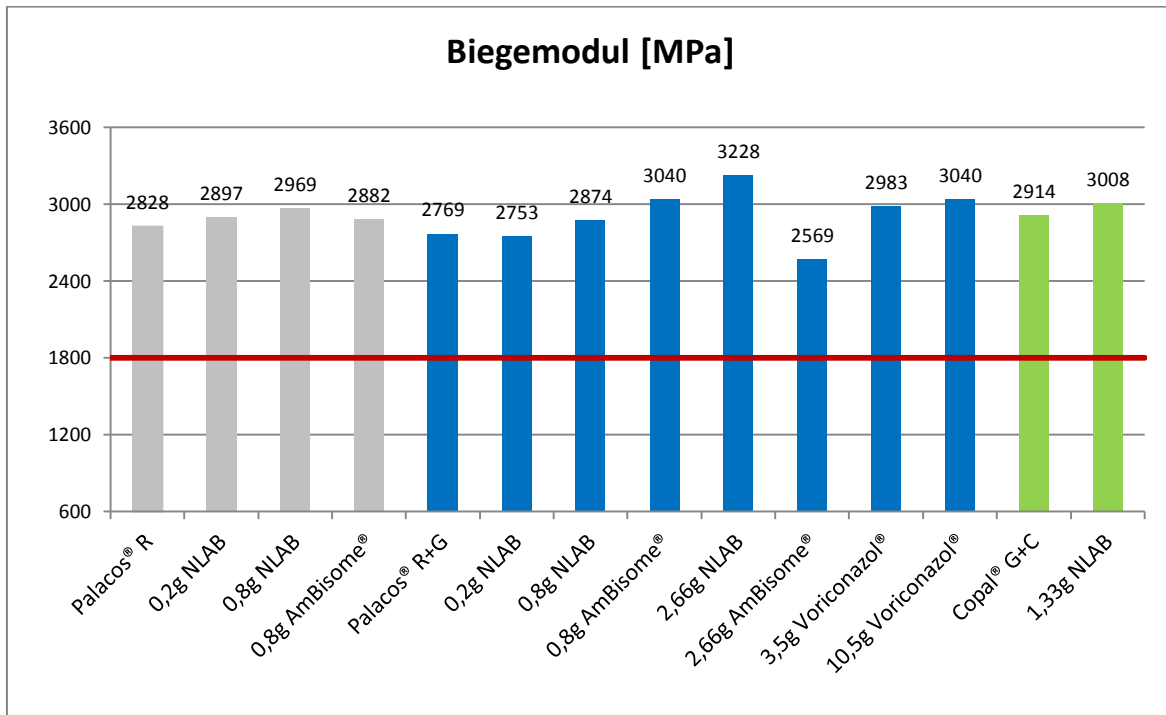
### 3.1.2 Biegefestigkeit und Biegemodul

Die Biegefestigkeit und das daraus berechnete Biegemodul zeigten jeweils verschiedene Ergebnisse in den mechanischen Tests. In den nachfolgenden Kapiteln wird hierzu näher eingegangen.

#### 3.1.2.1 Biegemodul

Der ISO-Grenzwert für das Biegemodul nach ISO 5833 [78] von 1800 MPa wurde auch bei den hohen Dosierungen der Antimykotika stets eingehalten, siehe Tabelle 9. Viele der beigemischten Antimykotika sorgten sogar für eine Erhöhung des Biegemoduls über den Referenzbereich hinaus. So lag das Ergebnis von 2,66 g *NLAB* um circa 16 % über dem Ergebnis des puren *Palacos®-R+G*-Zements. Die geringste Druckfestigkeit war mit 2569 MPa bei der Zumischung von 2,66 g *AmBisome®* gegeben.

**Tabelle 9:** Biegemodul von *Palacos® R* , *Palacos® R+G* sowie *Copal® G+C* nach Zugabe von *Voriconazol®*, *AmBisome®* und *NLAB*



[Legende: *Palacos® R* (Referenz); *Palacos® R* plus 0,2 g *NLAB*; *Palacos® R* plus 0,8 g *NLAB*; *Palacos® R+G* (Referenz); *Palacos® R+G* plus 0,2 g *NLAB*; *Palacos® R+G* plus 0,8 g *NLAB*; *Palacos® R+G* plus 0,8 g *AmBisome®*; *Palacos® R+G* plus 2,66 g *NLAB*; *Palacos® R+G* plus 2,66 g *AmBisome®*; *Palacos® R+G* plus 3,5 g *Voriconazol®* ; *Palacos® R+G* plus 10,5 g *Voriconazol®*; *Copal® G+C* (Referenz); *Copal® G+C* plus 1,33 g *NLAB*]

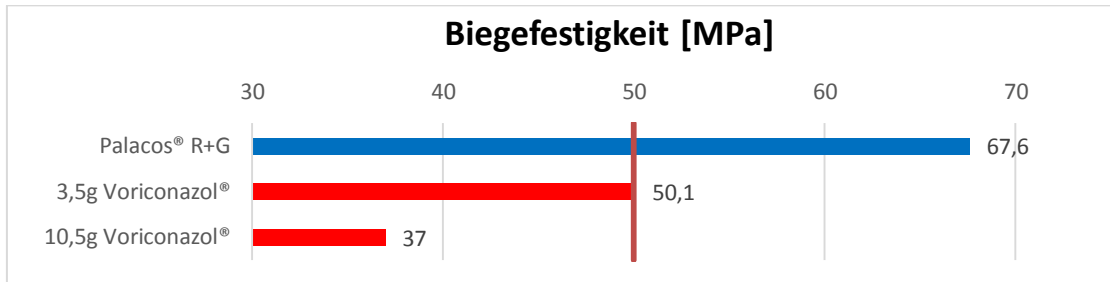
### 3.1.2.2 Biegefestigkeit

Bei der Biegefestigkeit befanden sich alle verwendeten Dosierungen von *NLAB* und *AmBisome®* oberhalb der ISO-5833-Norm [78] von 50 MPa. Die Ausnahme bildeten hier die Beimischungen von *Voriconazol®*.

#### 3.1.2.2.1 Voriconazol (*Voriconazol®*)

*Voriconazol®* beeinflusste die mechanische Biegefestigkeit maßgeblich. Hierbei lag die Dosierung von 3,5 g *Voriconazol®* mit 50,1 MPa an der ISO-Grenze. Bei 10,5 g befand sie sich mit 37 MPa deutlich unter der Normgrenze. (Tabelle 10)

**Tabelle 10:** Biegefestigkeit von *Palacos® R+G* nach Zugabe von *Voriconazol®*

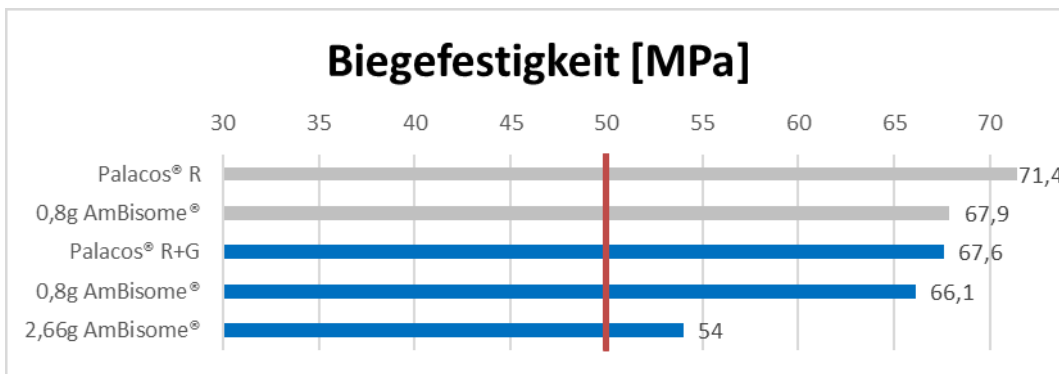


[Legende: *Palacos® R+G* (Referenz); *Palacos® R+G* plus 3.5 g *Voriconazol®*; *Palacos® R+G* plus 10.5 g *Voriconazol®*]

### 3.1.2.2.2 Liposomales Amphotericin B (*AmBisome®*)

Beim *AmBisome®* zeigte sich mit steigender Dosierung eine zunehmende Reduktion der Biegefestigkeit. Dennoch wurden die Anforderungen der ISO-Norm bei allen Dosierungen stets eingehalten. Erst bei der Beimischung von 2,66 g *AmBisome®* zu *Palacos® R+G* zeigte sich im Vergleich zum Referenzwert ohne Antimykotika-Beimischung eine um circa 20 % reduzierte Biegefestigkeit. (Tabelle 11)

