

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael J. Raschke-

**Analyse der therapeutischen Wirksamkeit von
lokaler und systemischer Antibiotikatherapie
nach einzeitigem Implantatwechsel bei
Osteomyelitis im Ratteninfektmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Aschenbrenner, Fania Katharina
(geb. Goldmann)
aus Köln
2015

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1.Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Fuchs

2.Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Manuel Wenk

Tag der mündlichen Prüfung: 8.12.2015

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie**

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael J. Raschke-

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Fuchs

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Manuel Wenk

ZUSAMMENFASSUNG

**Analyse der therapeutischen Wirksamkeit von lokaler und systemischer
Antibiotikatherapie nach einzeitigem Implantatwechsel bei Osteomyelitis im
Ratteninfektmodell**

Aschenbrenner, Fania Katharina

Klinische Studien gestalten sich aufgrund der Menge der beeinflussenden Faktoren, eines meist sehr inhomogenen Patientenkollektivs und der Komplexität der Erkrankung sehr schwierig. Deshalb ist es umso wichtiger, valide und standardisierte Krankheitsmodelle zu entwickeln, mit denen man eine exakte Simulation des pathophysiologischen Verlaufes der Osteomyelitis erzeugen kann, um Therapieansätze evaluieren zu können.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Präsentation eines standardisierten, reproduzierbaren Osteomyelitis-Tiermodells, das der experimentellen Evaluation von verschiedenen einzeitigen Therapiemöglichkeiten bei einer implantatassoziierten Osteomyelitis dienen soll.

Die weiterhin steigende Rate an implantatassoziierten Knocheninfektionen und Erregerresistenzen und die damit verbundenen einschneidenden Konsequenzen für die betroffenen Patienten machen eine intensivere und weitergehende Osteomyelitisforschung notwendig, mit deren Hilfe man wissenschaftliche Erkenntnisse mit klinischen Erfahrungen zur Verbesserung der Osteomyelitistherapie kombinieren kann.

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, den therapeutischen Einfluss des einzeitigen Implantatwechsels eine Woche post infectionem auf den Verlauf der implantatassoziierten Osteomyelitis zu untersuchen und in diesem Zusammenhang die Wertigkeit einer lokalen gegenüber einer systemischen Antibiotikatherapie zu vergleichen. Dazu wurde der Implantatwechsel, der Wechsel auf ein lokales Drug-Delivery-System mit Gentamicin und die reine Entfernung in ihrer Wertigkeit verglichen und mit einer systemischen Antibiotikagabe ergänzt.

Wir etablierten in diesem Tiermodell den einzeitigen Implantatwechsel und verwendeten für die Auswertung eine klinische, radiologische, mikrobiologische, histologische und immunhistochemische Diagnostik, um eine möglichst detaillierte Evaluation und klinische Vergleichbarkeit zu erreichen.

Unsere Auswertungen zeigten eine deutliche Überlegenheit der kombinierten lokalen und systemischen Antibiotikatherapie gegenüber der Explantation des Implantates und einer nicht-kombinierten Antibiotikatherapie.

Das hier vorgestellte Ratten-Infektmodell ist valide, gut reproduzierbar und bietet somit die Möglichkeit, andere wichtige Faktoren, wie Frakturen oder Gewebeischämie kontrolliert in ihrem Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu untersuchen oder weitere antimikrobielle oder immunmodulierende Medikamente in der lokalen und systemischen Anwendung zu evaluieren, um die Forschung in diesem Bereich auszuweiten und eine Eindämmung der implantatassoziierten Osteomyelitis zu erreichen.

Tag der mündlichen Prüfung: 8.12.2015

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Analyse der therapeutischen Wirksamkeit von lokaler und systemischer
Antibiotikatherapie nach einzeitigem Implantatwechsel bei
Osteomyelitis im Ratteninfektmodell

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Universitätsklinikum Münster

Klinik und Poliklinik für Unfall- Hand- und Wiederherstellungschirurgie

unter der Anleitung von:

Priv.-Doz. Dr. Thomas Fuchs und Dr. rer. nat. Nancy Tholema

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Name/ Unterschrift

**Meinem Ehemann,
meinen Eltern
und Großeltern**

Lebenslauf:

Auf den Lebenslauf wird in der digitalen Version verzichtet

INHALTSVERZEICHNIS:	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	
2.1. Verwendete Materialien	25
2.2. Versuchstiere	27
2.3. Studiendesign	27
2.4. In Vivo-Infektion	29
2.4.1. Erreger	29
2.4.2. Operative Eingriffe	30
2.5. Verlaufskontrollen	32
2.6. Tötung	33
2.7. Mikrobiologische Auswertung	34
2.8. Immunhistochemische Auswertung	36
2.9. Zytochemische Substratfärbung	42
2.10. Statistik	43
3. Ergebnisse	
3.1. Verlaufskontrollen	44
3.1.1. Körpertemperatur	44
3.1.2. Körpergewicht	45
3.1.3. Hämoglobin	46
3.1.4. Hämatokrit	47
3.1.5. Leukozyten	49
3.2. Mikrobiologische Auswertung	50
3.2.1. Keimzahl im Inokulat	50
3.2.2. Keimzahl im Knochenmehl	51
3.2.3. Implantat-Auswertung	55
3.2.4. Systemischer Keimnachweis	59
3.2.5. SCV-Diagnostik	60
3.3. Immunhistochemische Auswertung	62
3.3.1. Quantitative Flächenberechnung	62

3.3.2. Deskriptive Beurteilung	65
3.4. Zytochemische Substratfärbung	67
3.4.1. Osteoklastenzahl	67
3.4.2. Zellkernzahl der Osteoklasten	68
3.5. Histologische Auswertung	69
3.6. Radiologische Auswertung	69
4. Interpretation der Ergebnisse	71
5. Diskussion	76
6. Zusammenfassung	84
7. Literaturverzeichnis	85
8. Illustrationsverzeichnis	99
9. Abkürzungen	104
10. Danksagung	105
11. Anhang	
• Resistogramm <i>S.aureus</i>	I
• Tabelle: prozentuale Abweichung zum Ausgangsgewicht	II
• Genehmigung des Tierversuches G47/2004	III
• Teilnahmebescheinigung Versuchstierkudkurs	IV

1. Einleitung

Die Osteomyelitis ist ein entzündlicher Prozess intra- bzw. periostal, der akut, subakut oder chronisch verlaufen kann und mit Knochendestruktionen einhergeht[2-4].