**Tabelle 11:** Biegefestigkeit von *Palacos® R* sowie *Palacos® R+G* nach Zugabe von *AmBisome®*

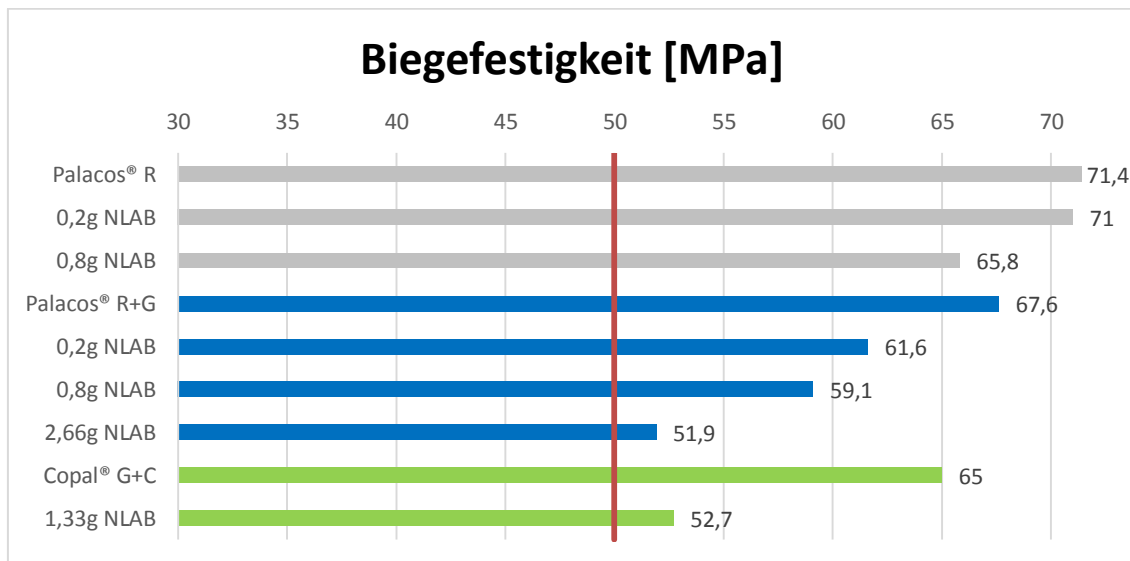


[Legende: *Palacos® R* (Referenz); *Palacos® R* plus 0,8 g *AmBisome®*; *Palacos® R+G* (Referenz); *Palacos® R+G* plus 0,8 g *AmBisome®*; *Palacos® R+G* plus 2,66 g *AmBisome®*]

### 3.1.2.2.3 Nicht-liposomales Amphotericin B (NLAB)

Auch die Werte vom *NLAB* lagen stets über der ISO-Norm. Bei der Zumischung von 1,33 g zu *Copal® G+C* sowie 2,66 g *NLAB* zu *Palacos® R+G* zeigte sich jedoch eine deutliche Reduktion im Vergleich zum Referenzwert. (Tabelle 12)

**Tabelle 12:** Biegefestigkeit von *Palacos® R*, *Palacos® R+G* sowie *Copal® G+C* nach Zugabe von *NLAB*



[Legende: *Palacos® R* (Referenz); *Palacos® R* plus 0,2 g *NLAB*; *Palacos® R* plus 0,8 g *NLAB*; *Palacos® R+G* (Referenz); *Palacos® R+G* plus 0,2 g *NLAB*; *Palacos® R+G* plus 0,8 g *NLAB*; *Palacos® R+G* plus 2,66 g *NLAB*; *Copal® G+C* (Referenz); *Copal® G+C* plus 1,33 g *NLAB*]

### 3.1.3 Dynstat-Schlagzähigkeit

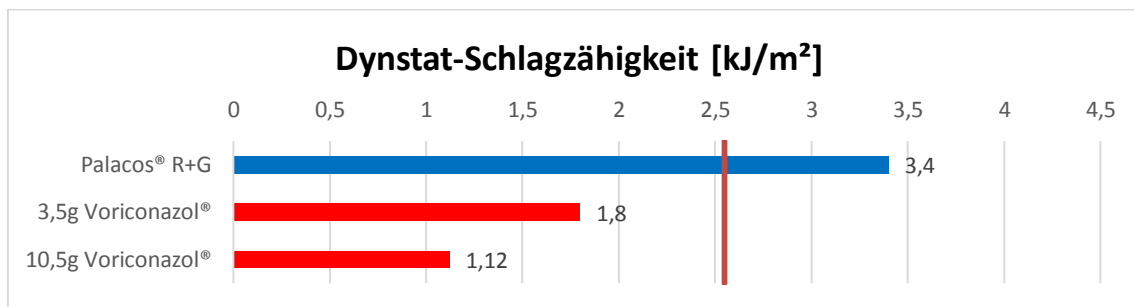
Die Ergebnisse der durchgeführten Dynstat-Schlagzähigkeitsprüfungen nach DIN 53435 (1983) zeigten erneut eine Korrelation zwischen hohen Dosierungen und reduzierter mechanischer Stabilität. Die DIN-Norm schreibt dabei ein Minimum von 75 % des Referenzwertes ohne Beimischungen von Antimykotika vor.

#### 3.1.3.1 Voriconazol (*Voriconazol®*)

*Voriconazol®* wurde ausschließlich mit dem PMMA-Zement *Palacos® R+G* geprüft. Die erforderliche Schlagzähigkeit lag hierbei bei mindestens 2,55 kJ/m<sup>2</sup>. Dieser Wert entsprach 75 % des Referenzwertes von 3,4 kJ/m<sup>2</sup>. Beide

verwendeten Dosierungen vom *Voriconazol*® lagen jedoch mit 1,8 kJ/m<sup>2</sup> sowie 1,12 kJ/m<sup>2</sup> deutlich unter der geforderten DIN-Norm. Das Ergebnis der 10,5 g Dosierung betrug dabei nur etwa ein Drittel des Referenzwertes. (Tabelle 13)

**Tabelle 13:** Dynstat-Schlagzähigkeit von *Palacos*® R+G nach Zugabe von *Voriconazol*®

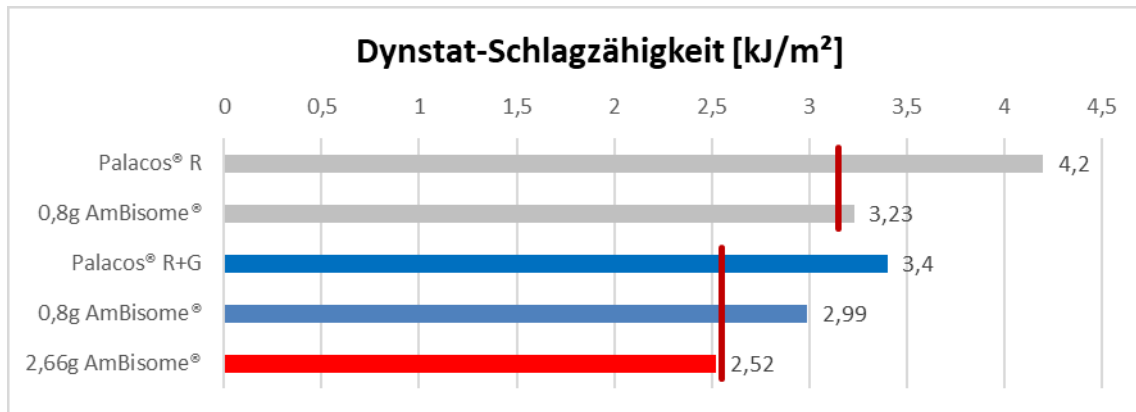


[Legende: *Palacos*® R+G (Referenz); *Palacos*® R+G plus 3.5 g *Voriconazol*®; *Palacos*® R+G plus 10.5 g *Voriconazol*®]

### 3.1.3.2 Liposomales Amphotericin B (*AmBisome*®)

Beim Zumischen von *AmBisome*® zu den PMMA-Zementen zeigte sich eine Korrelation der Höhe der Dosierung mit der Biegefestigkeit. Die Zumischung von 0,8 g zu *Palacos*® R mit einer Biegefestigkeit von 3,23 kJ/m<sup>2</sup> lag etwas oberhalb der Normgrenze. Bei der höheren Dosierung von 2,66 g *AmBisome*® zu *Palacos*® R+G zeigte sich eine deutlichere Reduktion der Biegefestigkeit bis in einen Bereich unterhalb der DIN-Norm. (Tabelle 14)

**Tabelle 14:** Dynstat-Schlagzähigkeit von *Palacos® R* sowie *Palacos® R+G* nach Zugabe von *AmBisome®*

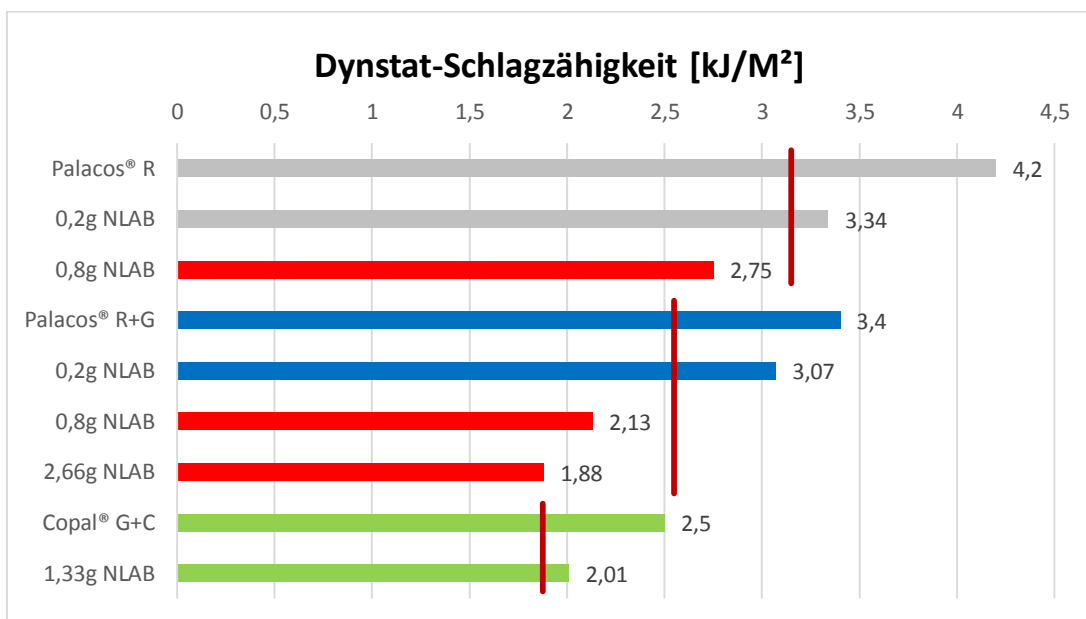


[Legende: *Palacos® R* (Referenz); *Palacos® R* plus 0,8 g *AmBisome®*; *Palacos® R+G* (Referenz); *Palacos® R+G* plus 0,8 g *AmBisome®*; *Palacos® R+G* plus 2,66 g *AmBisome®*]

### 3.1.3.3 Nicht-liposomales Amphotericin B (NLAB)

Vom *NLAB* lagen die meisten hohen Dosierungen unterhalb der DIN-Norm. (Tabelle 15) Es zeigte sich eine signifikante Abweichung der höheren Dosierungen vom Referenzwert des PMMA-Zements ohne Beimischungen. Die Zumischung von 2,66 g *NLAB* zu *Palacos® R+G* lag sogar um ca. 45 % unterhalb des Referenzwertes. Eine Ausnahme bildete 1,33 g *NLAB* zu *Copal® G+C*, da es trotz der hohen Dosierung noch eine ausreichende Schlagzähigkeit aufweisen konnte.

**Tabelle 15:** Dynstat-Schlagzähigkeit von *Palacos® R* , *Palacos® R+G* sowie *Copal® G+C* nach Zugabe von *NLAB*



**[Legende:** *Palacos® R* (Referenz); *Palacos® R* plus 0,2 g *NLAB*; *Palacos® R* plus 0,8 g *NLAB*; *Palacos® R+G* (Referenz); *Palacos® R+G* plus 0,2 g *NLAB*; *Palacos® R+G* plus 0,8 g *NLAB*; *Palacos® R+G* plus 2,66 g *NLAB*; *Copal® G+C* (Referenz); *Copal® G+C* plus 1,33 g *NLAB*]

### 3.2 Mikrobiologische Ergebnisse

Zur Bestimmung der Wirksamkeit der Antimykotika gegen *Candida albicans* und *Candida glabrata* wurden Agardiffusionstests auf Sabouraud-Dextrose-Agarplatten durchgeführt (vgl. Kapitel 2.6). Dabei wurden je drei Prüfkörper pro Dosierung für die Messungen verwendet. Von jedem Prüfkörper wurde das Eluat an drei Stellen auf die Agarplatten aufgetragen und somit ergaben sich pro Prüfkörper jeweils drei Hemmhöfe. Aus diesen drei Hemmhöfen wurde rechnerisch stets ein Mittelwert errechnet. In den Ergebnistabellen (Tab. 16 und Tab. 17) werden diese Mittelwerte dargestellt. Auch an dieser Stelle sei zur genauen Zusammensetzung der Antimykotika bezüglich deren Wirkstoffkonzentration und der jeweiligen Menge an Zusatzstoffen auf das Kapitel 2.2 verwiesen.

Zur leichteren Veranschaulichung wurden die Ergebnistabellen eingefärbt. Der obere Bereich der Hemmhof-Ergebnisse (25 - 40 mm Durchmesser) ist grün gefärbt, der mittlere Bereich (16 - 24 mm Durchmesser) in Gelb und der untere Bereich (1 - 15 mm Durchmesser) in Orange.

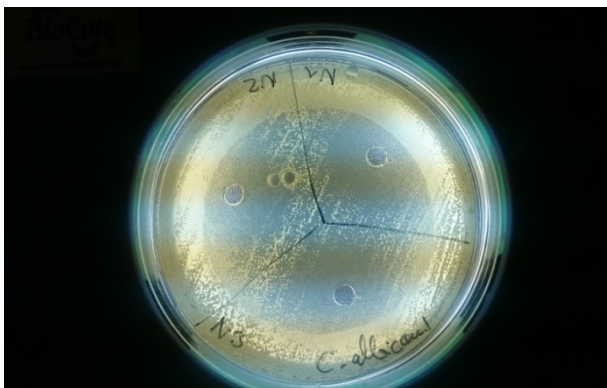
### 3.2.1 Voriconazol (*Voriconazol*®)

Bei der Beimischung von *Voriconazol*® konnte bei den durchgeführten Versuchen eine hemmende Wirkung gegen die beiden *Candida*-Stämme nachgewiesen werden. Die Ergebnisse werden dabei in den folgenden Kapiteln beschrieben.

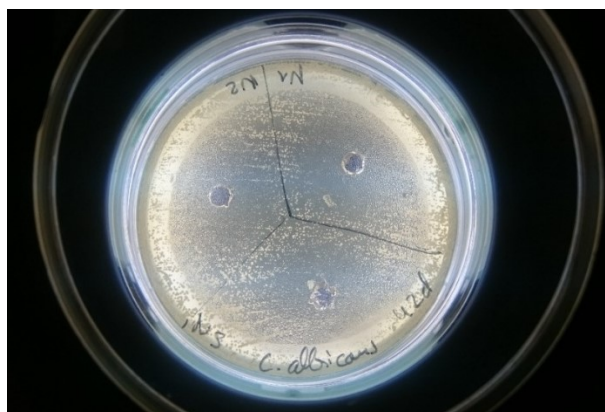
#### 3.2.1.1 *Candida albicans*

Bei der Dosierung von 3,5 g *Voriconazol*® zum PMMA-Zement *Palacos*® R+G zeigte sich gegen *Candida albicans* eine gute hemmende Wirkung (Abbildung 28). Auch nach sechs Wochen war in den Agardiffusionstests noch eine ausreichende Sensibilität gegen das lokale Antimykotikum vorhanden (Abbildung 29).

**Abbildung 28:** *Cand.-albicans*-Hemmhöfe von *Palacos*® R+G nach Zugabe von 3,5 g *Voriconazol*® nach 1 h

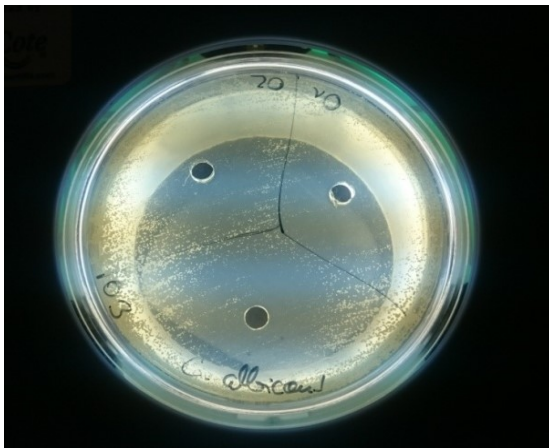


**Abbildung 29:** *Cand.-albicans*-Hemmhöfe von *Palacos*® R+G nach Zugabe von 3,5 g *Voriconazol*® nach 42 d

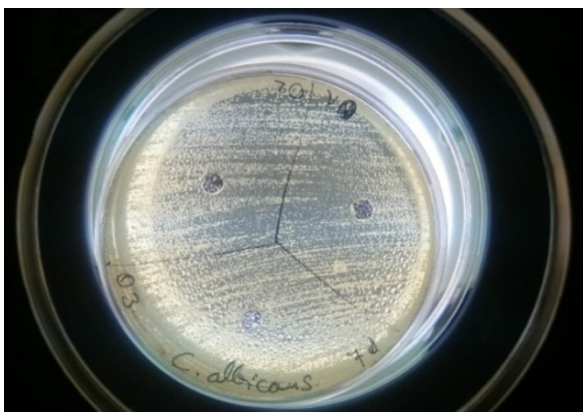


Die höhere Dosierung von 10,5 g *Voriconazol*® zu *Palacos*® R+G zeigte ebenfalls eine gute Wirkung gegen *Candida albicans*. (Abbildung 30) Jedoch waren hier nach einer Woche multiple kleine Pilzkolonien auf den Agarplatten sichtbar, wodurch die Auswertung der Hemmhöfe zu diesem Messzeitpunkt nicht durchgeführt werden konnte. (Abbildung 31)