Ursache sind infektiöse Mikroorganismen, die durch unterschiedliche Übertragungswege in den menschlichen Körper gelangen können. Dieser Prozess kann auf eine einzelne Region begrenzt sein, wie auf das Knochenmark (Myelitis), die Kompakta (Osteitis) und das Periost (Periostitis) oder auf angrenzendes Weichteilgewebe bzw. andere Lokalisationen übergreifen[5]. Die Osteomyelitis findet Bedeutung in nahezu allen medizinischen Fachrichtungen und betrifft durchweg alle Bevölkerungsschichten und Altersklassen [6].

Die Osteomyelitis ist eine der ältesten Erkrankungen, die die Menschheit und die Medizin schon seit Jahrtausenden intensiv beschäftigt und vor immer neue Herausforderungen stellt. So wurden die ersten menschlichen Überreste mit Anzeichen einer Osteomyelitis an einem Neandertaler aus der letzten Eiszeit entdeckt[7]. Die ersten Funde einer Osteomyelitis reichen sogar 250–291 Millionen Jahre bis in die Perm-Zeit zurück. Aus dieser Zeit fand man Knochen eines Dimetrodon, eines Reptils, das eine Wirbelsäulenfraktur aufwies und an dieser Stelle die typische Morphologie einer Entzündung zeigte.[8].

Bevor man die Pathogenese der Osteomyelitis komplett verstand, nannte man dieses Krankheitsbild einfach „Nekrose“, aufgrund des massiven Gewebeunterganges im Knochen aber auch im Weichteilgewebe[9]. 1844 war es dann Auguste Nelaton (1807-1873), einer der leitenden Chirurgen von Paris, der den griechischen Begriff „Osteomyelitis“ einführte[10].

Die akute hämatogene Osteomyelitis sieht man häufig bei präpubertierenden Kindern (Inzidenz: 2,9-4/100.000 Kinder/Jahr (mit Arthritiden), aber auch, wenn auch seltener, beim älteren Erwachsenen [11,12]. Ursächlich ist hier meist eine endogene Infektion im Körper. Lokalisiert ist die Infektion überwiegend in den Metaphysen der langen Röhrenknochen, v.a. in der Femur und Tibia [13].

Die relative Häufigkeit von hämatogener und rezidivierender Osteomyelitis nimmt im Alter kontinuierlich ab, umgekehrt steigt die Inzidenz von exogenen Knocheninfektionen nach Gelenkersatz, komplizierten chirurgischen Eingriffen und Wundinfektionen stetig an[14].

Diese, im Alter immer häufiger werdende, exogene Osteomyelitis entsteht oft posttraumatisch nach offenen Frakturen (Inzidenz: 5-33%, je nach Schweregrad) [15,16]. Bei Grad III-Frakturen (Gustilo-Andersson-Klassifikation) sind es sogar 13,7-52%, wobei vor allem der Grad der Kontamination, der Gewebeerstörung und der Ischämie ausschlaggebend ist [17-22]. Die Tibia ist der am häufigsten beteiligte Knochen bei offenen Frakturen und daher auch die vorrangigste Lokalisation einer posttraumatischen Osteomyelitis[23,24].

Nach elektiven orthopädisch-chirurgischen Eingriffen beträgt das Risiko einer Knocheninfektion 0,7-4,2%, wobei die Infektionsrate immer auch abhängig von der angewandten Operationstechnik ist und vor allem davon, ob Fremdmaterial wie Gelenkprothesen oder Implantate in den Körper eingebracht wurden [25-27]. Infektionen sind häufiger nach totalen Knieendoprothesen als nach totalen Hüftendoprothesen und sogar bis zu dreifach höher bei Revisionseingriffen als bei primärem Gelenkersatz[26]. In 1-5% verursachen hauptsächlich Infektionen das Versagen eines primären Gelenkersatzes[28].

30-40% aller postoperativen bzw. posttraumatischen Infektionen gehen in eine Osteomyelitis über[29,30]. Besonders häufig entstehen posttraumatische Osteomyelitiden während eines Krankenhausaufenthaltes durch nosokomiale Besiedlung [22].

Faktoren, die das Risiko für eine postoperative Infektion erhöhen, sind die Dauer der Operation, die Länge des Krankenhausaufenthaltes, rheumatoide Arthritis, vorherige chirurgische Eingriffe an dem betroffenen Gelenk und die individuelle anatomische Situation [27,31].

Verglichen mit anderen prothetischen Implantaten, wie zum Beispiel der künstlichen Herzklappe, ist die Infektion einer Gelenkprothese eine der schwerwiegendsten Komplikationen mit bedeutenden klinischen und ökonomischen Konsequenzen[32]. Die Behandlungskosten und Rentenleistungen liegen im Rahmen der posttraumatischen Osteomyelitis um das 5-7,5 fache höher als bei gleichartigen Verletzungen mit komplikationslosem Verlauf [33,34].

Ein gesunder Knochen ist normalerweise in hohem Maße resistent gegenüber einer Infektion. Ein großer Gewebeschaden, offene Frakturen (Grad III), Knochennekrosen oder Implantateinbringungen (traumatisch/operativ) aber auch ein hohes Alter, Adipositas, rezidivierende Harnwegsinfekte, orale Einnahme von Kortikoiden, vorausgegangene Bestrahlung, ein geschwächtes Immunsystem, Diabetes mellitus

und periphere Durchblutungsstörungen verändern das Gleichgewicht zugunsten des Erregers und somit der Infektion [14,35-39].

Ein immer bedeutsamer werdender Risikofaktor für die Osteomyelitis ist die vaskuläre Insuffizienz, die häufig durch einen schlecht eingestellten Diabetes mellitus oder eine pAVK verursacht ist[23]. Erfahrungsgemäß folgt dann die Knocheninfektion einer Weichteilinfektion, die auf dem Boden einer Gewebeischämie, einer azidotischen Stoffwechsellage und einer motorischen, sensorischen oder autonomen Neuropathie entsteht [5,40].

Wichtig für den Verlauf und die Prognose ist vor allem die Einteilung der Osteomyelitis anhand der Pathogenese[5].

Die hämatogene Osteomyelitis kann einen akuten, subakuten oder sekundär chronischen Verlauf zeigen und entsteht durch eine Bakteriämie auf dem Boden eines Infektionsherdes im Körper. Dies sind bei Säuglingen oft Nabelschnurinfektionen, eitrige Pyodermien, Pemphigus oder otogene Entzündungen, bei Erwachsenen oder Jugendlichen eher Angina, Pneumonie, Abszesse, eine Pyelonephritis oder Insektenstiche[13]. Die Inzidenz ist niedrig und zeigt eine fallende Tendenz. Die häufigsten Erreger sind der *S. (Staphylokokkus) aureus* (50-80%), *Streptokokken der Gruppe A* (5-10%) und der *Staphylokokkus pneumoniae* (1-4%). Es sind überwiegend die langen Röhrenknochen (Femur/Tibia/Humerus) betroffen.

Bei früher Diagnosestellung und Therapiebeginn ist die Prognose sehr gut. In 80% kommt es zu einem völligen Ausheilen der Osteomyelitis, selten treten Komplikationen wie der Übergang in eine chronische Osteomyelitis, gestörtes Längenwachstum und Gelenkdeformierung auf[41]. Eine Sonderform ist hier die Knochentuberkulose, die durch hämatogene Streuung des *Mycobakterium tuberculosis* von einem Primärherd entsteht und meist die Wirbelkörper befällt[42].

Der Übergang in die chronische hämatogene Osteomyelitis ist selten und tritt vor allem bei Erwachsenen auf. Sonderformen sind hier der Brodie-Abszess, ein abgekapselter Solitärherd, den man vor allem im distalen Femur oder Tibiakopf findet, die sklerosierende Osteomyelitis (Garrè), die sich als sklerosierende Knochenverdickung in den langen Röhrenknochen darstellt und die plasmazelluläre Osteomyelitis, bei der man subperiostale Exsudationsansammlungen mit plasmazellreichem Granulationsgewebe findet[42].

Die exogen bedingte Osteomyelitis, die aufgrund einer Kontamination und somit der direkten (per continuitatem) oder indirekten Inokulation von Erregern in Verbindung mit einem angrenzenden Weichteilinfekt (z.B. diabetischer Fuß), posttraumatisch nach

einem Unfall oder einer Operation entsteht, kann in jedem Alter auftreten und jeden Knochen betreffen. Als exogene, posttraumatische Infektion bezeichnet man auch die implantatassoziierte Osteomyelitis, die in der heutigen unfallchirurgischen und orthopädischen Chirurgie sowie in dieser Arbeit eine große Rolle spielt[6].

Bei der posttraumatischen Osteomyelitis sind es vor allem die offenen Frakturen und der massive Gewebsschaden mit hohem Verunreinigungs- und Ischämiegrad, die die Infektion begünstigen [21,22]. Die Erreger können so durch die verletzte Hautbarriere in das Weichteil- oder sogar direkt in das Knochengewebe eindringen. Gerade verunreinigtes, ischämisches oder schon nekrotisches Gewebe mit koagulierten Blutbestandteilen oder verletztem Knochengewebe bietet ein optimales Milieu für die Adhäsion und Vermehrung von Bakterien[23]. Viele Bakterien, vor allem der *Staphylokokkus aureus* und der *Staphylokokkus epidermidis* sind in der Lage, spezielle Adhäsion-Rezeptoren zu produzieren, um an Knochen- bzw. Knorpelbestandteilen wie Fibronectin, Laminin, Kollagen und Sialoglycoproteinen oder Metallimplantaten anzuhaften [43,44], wobei intaktes Gewebe immer ein schlechteres Medium zur Adhäsion von Bakterien ist als verletztes[22].

Während einer Infektion kommt es zum einen zu einer Vermehrung von körpereigenen Entzündungszellen, vor allem der Makrophagen und Monozyten, die über Phagozytose die eingedrungenen Mikroorganismen aufnehmen und diese mit Hilfe von toxischen Radikalen und proteolytischen Enzymen zerstören, wobei auch umliegendes Gewebe geschädigt wird. Zum anderen bilden diese Entzündungszellen auch zahlreiche Mediatoren, die die körpereigene Abwehr aktivieren und modulieren sollen, wie zum Beispiel die Interleukine IL-1 und IL-6 [3,45]. Dazu gehören auch Chemokine wie das Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1), das von Endothelzellen im Rahmen einer Entzündung durch Aktivierung von Zytokinen gebildet wird und die Einwanderung von Monozyten in das entzündete Gewebe aktivieren soll[46]. Für deren Rolle in der Pathogenese der Osteomyelitis spricht der entzündungshemmende Einfluss durch eine Blockade dieser Zytokine und Chemokine z.B. durch Antikörper oder andere immunmodulierende Therapieansätze[47,48].

Die erste Abwehr des Körpers auf eine akute Osteomyelitis ist eine akute Entzündungsreaktion, die eine Vielzahl von Reaktionen, wie lokale Vasodilatation, Gewebeödem, Migration von polymorphkernigen Leukozyten, Granulozyten und eine erhöhte Aktivität von phagozytierenden Zellen nach sich zieht[5,22]. Für den Erfolg dieser körpereigenen Abwehr spricht, dass es trotz der traumabedingten starken

bakteriellen Kontamination in 60-70% der offenen Frakturen sehr viel seltener zu einer manifesten Infektion kommt [49,50].

Knochen ist ein faserverstärktes, kalzifiziertes Gewebe, das einem ständigen Auf- und Abbau unterliegt und in gesundem Zustand extrem resistent gegenüber Infektionen ist[51].

Dieses sogenannte Remodelling wird hauptsächlich durch das Zusammenspiel der Osteoblasten, die Knochensubstanz aufbauen, und der Osteoklasten, die Knochensubstanz abbauen, bestritten[52,53]. Die Aktivierung, die Deaktivierung und die gegenseitige Modulation sind komplexe Vorgänge, die durch zahlreiche Faktoren, wie Hormone, Zytokine, Leukotriene, Wachstumsfaktoren, bakterielle Mediatoren, Toxine und vieles mehr bestimmt werden. Abwehrzellen wie neutrophile Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen sind in der Lage, selbst Knochen abzubauen[54,55]. Durch einwandernde Leukozyten, abgestorbene Zellen und Gewebe werden kleine Gefäße verstopft, was zu einer Druckerhöhung im Knochengewebe und somit zu einer verminderten Durchblutung mit Absinken des pH-Wertes und der Sauerstoffsättigung führt. Die resultierende Ischämie zieht einen weiteren Gewebeuntergang nach sich[13]. Es können sich vereinzelt Teile des Knochens, die nicht mehr durchblutet werden vom übrigen Gewebe abkapseln und sog. Sequester oder auch Abszesse bilden, was den Übergang in die chronische Osteomyelitis kennzeichnet. So können sie geschützt vor den Abwehrmechanismen des Körpers und antibiotischer Therapie fortbestehen. Da Abwehrzellen und Antibiotika nicht in ischämische Gebiete bzw. Sequester oder Abszesse gelangen, schlägt die medikamentöse Therapie der Osteomyelitis so oft fehl[5].