**Abbildung 30:** *Cand.-albicans*-Hemmhöfe von *Palacos*® R+G nach Zugabe von 10,5 g *Voriconazol*® nach 1 h

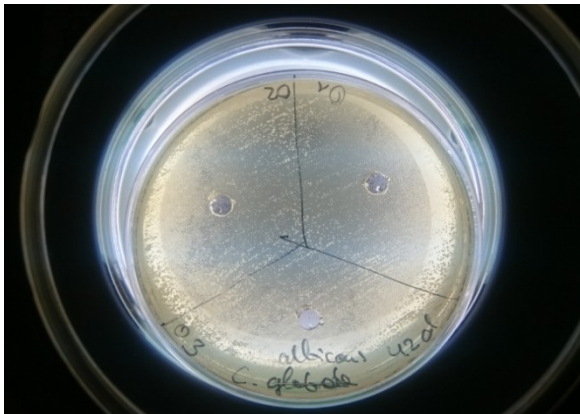


**Abbildung 31:** *Cand.-albicans*-Hemmhöfe von *Palacos*® R+G nach Zugabe von 10,5 g *Voriconazol*® nach 7 d



Bei den darauffolgenden Messzeitpunkten waren wieder Hemmhöfe feststellbar. Nach sechs Wochen konnten hier Hemmhöfe von 35 - 40 mm Durchmesser gemessen werden. (Abbildung 32)

**Abbildung 32:** Cand.-albicans-Hemmhöfe von *Palacos*® R+G nach Zugabe von 10,5 g *Voriconazol*® nach 42d



Eine Übersicht über die errechneten Mittelwerte der jeweils drei Hemmhöfe, die bei der Verwendung von *Palacos*® R+G mit Zumischungen von 3,5 g sowie 10,5 g *Voriconazol*® gemessen wurden, zeigt Tabelle 16. Die Ursache für die fehlenden Messergebnisse bei der 10,5 g Dosierung nach dem Messzeitpunkt von sieben Tagen wurde bereits oben beschrieben.

**Tabelle 16:** Durchmesser der Hemmhöfe gegen *Cand. albicans* [mm] (\* Es sind kaum Hemmhöfe erkennbar aufgrund mehrerer kleiner *Candida*-Kolonien.)

	1 h	24 h	7 d	15 d	28 d	42 d
<i>Palacos</i> ® R+G + 3,5 g <i>Voriconazol</i> ®	28	27	25	25	29	29
	26	26	26	26	27	27
	27	27	27	25	27	27
<i>Palacos</i> ® R+G + 10,5 g <i>Voriconazol</i> ®	27	29	*	35	35	35
	27	28	*	40	40	40
	27	29	*	35	35	35

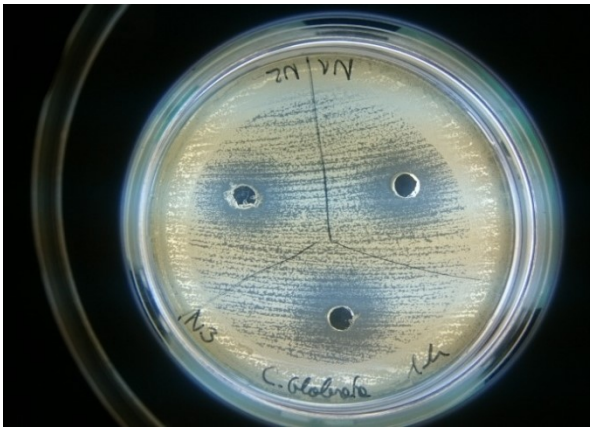
### 3.2.1.2 *Candida glabrata*

Im Gegensatz zu *Candida albicans* besaß die Dosierung von 3,5 g *Voriconazol*® zu *Palacos*® R+G gegen *Candida glabrata* nur eine geringe hemmende Wirkung. (Tabelle 17) Hier zeigten sich nach einer Stunde Hemmhöfe mit einem Durchmesser von 12 - 15 mm. (Abbildung 33) Diese verkleinerten sich im Verlauf der weiteren Messungen zunehmend und wiesen nach sechs Wochen einen Durchmesser von nur 10 - 12 mm auf. (Abbildung 34)

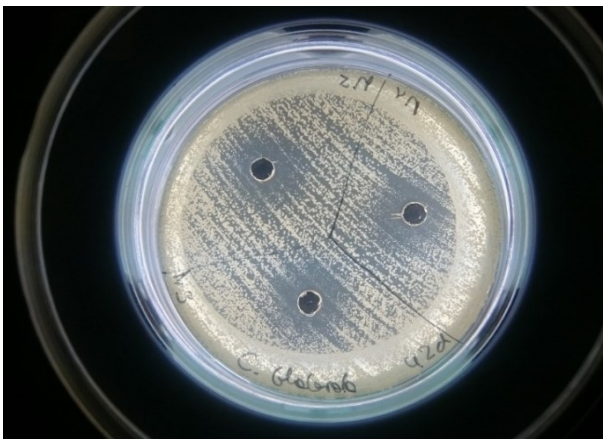
**Tabelle 17:** Durchmesser der Hemmhöfe gegen *Cand. glabrata* [mm]

	1 h	24 h	7 d	15 d	28 d	42 d
<i>Palacos</i> ® R+G + 3,5 g <i>Voriconazol</i> ®	15	10	12	12	12	12
	14	11	11	11	11	11
	12	9	10	10	10	10
<i>Palacos</i> ® R+G + 10,5 g <i>Voriconazol</i> ®	30	32	40	40	40	40
	30	32	40	40	40	40
	30	32	40	40	40	40

**Abbildung 33:** *Cand.-glabrata*-Hemmhöfe von *Palacos*® R+G nach Zugabe von 3,5 g *Voriconazol*® nach 1 h



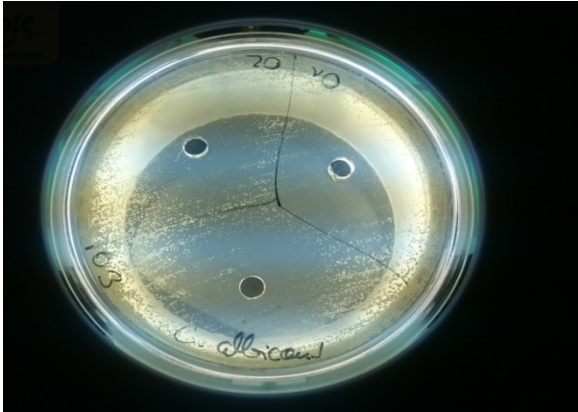
**Abbildung 34:** *Cand.-glabrata*-Hemmhöfe von *Palacos*® R+G nach Zugabe von 3,5 g *Voriconazol*® nach 42 d



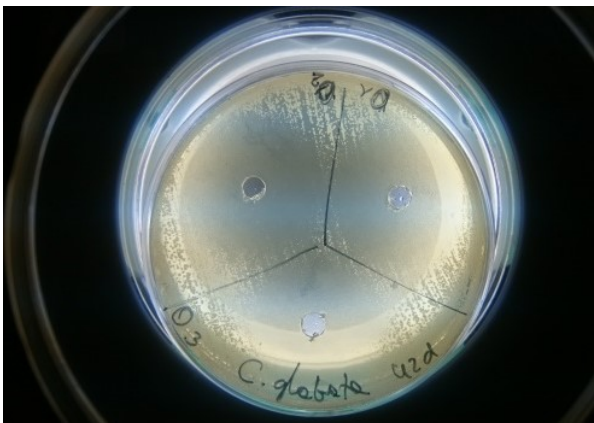
Die höhere Dosierung von 10,5 g *Voriconazol*® zeigte eine gute Hemmwirkung gegenüber *Candida glabrata*. Die Durchmesser der Hemmhöfe nahmen während der sechs-wöchigen Versuchsdauer von 30 mm auf 40 mm zu und sorgten somit für eine gute antifungale Wirkung. Die Entwicklung der Hemmhöfe von 10,5 g

*Voriconazol*® im Verlauf der Messzeitpunkte ist in den Abbildungen 35 und 36 zu sehen.