Durch die lokale Interaktion zwischen Oberflächenantigenen der Bakterien und Immunzellen des Wirtes mit anschließender Sekretion von Zytokinen, lysosomalen Enzymen und Toxinen wird ein Untergang von Weichteil- und Knochengewebe verursacht[35,56]. Als potentielle Osteolysefaktoren sind vor allem die Zytokine IL-1, IL-3, IL-6, IL-11 und TNF α zu nennen, die von Entzündungszellen, Osteoblasten oder mononuklearen Zellen im Knochenmark ausgeschüttet werden [3,57-59]. IL-1 wird in seiner Wirkung teilweise durch Prostaglandin verstärkt[60].

Interleukin-6 stimuliert zusätzlich zur direkten Knochenresorption die Bildung von Vorläuferzellen der Osteoklasten[60-62]. Zudem werden nach einer Fraktur vermehrt Arachidonsäurederivate, wie z.B. Prostaglandin E₂, ausgeschüttet, das als starker Agonist für Osteoklasten wirkt[3].

Es ist noch nicht restlos geklärt, wie die Bakterien selber zu einer Störung des Osteoblasten-/ Osteoklasten-Systems mit der Folge eines Knochensubstanzverlustes führen. Ein Ansatz besagt, dass sie zum Beispiel amorphe Knochenanteile über Säure- und Proteasenfreisetzung (Endotoxine und Lipopolysaccharide) zerstören, außerdem sollen sie z.B. über die Stimulation der Zytokin-Synthese weitere zelluläre Prozesse fördern, die den Knochenabbau aktivieren. Durch Endotoxine und Lipopolysaccharide können die Bakterien selbst die Synthese der Knochenmatrix hemmen und verschiedene Bakterienbestandteile sind in der Lage, als Modulatoren für den Knochenabbau zu agieren[52].

S. aureus bewirkt zum Beispiel am Osteoblasten die Sekretion von IL-6 und MCP-1[45].

Die Hauptaktivatoren der Osteoklasten sind die Osteoblasten[63,64]. Sie stammen von pluripotenten mesenchymalen Zellen ab, wobei die Osteoklasten aus myeloiden Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Reihe entstehen, die sich zu mononukleären Preosteoklasten differenzieren und dann durch gegenseitige Fusion zu reifen multinukleären Osteoklasten werden[52,53].

Die Osteoklasten besitzen eine resorptive Vorderseite, die der zu resorbierenden Knochenmatrix aufliegt. Diese zur Umgebung abgeschlossene Seite bildet einen Faltsaum (ruffled border) in dem u.a. die H⁺-ATPase sitzt. So kann hier ein niedriger pH-Wert von ca. 4,5 erreicht werden, durch den die Calcium-Verbindungen des Knochengewebes aufgelöst werden. Zusätzlich werden hier vom Osteoklasten selbst lysosomale Enzyme zum Abbau der organischen Knochenmatrix gebildet. Schließlich kommt es zu einer rezeptorvermittelten Endozytose der abgebauten Matrixfragmente. Nach ca. 1-2 Wochen kann man an der Stelle lichtmikroskopisch eine osteolytische Grube, die sog. Howship'sche Lakune erkennen. Der Osteoklast kann diese Grube verlassen und an anderer Stelle weiter Knochengewebe resorbieren[65,66].

Um den klinischen Verlauf der posttraumatischen Osteomyelitis abzuschätzen und die richtige Therapiestrategie wählen zu können, sollte man diese Erkrankung nach verschiedenen Gesichtspunkten klassifizieren. Zum einen ist der zeitliche und klinische Verlauf ausschlaggebend, dieser kann akut oder chronisch sein, wobei die akute Form mit einer schwereren Allgemeinsymptomatik wie erhöhte Entzündungswerte, Fieber, Nachtschweiß und akuten Entzündungszeichen wie Überwärmung, Schwellung, Rötung, Schmerzen und Bewegungseinschränkung innerhalb der ersten 4 Wochen postop einhergehen kann [3,38,67].

Der chronische Verlauf zeigt eine eher abgeschwächte Klinik[23], die aber oft Komplikationen nach sich zieht und deswegen weitaus schwieriger zu therapieren ist. Die chronische Osteomyelitis zeigt, durch den Versuch des Körpers den Prozess einzudämmen, charakteristischerweise das Vorhandensein von Knochennekrosen, Sequestern und Abszessen. Es können auch Anbauten von neuem Knochengewebe um Nekrosen herum (Involucrum), Fehlstellungen von betroffenen Gelenken und somit Deformitäten von betroffenen Knochen entstehen. Da diese neuen Anbauten nicht die Stabilität eines gesunden Knochens aufweisen, kann diese Hülle mitunter aufbrechen und Eiter, bzw. Nekrosebestandteile gelangen über die Havers- und Volkmannkanäle oder Blutgefäße in weitere Knochenanteile oder unter das Periost und schließlich in das umliegende Gewebe. Letztendlich können sie über einen Fistelgang zur Hautoberfläche gelangen und so nach außen drainieren. Die chronische Osteomyelitis kann in Sequestern oder Abszesshöhlen über Monate bis Jahre persistieren und irgendwann wiederauftreten [38,68].

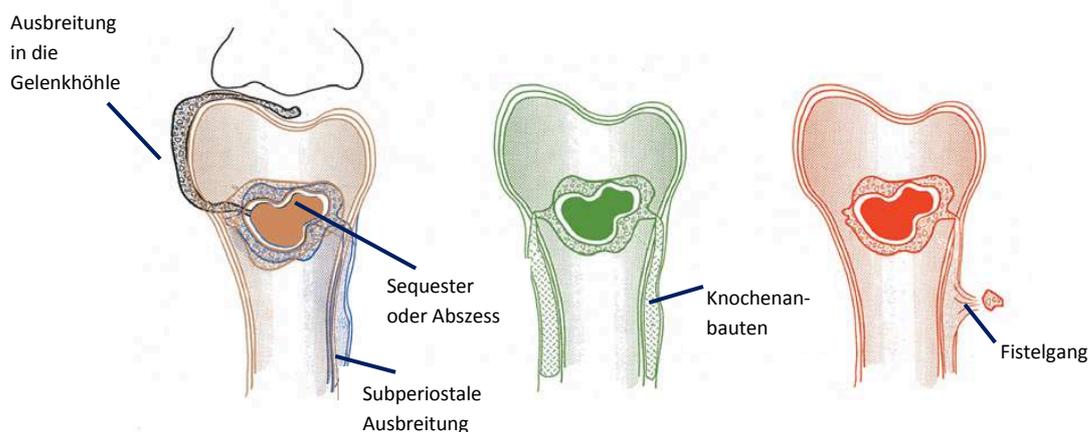


Abbildung 1: Pathogenetische Charakteristika der chronischen Osteomyelitis, abgeändertes Schema nach Jauregui LE ed. Diagnosis and management of bone infections. New York: Marcel Dekker, 1995:37-108, zit.n.[5]

Eine weiterführende, für die Auswahl der geeigneten Therapie sehr hilfreiche Klassifikation der Osteomyelitis in den langen Röhrenknochen ist die von Cierny und Mader[39]. Sie berücksichtigt den gesundheitlichen Zustand, die vorhandenen Risikofaktoren des Patienten und die anatomische Lokalisation bzw. den Grad der Ausprägung der Osteomyelitis und wird im Zusammenhang mit der Therapie nochmal näher erläutert.

Die Infektion ist die häufigste Komplikation nach der operativen Frakturversorgung. Die Inzidenz ist sehr niedrig, aber die vergleichbar hohe Zahl von Implantaten weltweit, die

teilweise unter ungünstigen hygienischen und chirurgischen Bedingungen eingebracht werden, lässt die Anzahl der Fälle beachtlich steigen[69].

Ein Fremdkörper ist ein hoher Risikofaktor für die Entstehung einer Infektion, da die Persistenz und die Infektiosität von Erregern erhöht werden. Schon 1957 konnte man nachweisen, dass ein einziger Seidenfaden *in vivo* ausreicht, um die zur Infektionsauslösung benötigte Keimmenge um den Faktor 10^4 zu minimieren[70].

Die implantatassoziierte Osteomyelitis wird nach dem zeitlichen Auftreten der Infektion eingeteilt [27,32]. Treten Symptome einer Entzündung in den ersten 3 Monaten postoperativ auf, so spricht man von einer Frühinfektion, die zumeist von Bakterien verursacht wird, die durch eine offene Fraktur oder perioperativ in den Körper gelangen. Von einer Spätinfektion spricht man, wenn die ersten Symptome erst nach mehr als drei Monaten auftreten. Diese kann hämatogen bedingt sein oder durch wenige perioperativ gestreute Bakterien verursacht werden. Sie entwickelt sich eher langsam und ist deshalb auch schwieriger zu diagnostizieren[37,42,71].

Bei der notwendigen Verwendung eines Implantates sind die Größe, die Kontaktfläche, die Form sowie vor allem das Material des Implantates wichtige Einflussgrößen in der Entstehung der Infektion[72,73]. So setzt zum Beispiel ein intramedullär eingebrachtes Polymethylmetacrylatimplantat die Infektionsresistenz des Knochens deutlich mehr herab als Stahl- Kobaltchrom- oder Polyethylenimplantate[74]. Auch zwischen Stahlplatten (75%) und Titanplatten (35%) gibt es signifikante Unterschiede in der resultierenden Infektionsrate bei einer durch *S. aureus* kontaminierten Frakturversorgung[69]. Bei der Wahl des Materials sind die Oberflächeneigenschaften und die Biokompatibilität entscheidend[74,75]. Es sollte im Gewebe gut verträglich sein, keine allergischen Reaktionen auslösen und möglichst wenig Abrieb haben[76]. Der Körper sollte also möglichst wenig auf das eingebrachte Material reagieren, wie zum Beispiel mit Abkapselung, Fibrosierung oder anderen entzündlichen Reaktionen.

Jedes in den Körper eingebrachte Implantat wird nach Implantation durch körpereigene Reaktionen sofort mit einer inhomogenen Schicht aus Proteinen, Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Laminin oder Kollagen besetzt. Dieser Überzug bildet einen sog. „conditioning film“, der besonders gut als Adhäsionsfläche für körpereigene Zellen aber auch für eingedrungene Erreger dient. Fibrinogen oder Fibrin ist dabei der wichtigste Faktor für die Adhäsion des *Staphylokokkus aureus* an einem Implantat [77,78].

Körpereigene Zellen und eingedrungene Erreger konkurrieren wie in einem Wettstreit („race of the surface“) um die zu besetzende Oberfläche, da jeder Mikroorganismus für

ein optimales Wachstum und eine optimale Entwicklung von dieser abhängig ist[75,79-81]. Eine Infektion wird erschwert oder sogar verhindert, wenn die körpereigenen Zellen die Implantatoberfläche zuerst besetzen können und so das Anheften der Erreger verhindern[80].

Haben die Bakterien die Implantatoberfläche besetzt, sind viele von ihnen in der Lage, einen sogenannten Biofilm zu bilden, der sie vor Abwehrmechanismen des Körpers oder einen antibiotischen Angriff schützt[82]. Diese Fähigkeit besitzt vor allem der *Staphylokokkus epidermidis*, der vornehmlich implantierte Katheter, Infusionsnadeln oder künstliche Herzklappen besetzt[83]. Mehr als 30% der hospitalisierten Patienten haben irgendeine Art von Gefäßkatheter.

Und auch der hier verwendete *Staphylokokkus aureus* ist in der Lage, durch die Synthese von bakterieller extrazellulärer Matrix aus Polysacchariden, Adhäsinen und andere, die durch die Implantatoberfläche und andere Mediatoren induziert wird, einen Biofilm zu bilden[84]. Dabei besiedelt er vor allem Metallimplantate[85].

Der Biofilm bereitet ein entwicklungsförderndes Mikroklima mit vielen Nährstoffen, virulenz- und energiesteigernden Faktoren und macht die Eradikation einer entstandenen Infektion sehr schwierig, bis das infizierte Implantat entfernt wird[86,87].