**Abbildung 35:** *Cand.-glabrata*-Hemmhöfe von *Palacos*® R+G nach Zugabe von 10,5 g *Voriconazol*® nach 1 h



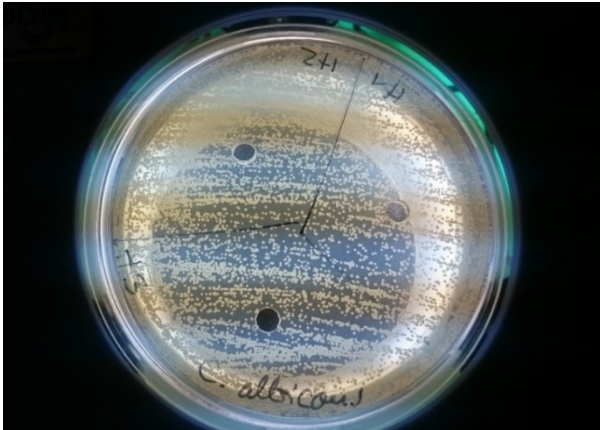
**Abbildung 36:** *Cand.-glabrata*-Hemmhöfe von *Palacos*® R+G nach Zugabe von 10,5 g *Voriconazol*® nach 42 d



### 3.2.2 Amphotericin B - *NLAB* und *AmBisome*®

Im Gegensatz zu *Voriconazol* zeigten sich die beiden *Candida*-Spezies resistent gegenüber den verwendeten Amphotericin-B-Varianten *AmBisome*® und *NLAB*. Dies äußerte sich dadurch, dass bei den ersten beiden aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten jeweils keine Hemmhöfe gemessen werden konnten. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Messungen für diese Testreihen der beiden Antimykotika durchgeführt. Abbildung 37 zeigt eine *Candida-albicans*-Agarplatte mit 2,66 g *NLAB* zu *Palacos*® R+G ohne jegliche Hemmhöfe.

**Abbildung 37:** Cand.-albicans- Hemmhöfe von *Palacos® R+G* nach Zugabe von 2,66 g *NLAB* nach 1 h



## 4 Diskussion

Fungale Protheseninfektionen bilden mit rund 1 - 2 % nur einen geringen Anteil aller Protheseninfektionen. Es existiert nur eine begrenzte Literatur zu diesem Thema und es gibt keinen Konsens über eine optimale Therapie. Als Goldstandard wird meistens die zweizeitige Revisionsoperation durchgeführt. Um bei Risikopatientinnen und -patienten eine fungale periprothetische Infektion zu verhindern kann man dem PMMA-Knochenzement manuell Antimykotika beimischen. [9, 44, 45, 75]

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist es, herauszufinden welche Auswirkungen die Beimischungen der Antimykotika Voriconazol sowie liposomales und nicht liposomales Amphotericin B zum PMMA-Knochenzement auf die antifungale Wirksamkeit haben. Zudem soll herausgefunden werden inwiefern dadurch die mechanische Stabilität des Knochenzements beeinflusst wird. Bei der Betrachtung der dabei erfolgten Ergebnisse sollten folgende Limitation berücksichtigt werden:

Erstens kann es durch die manuelle Herstellung des Knochenzements zu einer gering abweichenden Verteilung der antifungalen Wirkstoffe in den einzelnen Prüfkörpern gekommen sein. Von den inhomogen verteilten Mengen an Antimykotika sind vor allem die Prüfkörper betroffen, welchen *Voriconazol*® beigemischt wurde. Dies ist vor allem der stärkeähnlichen Konsistenz des Antimykotikums geschuldet, sodass es bereits während der Zementherstellung zu Komplikationen kam. Der Zementteig ließ sich nur schwer verformen und besaß eine trockene und instabile Konsistenz. Zudem waren trotz vorheriger Zerkleinerung des Medikamentenpulvers mithilfe eines Mörsers noch makroskopische, ungelöste Pulveranteile im Prüfkörper auszumachen. Die inhomogene Verteilung des Wirkstoffpulvers führte zusätzlich, wie in Kapitel 2.5 näher beschrieben wurde, zu einer instabilen Zementmasse und es kam vermehrt zu Randausbrüchen oder Einrissen in den Prüfkörpern.

Zweitens handelt es sich bei den Messungen nicht um in-vivo-Experimente sondern diese wurden in-vitro durchgeführt. Somit geben sie nur bedingt Aufschluss darüber wie sich der Knochenzement mit dem beigefügten Antimykotikum in einem menschlichen Körper verhalten würde. In-vivo-Tests wären von großem Vorteil um zu erkennen in welchem Ausmaß sich die

mechanische Stabilität durch die kontinuierliche Wirkstoffelution sowie durch den ständigen Kontakt mit körpereigenen Flüssigkeiten reduziert. Da solche Experimente an Patientinnen und Patienten jedoch ethisch nicht vertretbar erscheinen, wurde bei den Versuchsreihen versucht möglichst die in-vivo-Bedingungen nachzustellen.

Drittens war es aufgrund eingeschränkter Kapazitäten des Labors notwendig die Eluate kurzzeitig bei - 20°C einzufrieren. Es ist unklar ob sich eine solche Kälteeinwirkung negativ auf die Wirkung der Antimykotika auswirken kann.

Viertens konnte aufgrund einer begrenzt zur Verfügung stehenden Menge an sterilen Antimykotika nur eine bestimmte Anzahl an Prüfkörpern hergestellt werden. Mit einer größeren Menge der drei Antimykotika hätte man weitere Versuchsreihen durchführen können um einen besseren Vergleich zwischen den verschiedenen Wirkstoffen zu erhalten.

Erwähnt werden muss auch, dass es bei der Herstellung der Prüfkörper zu auffälligen Verfärbungen des Zementes gekommen ist. Der ursprünglich grün eingefärbte PMMA-Zement wurde durch die Beimischung des orangen *NLAB*-Pulvers zunehmend orange. Auf diese makroskopische Auffälligkeit wurde in Kapitel 2.5 bereits näher eingegangen.

#### **4.1 Mechanische Stabilität**

Bei einer Zunahme der beigemischten Wirkstoffmenge kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme der mechanischen Stabilität. Diese Korrelation war bei der Druckfestigkeitsprüfung der beigemischten Mengen von *Voriconazol*® sowie *AmBisome*® gut ersichtlich. Die Beimischung von 2,66 g *AmBisome*® zu *Palacos*® R+G lag bei 77,2 MPa und die Beimischung von 3,5 g *Voriconazol*® betrug nur 74,4 MPa. Bis auf eine Ausnahme befanden sich alle Druckfestigkeits-Werte der beigemischten drei Antimykotika oberhalb der ISO-Norm. Die Ausnahme wurde durch die Beimischung von 10,5 g *Voriconazol*® gebildet. Hier wurde das empfohlene Maximum von 10 Vol.-% mit rund 26 Vol.-% deutlich überschritten. [8, 28] Die Druckfestigkeit lag hier mit 68 MPa unterhalb der empfohlenen ISO-Norm von 70 MPa. Die 10,5 g Dosierung konnte bei keinem der durchgeführten mechanischen Tests die ISO-Normen erfüllen. Auch bei Miller et

al. 2013 wird eine verminderte Druckfestigkeit bei hohen Dosierungen von Voriconazol beschrieben. [56] Dort konnte bei additiven 24 Vol.-% Voriconazol keine ausreichende Druckfestigkeit festgestellt werden. Zudem zeigte sich in der erwähnten Studie nach erfolgter Wirkstofffreisetzung die Reduktion der Druckfestigkeit um die Hälfte. [56]

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Zumischung von *NLAB*, auch bekannt als Amphotericin-B-Desoxycholat(ABD), zumeist eine Zunahme der Druckfestigkeit. Die Zumischung von 1,33 g *NLAB* zu *Copal*® G+C wies beispielweise eine um ca. 3 % erhöhte Druckfestigkeit auf im Vergleich zum Referenzwert. Goss et al. 2007 konnte beobachten, dass das Hinzufügen hoher Dosierungen von ABD zu einer erhöhten Druckfestigkeit führte. [62] Auch bei Czuban et. al 2019 konnte bei den beigemischten Dosierungen von *NLAB* keine Reduktion der Druckfestigkeit beobachtet werden. [79] Eine Hypothese besagt, dass ABD dazu neigt mit dem PMMA-Knochenzement chemische Bindungen einzugehen. Durch die dadurch entstandene kompaktere Zementstruktur kann die Beimischung somit eine erhöhte Druckfestigkeit bewirken. [62, 79]

Bei der Biegefestigkeit zeigte sich bei den höheren Dosierungen der drei Antimykotika stets eine eingeschränkte mechanische Stabilität. Die Dosierungen von 3,5 g und 10,5 g *Voriconazol*® konnten zudem keine ausreichende Biegefestigkeit laut ISO-Norm aufweisen.

Die stärkste mechanische Beeinträchtigung konnte bei der Dynstat-Schlagzähigkeitsprüfung beobachtet werden. Hier befanden sich zusätzlich zu den hohen Dosierungen von *Voriconazol*® auch einige Dosierungen von *AmBisome*® sowie von *NLAB* unterhalb der ISO-Norm. Eine signifikante Reduktion der Stabilität konnte hier bereits bei den geringen Beimischungen wie 0,2 g *NLAB* beobachtet werden. Bei den Ergebnissen fiel auf, dass die Dosierung von 1,33 g *NLAB* zu *Copal*® G+C immer noch der ISO-Norm entsprach. Dies kann jedoch daraus resultieren, dass der Referenzwert des Knochenzements durch die bereits enthaltene Menge von 1 g Gentamicin sowie 1 g Clindamycin bereits eine deutlich reduzierte Schlagzähigkeit aufwies. Nach der weiteren Zugabe von 1,33 g *NLAB* betrug die Schlagzähigkeit immer noch 80% des Referenzwertes.