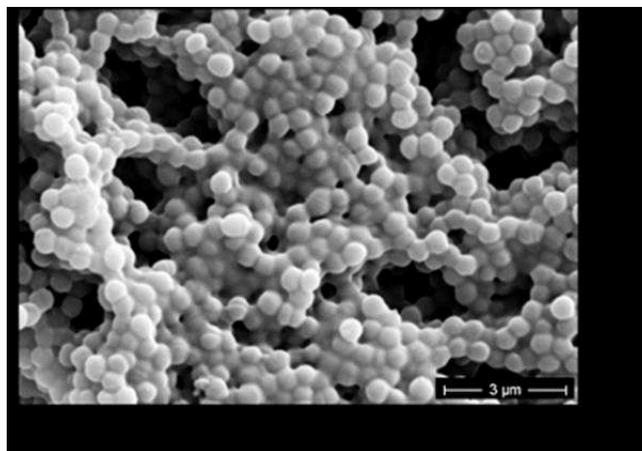


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilmes, gebildet durch *Staphylokokkus aureus*-Kolonien, (© 2001–2006 by Alfred B. Cunningham, Center for Biofilm Engineering & Rockford J. Ross, Department of Computer Science, Montana State University, Montana)

Je nach Erreger kann es sich um eine unspezifische (z.B. durch *S.aureus*,) oder eine spezifische (*Mykobakterium tuberculosis*, sog. Knochentuberkulose, Pilze, *Treponema pallidum*) Infektion handeln[13]. Der häufigste Erreger aller Osteomyelitiden ist mit ca. 40-50% der *Staphylokokkus aureus*[6].

Als Haupterreger der akuten, hämatogenen Osteomyelitis ist je nach Studie mit bis zu 48-85% der *Staphylokokkus aureus*, in 14,5% *Mykobakterium tuberculosis*, *Escherichia coli* mit 6,4% und in ca.10% die *koagulase-negativen Streptokokken* zu nennen. In ca. 8% findet man Mischkulturen und in ca. 4% keine Erreger[4,12,13,88].

Bei der chronischen Osteomyelitis werden am häufigsten *Staphylokokkus aureus*, *Staphylokokkus epidermidis* und immer mehr gram-negative Stäbchen wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* und *Escherichia coli* gefunden, wobei hier nach multiplen Eingriffen und Antibiotikatherapien die polymikrobielle Infektion keine Seltenheit mehr ist[6,89,90].

Das Erregerspektrum der häufigen posttraumatischen Osteomyelitis mit all ihren Komplikationen hängt zum einen davon ab, wie groß der Gewebeschaden von Weichteilmantel und Knochen ist und ob dort eine starke Verschmutzung vorliegt und zum anderen, ob Metallimplantate/-platten zur Stabilisierung des Knochens im Behandlungsverlauf in das Wundgebiet eingebracht wurden. Nach offenen Frakturen können auch sog. Erd- und Pfützenkeime wie *Clostridium spp.* oder *Bacillus spp.*, etc. gefunden werden [88].

Es ist auffällig, dass man trotz der anfänglichen Kontamination dieser Wunden mit Keimen vom Zeitpunkt bzw. Ort des Unfalles in den meisten Fällen einer folgenden posttraumatischen Osteomyelitis eher nosokomiale Erreger wie den *Staphylokokkus aureus* (51,9-80%) oder *gram-negative Stäbchen* wie *Escherichia coli* oder *Pseudomonas aeruginosa* findet [22,91,92]. Bei elektiven Eingriffen können sogar in 70-90% der postoperativen Osteomyelitis die Hautkeime *Staphylokokkus aureus* und *Staphylokokkus epidermidis* isoliert werden[26,27,85]. Wird die posttraumatische Osteomyelitis chronisch, findet man weiterhin den *Staphylokokkus aureus* als häufigsten isolierten Erreger[90,93].

Mischinfektionen mit Anaerobiern oder gram-negativen Erregern wie dem *Pseudomonas aeruginosa* liegen in ca. 30% der Fälle, besonders bei chronischen Rezidivinfektionen und immunkompromittierten Patienten, vor[92].

Es wurde zudem eine zunehmende Verbreitung gram-negativer Knocheninfektionen festgestellt[92].

Invasive medizinische Maßnahmen gehören zu den wichtigsten Risikofaktoren für eine Infektion. Die Abwehrmechanismen des Menschen werden durchbrochen und im Falle von Kontaminationen kann es leicht zu resistenten chronischen Infektionen oder sogar Gewebnekrosen kommen. Implantat-Einbringungen sind für fast 45% von nosokomialen Infektionen verantwortlich. Implantatassoziierte Infektionen zeichnen

sich durch eine hohe Resistenz gegenüber Antibiotikatherapie aus und persistieren meist, bis das Implantat entfernt wird, was die Standardtherapie ist[94,95].

Der *Staphylokokkus aureus* ist ein kugelförmiges, gram-positives Bakterium, das zur physiologischen Flora des Menschen gehören kann und dort v.a. die Schleimhäute im Nasen- und Rachenbereich besiedelt. *Staphylokokkus aureus* findet man vor allem bei implantatassoziierten Infektionen[85]. Er ist charakterisiert durch seine hohe Affinität zum Knochengewebe und seine schnelle Induktion zur Resorption von Knochenmatrix und damit der Entstehung von Knochennekrosen [96]. Das Anheften von koagulase-positiven und –negativen *Staphylokokken* an verschiedenen Oberflächen wird zudem durch die Matrixproteine Fibronectin, Fibrinogen und Laminin signifikant verbessert[43]. Manche Bakterien können sich neben der Bildung eines Biofilmes durch intrazelluläres „Verstecken“ sowie durch eine gedrosselte Stoffwechselrate der Wirtsabwehr und auch dem Antibiotikaangriff entziehen[35,97]. Diese Subspezies einer Bakterienpopulation nennt man „Small Colony Variant“ (SCV). Diese kann durch verschiedenartige Mutationen entstehen und wurde Anfang des 19. Jahrhunderts zum ersten Mal beschrieben[98].

Die SCV des *Staphylokokkus aureus* ist die am besten untersuchte Variante und kann durch verschiedene Mutationen im Elektronentransportsystem entstehen, die sich hauptsächlich auf die Menadione- und Haemin-Biosynthese auswirken[99,100]. Durch diese Mutationen wird der Stoffwechsel gebremst. Daher zeigen die SCV ein stark verlangsamtes Wachstum mit einer veränderten Morphologie ihrer Kolonien. Auf einer Blutagarplatte kann man die Colony Forming Units (CFU) meist erst nach 42-74 Std. identifizieren, die CFU sind bis zu 10 mal kleiner als die des Urtyps und zeigen eine reduzierte Pigmentierung. Das macht die mikrobiologische Identifizierung schwierig[97].

Außerdem ist eine verminderte Koagulase-Aktivität und Hämolysefähigkeit charakteristisch. Ebenfalls auf den Defekt im Elektronentransport ist zurückzuführen, dass die SCV des *Staphylokokkus aureus* eine Resistenz gegen Aminoglycoside zeigen, weniger Alpha-Toxin produzieren und somit intrazellulär persistieren können. Man findet sie deshalb oft im Zusammenhang mit chronischen, rezidivierenden und persistierenden Infektionen, die lokal oder systemisch mit Aminoglycosiden, wie z.B. Gentamicin, therapiert wurden[97,101-104,162,163].

Die erfolgreiche Diagnose der posttraumatischen Osteomyelitis kann nur durch eine kombinierte Auswertung von Klinik, Bakteriologie, Histologie und bildgebenden Verfahren erreicht werden. Die Anamnese zu vorherigen Operationen, Infektionen, Therapien und zu Risikofaktoren für eine Infektion sowie eine gründliche körperliche Untersuchung auf Narben, Sekretion, Deformitäten, Instabilität und Bewegungseinschränkung sind wichtig und selbstverständlich[1,105].

Die vorherrschende Klinik der akuten posttraumatischen Osteomyelitis besteht erst aus den akuten Entzündungszeichen, wie Schwellung, Rötung und Überwärmung, die wenige Tage bis 3 Monate nach dem Trauma auftreten. Danach folgen Wundheilungsstörungen mit Eiter, Seromen oder Fistelbildungen, die oft mit Druckschmerz, Schmerz am Implantat und Bewegungseinschränkungen gekoppelt sind[106]. Die Entzündungsparameter wie CRP, Leukozytenzahl und BSG sind erhöht und die Patienten haben oft Fieber. Differentialdiagnostisch muss man auch an die Arthrose, Metastasen, einen Knochentumor, eine Metallose oder das Rheumatische Fieber denken[42].

Bei der chronischen posttraumatischen Osteomyelitis zeigt sich die Klinik meist schleichender. Oft beginnt es spät mit chronischen Hautveränderungen und sezernierenden Fistelgängen, wobei auch nekrotisches Knochengewebe freiliegen kann. Durch die Persistenz des Erregers kommt es oft zu Rezidiven an denselben Lokalisationen mit begleitendem Fieber [5].

Im akuten Schub oder beim Wiederaufflackern der Infektion ähnelt die Klinik kurzzeitig der akuten posttraumatischen Osteomyelitis[42].

Die sichere Diagnose einer posttraumatischen bzw. implantatassoziierten Osteomyelitis erfordert neben der Bildgebung immer einen invasiven mikrobiologischen und histologischen Nachweis einer Infektion. Dieser sollte möglichst prä- oder intraoperativ steril als tiefe Knochenbiopsie, Gelenkaspirat, Knochenkultur oder tiefen Wundabstrich entnommen werden[23,42,107]. Präoperativ entnommenes Gelenkaspirat bei einem infizierten künstlichen Kniegelenk vor dem operativen Wechsel ergab eine Sensitivität von 75% und eine Spezifität von 96%[108]. Diese Proben sollten möglichst vor einer antibiotischen Therapie oder mind. 24-48 Std. nach einer letzten Antibiotikagabe entnommen werden, damit das Ergebnis nicht falsch negativ wird[23]. Oberflächliche Abstriche sind weitestgehend wertlos, da sie entweder keine Keime oder viele verschiedene Keime auch von der umgebenden Haut enthalten[42]. Durch neue molekularbiologische Diagnostik, wie z.B. die PCR, können

auch vermehrt schwer kultivierbare oder antibiotisch vorbehandelte Erreger gefunden werden[109].

Der nicht invasive Nachweis einer Osteomyelitis gestaltet sich als große Herausforderung. Nicht zuletzt deshalb, weil sich Zeichen einer Knochendestruktion auf einer herkömmlichen Röntgenaufnahme in der Regel erst 10-14 Tage nach einer Infektion manifestieren und in der akuten Phase meist keine Veränderung zu sehen ist[5,42,110]. Es ist immer sinnvoll, die Bilder im Verlauf zu betrachten und mit evtl. vorhandenen Voraufnahmen zu vergleichen.

Im Verlauf zeigen sich im Röntgenbild dann Strukturauflockerungen, Lysezonen um Implantate herum, periostale Reaktion, sowie Skleroseherde. Im chronischen Stadium erkennt man häufig Sequester, Abszesse oder Osteolysezonen. Die konventionelle Röntgenaufnahme gehört deshalb trotz der frühen diagnostischen Lücke während der ersten 10-14 Tage auch durch ihre schnelle und kostengünstige Verfügbarkeit zur Basisbildgebung der Osteomyelitis und kann neben einem Ausgangsbefund wertvolle Informationen über Deformitäten, Knochenqualität bzw.-stabilität und Stabilität von eingebrachten Metallimplantate liefern[1]. Die Röntgenaufnahme sollte optimalerweise folgende Fragestellungen beantworten:

- Ist es ein akuter oder chronischer Verlauf?
- Wo liegt der Ausgangspunkt der Infektion und gibt es septische Metastasen?
- Sind Nachbargewebe, -organe oder -gelenke betroffen?
- Wie ist die Qualität und Vitalität von umgebenden Knochen und Weichteilgewebe?
- Kann konservativ behandelt werden oder muss chirurgisch therapiert werden?
- Ist es eine Inflammation oder Infektion?
- Wie ist die postoperative Anatomie und Stabilität, besonders von Implantaten oder Prothesen?[1]

Besonders schwierig ist die Röntgendiagnostik einer fraglichen Osteomyelitis, wenn nach einer Fraktur mit Operation physiologischer Knochenauf- und -umbau im Sinne von periostalen und endostalen Anbauten, Kortikalisverdickung oder -sklerosierung stattgefunden hat. In dem Fall ist ein sichtbarer Sequester im Knochen der einzig sichere Hinweis auf eine aktive Infektion[111]. Ob eine verzögerte Frakturheilung oder eine Prothesenlockerung infektionsbedingt oder eher aseptisch ist, ist im Röntgenbild ebenfalls schlecht zu erkennen[1].

Die Sonografie ist hilfreich beim Nachweis von Gelenkergüssen und Weichteilbeteiligung, besonders bei Kindern[112].