Bei der Gegenüberstellung von *NLAB* und *AmBisome*® konnten mehrere Unterschiede festgestellt werden. *NLAB* wies bei der Druckfestigkeit etwas höhere Werte auf. Es zeigten sich jedoch keine groben Abweichungen. Bei der Biegefestigkeit hingegen war *AmBisome*® deutlich überlegen. Bei der Dosierung

von 0,8 g zu *Palacos® R+G* zeigte sich hier eine um ca. 10 % höhere Biegefestigkeit. Bei der höheren Dosierung von 2,66 g betrug die Differenz nur mehr ca. 3%. Auch bei der Schlagzähigkeit konnten signifikant bessere Ergebnisse beim *AmBisome®* festgestellt werden. Die Differenz betrug hier bei der Dosierung von 0,8 g zu *Palacos® R* ca. 11 %, bei 2,66 g zu *Palacos® R+G* ca. 18 % und bei der Beimischung von 0,8 g zu *Palacos® R+G* sogar rund 25 % zugunsten von *AmBisome®*. Insgesamt kann somit von einer besseren mechanischen Stabilität vom liposomalen Amphotericin B (*AmBisome®*) im Vergleich zum *NLAB* ausgegangen werden.

## 4.2 Mikrobiologische Wirkung

Bei den Dosierungen von 3,5 g und 10,5 g *Voriconazol®* konnte für die Dauer von sechs Wochen stets eine gute Hemmwirkung gegen *Candida albicans* festgestellt werden. Das Ergebnis von 10,5 g *Voriconazol®* zu *Palacos® R+G* konnte beim Messzeitpunkt nach einer Woche nicht verwertet werden da es zum Wachstum multipler kleiner Pilzkolonien kam. Bei den darauf folgenden Messzeitpunkten waren die Hemmhöfe wieder deutlich erkennbar. Somit kann hier ein Messfehler nicht ausgeschlossen werden.

Bei *Candida glabrata* zeigte die Dosierung von 3,5 g *Voriconazol®* zu *Palacos® R+G* nur eine geringe Wirkung mit Hemmhöfen von nur 10 - 15 mm Durchmesser. Die höhere Dosierung von 10,5 g *Voriconazol®* zu *Palacos® R+G* konnte hier hingegen große Hemmhöfe mit einem Durchmesser von bis zu 40 mm erzielen.

Bei den Beimischungen von *AmBisome®* sowie von *NLAB* konnten keinerlei hemmende Wirkungen gegen die beiden Erreger *Candida albicans* oder *Candida glabrata* festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für die ausbleibende Wirkung von *NLAB* ist die insuffiziente Wirkstofffreisetzung durch chemische Bindungen mit dem PMMA-Zement. [62, 79] Auch trotz des im PMMA-Zement *Palacos® R+G* bereits enthaltenen Gentamicins, welches als Poragen fungieren kann, war keine Wirkstofffreisetzung nachweisbar. [60, 61, 63, 79] Auch Czuban et al. 2019 konnte beobachten, dass die Zugabe von Gentamicin zu ABD keine bessere Wirkstoffelution zur Folge hatte. Bei N-methyl-D-glucamine-Amphotericin B hingegen war die bessere Freisetzung in der Studie nachweisbar. [79]

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass die Antimykotika zu gering dosiert worden sind für eine ausreichende hemmende Wirkung. Laut den neuesten Erkenntnissen von Czuban et al. 2019 ist eine minimale Dosierung von 12,5 mg von ABD notwendig um eine Biofilmbildung von *Candida sp.* zu verhindern. [77]

Eine fehlende Sensibilität der Erreger kann ausgeschlossen werden, da diese zuvor auf ihre Resistenzen getestet worden sind.

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Kälteexposition bei - 20°C negative Auswirkungen auf die Wirksamkeit der Antimykotika gehabt haben kann. Weitere Versuchsreihen wären notwendig um herauszufinden weshalb die beiden Antimykotika keine Wirkung gegen die beiden *Candida*-Stämme aufwiesen.

### **4.3 Implikationen für Theorie und Praxis**

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass die Beimischungen von 3,5 g und 10,5 g *Voriconazol*® zu *Palacos*® R+G gute Hemmwirkungen gegen *Candida albicans* sowie gegen *Candida glabrata* aufweisen. Der Nachteil dieser hohen Dosierungen ist jedoch die signifikante Reduktion der mechanischen Stabilität des Knochenzements um durchschnittlich 20 % des Referenzwertes. Die größte Auswirkung zeigte sich hier bei der Schlagzähigkeitsprüfung. Dabei kam es zu einer Abnahme der mechanischen Stabilität um bis zu 47 %, beziehungsweise um bis zu 67 % bei 3,5 g und 10,5 g. Von einer mechanischen Stabilität kann somit bei der Beimischung von 3,5 g oder 10,5 g *Voriconazol*® nicht ausgegangen werden, weshalb diese Dosierungen nicht zur Fixierung einer Prothese verwendet werden sollten. Es besteht die Option *Voriconazol*® als lokales Antimykotikum in 'Spacern' vorübergehend einzusetzen. Diese verbleiben als Interimsprothesen bei Revisionsoperationen nur temporär im Körper und sind zudem durch Metallstäbe mechanisch stabilisiert. Die mechanische Stabilität kann somit zugunsten einer hohen lokalen Wirkstofffreisetzung vernachlässigt werden.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Urquhart, D M PhD, Hanna, F S PhD, Brennan S L BA(Hons). Incidence and Risk Factors for Deep Surgical Site Infection After Primary Total Hip Arthroplasty: A Systematic Review. *J Arthroplasty* Dec 2010;25(8):1216-22.e1-3.[PubMed ID: 19879720]
2. Aslam S, Darouiche R.O. Prosthetic Joint Infections. *Curr Infect Dis Rep.* 2012; 14(5): 551-557. [PMID: 22847032]
3. Mühlhofer HM, Pohlig F, Kanz KG, Lenze U, Lenze F, Toepfer A, Kelch S, Harrasser N, von Eisenhart-Rothe R, Schauwecker J. Prosthetic joint infection development of an evidence-based diagnostic algorithm. *Eur J Med Res.* 2017 Mar 9;22(1):8. doi: 10.1186/s40001-017-0245-1. [PMID: 28274250]
4. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* 2000 May;182(10):2675-9. [PMID: 10781532]
5. Banke IJ, von Eisenhart-Rothe R, Mühlhofer HML. Epidemiologie und Prophylaxe periprothetischer Infektionen. *Der Orthopäde* 2015 Dec ;44(12):928, 930-3. doi: 10.1007/s00132-015-3187-8. [PMID: 26526936]
6. Sharkey PF, Lichstein PM, Shen C, Tokarski AT, Parvizi J. Why are total knee arthroplasties failing today--has anything changed after 10 years? *J Arthroplasty.* 2014 Sep;29(9):1774-8. doi: 10.1016/j.arth.2013.07.024. Epub 2014 Jul 5. [PMID: 25007726]
7. Jacqueline C, Caillon J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Sep;69 Suppl 1:i37-40. doi: 10.1093/jac/dku254. [PMID: 25135088]
8. Kühn KD, Renz N, Trampuz A. Lokale Antibiotikatherapie. *Unfallchirurg* 2017;120:561-572
9. Azzam K, MD, Parvizi J, MD, FRCS, Jungkind D, PhD, Diplomate (ABMM), Hanssen A, MD, Fehring T, MD, Springer B, MD, Bozic K, MD, Della Valle C, MD, Pulido L, MD, Barrack R, MD. Microbiological, Clinical, and Surgical Features of Fungal Prosthetic Joint Infections: A Multi-Institutional Experience. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91 Suppl 6:142-9. [PMID: 19884422]
10. Kweon C. MD, McLaren A. C. MD, Leon C. MS, McLemore R. PhD. Amphotericin B Delivery From Bone Cement Increases With Porosity but Strength Decreases. *Clin Orthop. Relat Res ( Juni 2011)* 469:3002-3007.
11. Ayoade F, Todd JR. Prosthetic Joint Infection. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018-.2018 Nov 18.* [PMID: 28846340]
12. Nace J DO FAOAO MPT, Siddiqi A DO, Talmo C T MD Chen A F MD MBA, et al. Diagnosis and Management of Fungal Periprosthetic Joint Infections. *J Am AcadOrthop Surg* 2018;00:1-15
13. Li C, Renz N, Trampuz A. Management of Periprosthetic Joint Infection. *Hip Pelvis.* 2018 Sep;30(3):138-146. doi: 10.5371/hp.2018.30.3.138. Epub 2018 Sep 4. PMID: 30202747

14. Ulrich SD<sup>1</sup>, Seyler TM, Bennett D, Delanois RE, Saleh KJ, Thongtrangan I, Kuskowski M, Cheng EY, Sharkey PF, Parvizi J, Stiehl JB, Mont MA. Total hip arthroplasties: What are the reasons for revision? *Int Orthop*. 2008 Oct;32(5):597-604. Epub 2007 Apr 19.
15. Renz N, Yermak K, Perka C, Trampuz A. Alpha Defensin Lateral Flow Test for Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: Not a Screening but a Confirmatory Test. *J Bone Joint Surg Am*. 2018 May 2;100(9):742-750. doi: 10.2106/JBJS.17.01005.
16. Trampuz A, Universitätsmedizin Charité Berlin, 2018. Diagnosis of the PJI. <https://www.pro-implant-foundation.org/images/material/Biofilm-Definition-Diagnosis-PJI.pdf>.
17. Parvizi J, Shohat N, Gehrke T. Prevention of periprosthetic joint infection: new guidelines. *Bone Joint J*. 2017 Apr;99-B(4 Supple B):3-10. doi: 10.1302/0301-620X.99B4.BJJ-2016-1212.R1. [PMID: 28363888]
18. Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Apr;27(2):302-45. doi: 10.1128/CMR.00111-13.
19. Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthop*. 2015 Apr;86(2):147-58. doi: 10.3109/17453674.2014.966290. Epub 2014 Sep
20. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2017. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2018.
21. Phillips CB, Barrett JA, Losina E, Mahomed NN, Lingard EA, Guadagnoli E, Baron JA, Harris WH, Poss R, Katz JN. Incidence rates of dislocation, pulmonary embolism, and deep infection during the first six months after elective total hip replacement. *J Bone Joint Surg Am*. 2003 Jan;85(1):20-6. [PMID: 12533567]
22. Blom AW, Taylor AH, Pattison G, Whitehouse S, Bannister GC. Infection after total hip arthroplasty. The Avon experience. *J Bone Joint Surg Br*. 2003 Sep;85(7):956-9. [PMID: 14516026]
23. Lentino JR. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis*. 2003 May 1;36(9):1157-61. Epub 2003 Apr 14. [PMID: 12715311]
24. Blom AW, Brown J, Taylor AH, Pattison G, Whitehouse S, Bannister GC. Infection after total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br*. 2004 Jul;86(5):688-91. [PMID: 15274264]
25. Krenn V, Morawietz L, Perino G, Kienapfel H, Ascherl R, Hassenpflug GJ, Thomsen M, Thomas P, Huber M, Kendoff D, Baumhoer D, Krukemeyer MG, Natu S, Boettner F, Zustin J, Kölbl B, Rütger W, Kretzer JP, Tiemann A, Trampuz A, Frommelt L, Tichilow R, Söder S, Müller S, Parvizi J, Illgner U, Gehrke T. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract*. 2014 Dec;210(12):779-86. doi: 10.1016/j.prp.2014.09.017. Epub 2014 Oct 17. [PMID: 25454771]
26. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, Rao N, Hanssen A, Wilson WR; Infectious Diseases Society of America. Diagnosis and

- management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. [PMID: 23223583]
27. Parvizi J, Gehrke T, Chen AF. Proceedings of the International Consensus on Periprosthetic Joint Infection. *Bone Joint J.* 2013 Nov;95-B(11):1450-2. doi: 10.1302/0301-620X.95B11.33135. [PMID: 24151261]
  28. Pro-ImplantFoundation, Renz N, Trampuz A. Pocket Guide zur Diagnostik und Behandlung von periprosthetischen Infektionen. Version 8, Oktober 2018.
  29. Breusch S, Clarius M, Mau H, Sabo D. *Klinikleitfaden Orthopädie Unfallchirurgie* 8. Auflage, 2017. S.239ff.
  30. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greenleaf JF, Patel R. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007 Aug 16;357(7):654-63. [PMID: 17699815]
  31. Lenguerrand E, Whitehouse MR, Beswick AD, Kunutsor SK, Foguet P, Porter M, Blom AW; National Joint Registry for England, Wales, Northern Ireland and the Isle of Man. Risk factors associated with revision for prosthetic joint infection following knee replacement: an observational cohort study from England and Wales. *Lancet Infect Dis.* 2019 Jun;19(6):589-600. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30755-2. Epub 2019 Apr 17. [PMID: 31005559]
  32. Correa-Valderrama A, Stangl-Herrera W, Echeverry-Vélez A, Cantor E, Ron-Translateur T, Palacio-Villegas JC. Relationship between Body Mass Index and Complications during the First 45 Days after Primary Total Hip and Knee Replacement: A Single-Center Study from South America. *Clin Orthop Surg.* 2019 Jun;11(2):159-163. doi: 10.4055/cios.2019.11.2.159. Epub 2019 May 9. [PMID: 31156766]
  33. Crowe B, Payne A, Evangelista PJ, Stachel A, Phillips MS, Slover JD, Inneh IA, Iorio R, Bosco JA. Risk Factors for Infection Following Total Knee Arthroplasty: A Series of 3836 Cases from One Institution. *J Arthroplasty.* 2015 Dec;30(12):2275-8. doi: 10.1016/j.arth.2015.06.058. Epub 2015 Jul 2. [PMID: 26187387]
  34. Yano K, Minoda Y, Sakawa A, Kuwano Y, Kondo K, Fukushima W, Tada K. Positive nasal culture of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a risk factor for surgical site infection in orthopedics. *Acta Orthop.* 2009 Aug;80(4):486-90. doi: 10.3109/17453670903110675. [PMID: 19593719]
  35. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 2004 Oct 14;351(16):1645-54. [PMID: 15483283]
  36. Legout L, Senneville E. Periprosthetic joint infections: clinical and bench research. *ScientificWorldJournal.* 2013 Oct 27;2013:549091. doi: 10.1155/2013/549091. eCollection 2013. [PMID: 24288493]
  37. Ochsner PE, Borens O, Bodler PM, Broger I, Eich G, Hefti F, Maurer T, Nötzli H, Seiler S, Suvà D, Trampuz A, Uçkay I, Vogt M, Zimmerli W. *Infektionen des Bewegungsparrates. Grundlagen, Prophylaxe, Diagnostik und Therapie.* 2. Auflage, Grandvaux 2016 Swiss orthopaedics, Swiss Society for Infectious Diseases.

38. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *J Arthroplasty*. 2012 Sep;27(8 Suppl):61-5.e1. doi: 10.1016/j.arth.2012.02.022. Epub 2012 May 2. [PMID: 22554729]
39. Lee YR, Kim HJ, Lee EJ, Sohn JW, Kim MJ, Yoon YK. Prosthetic Joint Infections Caused by *Candida* Species: A Systematic Review and a Case Series. *Mycopathologia*. 2019 Feb;184(1):23-33. doi: 10.1007/s11046-018-0286-1. Epub 2018 Jul 26. [PMID: 30051279]
40. Pasticci MB, Papalini C, Leli A, Bruno G. Two-stage revision and systemic antifungal therapy of *Candida glabrata* primary prosthetic hip infection successfully treated: a case report. *J Med Case Rep*. 2019 May 21;13(1):151. doi: 10.1186/s13256-019-2095-7. [PMID: 31109363]
41. Jakobs O, Schoof B, Klatte TO, Schmidl S, Fensky F, Guenther D, Frommelt L, Gehrke T, Gebauer M. Fungal periprosthetic joint infection in total knee arthroplasty: a systematic review. *Orthop Rev (Pavia)*. 2015 Mar 9;7(1):5623. doi: 10.4081/or.2015.5623. eCollection 2015 Mar 3. [PMID: 25874061]
42. Gebauer M, Frommelt L, Achan P, Board TN, Conway J, Griffin W, Heidari N, Kerr G, McLaren A, Nelson SB, Nijhof M, Zahar A. Management of fungal or atypical periprosthetic joint infections. *J Arthroplasty*. 2014 Feb;29(2 Suppl):112-4. doi: 10.1016/j.arth.2013.09.049. Epub 2013 Oct 1. [PMID: 24360494]
43. Brown TS, Petis SM, Osmon DR, Mabry TM, Berry DJ, Hanssen AD, Abdel MP. Periprosthetic Joint Infection With Fungal Pathogens. *J Arthroplasty*. 2018 Aug;33(8):2605-2612. doi: 10.1016/j.arth.2018.03.003. Epub 2018 Mar 13. [PMID: 29636249]
44. Lee YR, Kim HJ, Lee EJ, Sohn JW, Kim MJ, Yoon YK. Prosthetic Joint Infections Caused by *Candida* Species: A Systematic Review and a Case Series. *Mycopathologia*. 2019 Feb;184(1):23-33. doi: 10.1007/s11046-018-0286-1. Epub 2018 Jul 26. [PMID: 30051279]
45. Kuiper JW, van den Bekerom MP, van der Stappen J, Nolte PA, Colen S. 2-stage revision recommended for treatment of fungal hip and knee prosthetic joint infections. *Acta Orthop*. 2013 Dec;84(6):517-23. doi: 10.3109/17453674.2013.859422. Epub 2013 Oct 31. [PMID: 24171675]
46. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol*. 2015;69:71-92. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330. [PMID: 26488273]
47. Phelan DM, Osmon DR, Keating MR, Hanssen AD. Delayed reimplantation arthroplasty for candidal prosthetic joint infection: a report of 4 cases and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2002 Apr 1;34(7):930-8. Epub 2002 Feb 26. [PMID: 11880958]
48. Glaudemans AWJM, Jutte PC, Cataldo MA, Cassar-Pullicino V, Gheysens O, Borens O, Trampuz A, Wörtler K, Petrosillo N, Winkler H, Signore A, Sconfienza LM. Consensus document for the diagnosis of peripheral bone infection in adults: a joint paper by the EANM, EBJIS, and ESR (with ESCMID endorsement). *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019 Apr;46(4):957-970. doi: 10.1007/s00259-019-4262-x. Epub 2019 Jan 24. [PMID: 30675635]

49. Renz N, Cabric S, Janz V, Trampuz A. Sonication in the diagnosis of periprosthetic infections : Significance and practical implementation. *Orthopade*. 2015 Dec;44(12):942-5. doi: 10.1007/s00132-015-3192-y. [PMID: 26572134]
50. Trampuz A, Perka C, Borens O. Gelenkprotheseninfektion: Neue Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie. *DtschMedWochenschr*. 2013 Aug;138(31-32):1571-3. doi: 10.1055/s-0033-1343280. Epub 2013 Jul 24. [PMID: 23884740]
51. Suerbaum S, Burchard BD, Kaufmann SHE, Schulz TF. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 8. Auflage. ISBN 978-3-662-48-677-1. S.618f
52. Leite PS, Figueiredo S, Sousa R. Prosthetic Joint Infection: Report on the One versus Two-stage Exchange EBJS Survey. *J BoneJtInfect*. 2016 Jan 20;1:1-6. doi: 10.7150/bji.14671. eCollection 2016. [PMID: 28529844]
53. Kühn KD, Lieb E, Berberich C. PMMA bone cement: What is the role of local antibiotics? *MaitriseOrthopédique N°243*, Commission Paritaire 1218T 86410 ISSN: 1148 2362.
54. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001 Sep;183(18):5385-94. [PMID: 11514524]
55. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*. 2002 Feb;70(2):878-88. [PMID: 11796623]
56. Miller RB, McLaren AC, Pauken C, Clarke HD, McLemore R. Voriconazole is delivered from antifungal-loaded bone cement. *Clin OrthopRelat Res* (2013) 471:195-200. 2012 Jul; DOI 10.1007/s11999-012-2463-8
57. Esen N, Yücesoy M, Yulug N. Evaluation of Semisolid Agar Screening Tests for Determining Fluconazole and Amphotericin B Susceptibilities of *Candida* Strains by Using Three Different Media. *J Chemother*. 2003 Feb; 15(1):37-42. [PMID: 12678412]
58. Yücesoy M, Guldaş NS, Yuluğ N. Disk diffusion method for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans* strains. *J Chemother*. 2001 Apr;13(2):161-6. [PMID: 11330363]
59. Sandven P, Lassen J. Importance of selective media for recovery of yeasts from clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1999 Nov;37(11):3731-2. [PMCID: PMC85742]
60. Cunningham B, McLaren AC, Pauken C, McLemore R. Liposomal formulation increases local delivery of amphotericin from bone cement: a pilot study. *Clin OrthopRelat Res*. 2012 Oct;470(10):2671-6. doi: 10.1007/s11999-012-2317-4. [PMID: 22467417]
61. Houdek MT, Greenwood-Quaintance KE, Morrey ME, Patel R, Hanssen AD. Elution of High Dose Amphotericin B Deoxycholate From Polymethylmethacrylate. *J Arthroplasty*. 2015 Dec;30(12):2308-10. doi: 10.1016/j.arth.2015.06.002. Epub 2015 Jun 11. [PMID: 26162513]
62. Goss B, Lutton C, Weinrauch P, Jabur M, Gillett G, Crawford R. Elution and mechanical properties of antifungal bone cement. *J Arthroplasty*. 2007 Sep;22(6):902-8. Epub 2007 Jul 25. [PMID: 17826283]
63. Deelstra JJ, Neut D, Jutte PC. Successful treatment of *Candida albicans*-infected total hip prosthesis with staged procedure using an antifungal-loaded cement spacer. *J*

- Arthroplasty. 2013 Feb;28(2):374.e5-8. doi: 10.1016/j.arth.2012.04.034. Epub 2012 Jul 17. [PMID: 22810009]
64. Marra F, Robbins GM, Masri BA, Duncan C, Wasan KM, Kwong EH, Jewesson PJ. Amphotericin B-loaded bone cement to treat osteomyelitis caused by *Candida albicans*. *Can J Surg*. 2001 Oct;44(5):383-6. [PMID: 11603753]
65. Roberts J, Bingham J, McLaren AC, McLemore R. Liposomal Formulation Decreases Toxicity of Amphotericin B In Vitro and In Vivo. *Clin OrthopRelat Res*. 2015 Jul;473(7):2262-9. doi: 10.1007/s11999-015-4232-y. [PMID: 25804880]
66. Harmsen S, McLaren AC, Pauken C, McLemore R. Amphotericin B is cytotoxic at locally delivered concentrations. *Clin OrthopRelat Res*. 2011 Nov;469(11):3016-21. doi: 10.1007/s11999-011-1890-2. [PMID: 21484472]
67. Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ. Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Mar;46(3):828-33. [PMID: 11850268]
68. Botero Aguirre JP, Restrepo Hamid AM. Amphotericin B deoxycholate versus liposomal amphotericin B: effects on kidney function. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Nov 23;(11):CD010481. doi: 10.1002/14651858.CD010481.pub2. [PMID: 26595825]
69. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Apr;17(2):255-67. [PMID: 15084500]
70. Grimsrud C, Raven R, Fothergill AW, Kim HT. The in vitro elution characteristics of antifungal-loaded PMMA bone cement and calcium sulfate bone substitute. *Orthopedics*. 2011 Aug 8;34(8):e378-81. doi: 10.3928/01477447-20110627-05. [PMID: 21815580]
71. Rouse MS, Heijink A, Steckelberg JM, Patel R. Are anidulafungin or voriconazole released from polymethylmethacrylate in vitro? *Clin OrthopRelat Res*. 2011 May;469(5):1466-9. doi: 10.1007/s11999-010-1643-7. Epub 2010 Oct 21. [PMID: 20963525]
72. Schmidt K, McLaren A, Pauken C, McLemore R. Voriconazole is cytotoxic at locally delivered concentrations: a pilot study. *Clin OrthopRelat Res*. 2013 Oct;471(10):3165-70. doi: 10.1007/s11999-013-2860-7. [PMID: 23436188]
73. Silverberg D, Kodali P, Dipersio J, Acus R, Askew M. In vitro analysis of antifungal impregnated polymethylmethacrylate bone cement. *Clin OrthopRelat Res*. 2002 Oct;(403):228-31. [PMID: 12360031]
74. Kullberg BJ, Sobel JD, Ruhnke M, Pappas PG, Viscoli C, Rex JH, Cleary JD, Rubinstein E, Church LW, Brown JM, Schlamm HT, Oborska IT, Hilton F, Hodges MR. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. *Lancet*. 2005 Oct 22-28;366(9495):1435-42. [PMID: 16243088]
75. Adler-Moore JP, Gangneux JP, Pappas PG. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. *Med Mycol*. 2016 Mar;54(3):223-31. doi: 10.1093/mmy/myv111. Epub 2016 Jan 14. [PMID: 26768369]

76. Cobo F, Rodríguez-Granger J, Sampedro A, Aliaga-Martínez L, Navarro-Marí JM. Candida Prosthetic Joint Infection. A Review of Treatment Methods. *J Bone Jt Infect.* 2017 Feb 5;2(2):114-121. doi: 10.7150/jbji.17699. eCollection 2017. [PMID: 28540147]
77. Czuban M, Wulsten D, Wang L, Di Luca M, Trampuz A. Release of different amphotericin B formulations from PMMA bone cements and their activity against Candida biofilm. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019 Aug 2;183:110406. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.110406. [Epub ahead of print] [PMID: 31401462]
78. Implants for surgery - Acrylic resin cements. ©ISO 5833:2002. Second edition – 2002-05-01
79. Czuban M, Wulsten D, Wang L, Di Luca M, Trampuz A. Release of different amphotericin B formulations from PMMA bone cements and their activity against Candida biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2019 June 29; doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110406
80. Wu SH, Hsu KY. Candidal arthritis in revision knee arthroplasty successfully treated with sequential parenteral-oral fluconazole and amphotericin B-loaded cement spacer. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011 Feb;19(2):273-6. doi: 10.1007/s00167-010-1211-4. Epub 2010 Jul 22. [PMID: 20652534]