Im CT kann man auf hochauflösenden Schichtaufnahmen Sequester, intraossäre Fistelgänge, Pseudarthrosen, Kortikalisdefekte und die Knochenheilung gut erkennen. Auch minimale Knochenfragmente können so identifiziert werden[42]. Durch die multiplanare Rekonstruktion ist die anatomische Zuordnung leichter. Die CT ist hilfreich für die Unterscheidung zwischen freien nekrotischen Knochenstückchen und neu gebildeten Knochenstrukturen. Dabei ist sie der MRT überlegen und für die Planung des operativen Vorgehens unverzichtbar[1,113]. In der Weichteildarstellung ist sie dagegen der MRT klar unterlegen, da diese einen höheren Weichteilkontrast zeigt[1].

Das MRT ist eine kostenintensivere, aber nützliche und strahlungsarme Methode, um eine akute Knocheninfektion im frühen Stadium nachzuweisen. So können schon frühe Veränderungen im Knochenmark und umliegenden Gewebe, wie Wassereinlagerungen oder Schwellungen, die auf eine Entzündungsaktivität hinweisen, sichtbar gemacht werden[1]. Allerdings können diese Zeichen auch bis zu 12 Monate nach einem chirurgischen Eingriff oder einem Trauma ganz normale Heilungs- und Reparationsvorgänge im betroffenen Gewebe darstellen und machen somit falsch positive Ergebnisse wahrscheinlich[114]. Aus diesen Gründen zeigt die MRT bei der akuten Knocheninfektion eine Spezifität von nur 63% dagegen aber eine Sensitivität von 100%[113]. Erbringt die MRT also einen negativen Befund, so kann man von einem Ausschluss einer Infektion ausgehen[114].

Im späteren Verlauf einer niedriggradigen Infektion hat die MRT eine höhere Sensitivität als die kombinierte Knochen- und ^{99m}Tc -Immunoszintigraphie[114]. Um ihre Spezifität zu erhöhen, sollten die MRT-Bilder in T1- und T2-gewichteter Technik hergestellt und immer mit den konventionellen Röntgenbildern korreliert werden[112]. Um das Ausmaß einer Infektion im umliegenden Gewebe abschätzen zu können, ist die MRT der CT überlegen[112]. Allerdings sollte diese kostenintensivere Methode nur genutzt werden, wenn sie Informationen liefert, die kostengünstigere diagnostische Methoden nicht liefern können und wenn dadurch eine therapeutische Konsequenz gezogen werden kann. Ein Nachteil von CT und MRT ist die hohe Anfälligkeit für Artefakte durch Metall, so dass die beiden Untersuchungen bei Patienten mit Metallimplantaten nur eingeschränkt verwendet werden können. Auch nach der Entfernung von Osteosynthese-Material und Prothesen verbleiben minimale Abrieb-

und Korrosionsspuren am und im Knochen, die dann eine lokale Signalstörung auslösen können[114].

Eine ergänzende Methode der Diagnostik bilden hier die nuklearmedizinischen Untersuchungen der Osteomyelitis. Sie können bei Patienten mit Metallimplantaten angewendet werden, was einen Vorteil in der Diagnostik der implantatassoziierten Osteomyelitis darstellt. Es gibt unterschiedliche szintigrafische Möglichkeiten, eine Infektion nachzuweisen. Diese Untersuchungen können Informationen über die Aktivität des Knochenstoffwechsels, die in infizierten Bereichen erhöht ist, und über das Ausmaß und den Grad einer Entzündung liefern. Dazu injiziert man kurzlebige radioaktiv markierte Substrate des Knochenstoffwechsels, wie ^{99m}Tc -markiertes Bisphosphonat oder in entzündlich aktivem Gewebe vermehrt vorkommende Zellen bzw. Substanzen wie ^{111}In -markierte Leukozyten, ^{99m}Tc -Granulozyten bzw. ^{99m}Tc -Nanokolloide/-humanes Immunglobulin oder ^{18}F -markierte Glukose und misst die abgegebene Strahlung mit einer Gamma-Kamera[1].

Die ^{111}In -Leukozytenszintigrafie ist eine gute Methode zur Diagnose der chronischen gering aktiven Osteomyelitis, da man das ^{111}In über 48 Std. im Körper nachweisen und so auch geringgradige Infektionen detektieren kann. Andererseits ist diese Untersuchung sehr zeitaufwendig, benötigt ausreichende Technik und eine Blutaufbereitung des Patienten[1].

Als vielversprechendste nuklearmedizinische Methode zur Diagnostik einer chronischen Osteomyelitis hat sich die ^{18}F -Fluor-Desoxy-Glukose-Positronen-Emissions-Tomographie (^{18}F -FDG-PET) erwiesen[115]. Die ^{18}F -FDG wird als Stoffwechselsubstrat vermehrt in aktivierten Entzündungszellen wie Leukozyten, Granulozyten und Makrophagen aufgenommen und im Glukose-Stoffwechsel abgebaut. In einer Studie zeigt sie eine hohe Sensitivität von 100% und eine vergleichbar hohe Spezifität von 95%[116].

Die nuklearmedizinischen Untersuchungen zeigen interessante und vielversprechende Ansätze zur Diagnostik, zur Verlaufskontrolle und zum Ausschluß der posttraumatischen implantatassoziierten Osteomyelitis. Besonders zur Detektion von septischen Metastasen im Körper bei multifokalem Befall sind sie sehr hilfreich[3]. Allerdings sind die Methoden noch relativ kostenintensiv und bedürfen aufwendiger Technik, die meist nur an großen Krankenhäusern, wie Unikliniken, vorhanden ist. Die Strahlenbelastung ist im Vergleich mit der konventionellen Radiologie und dem MRT

bedeutend höher, so dass dies voraussichtlich nie eine Standarddiagnostik der Osteomyelitis werden wird.

Ausgeweitete und teure Methoden der Bildgebung sollten generell nur gemacht werden, wenn daraus auch eine Konsequenz für den Verlauf und die Therapiestrategie entsteht[1] und die Strahlenbelastung in Relation zum Nutzen der Untersuchung steht. Die Entscheidung zu den unterschiedlichen Methoden der Bildgebung und deren Interpretation sollte im Konsens zwischen Radiologen, Nuklearmediziner und zuständigem Operateur geschehen[112]. Die Diagnose kann am Ende nur durch die Zusammenschau der klinischen Zeichen und Symptome, den Blutuntersuchungen, den mikrobiologischen und histologischen Ergebnissen, der Radiologie und ggf. weiterer Bildgebung erfolgen[105].

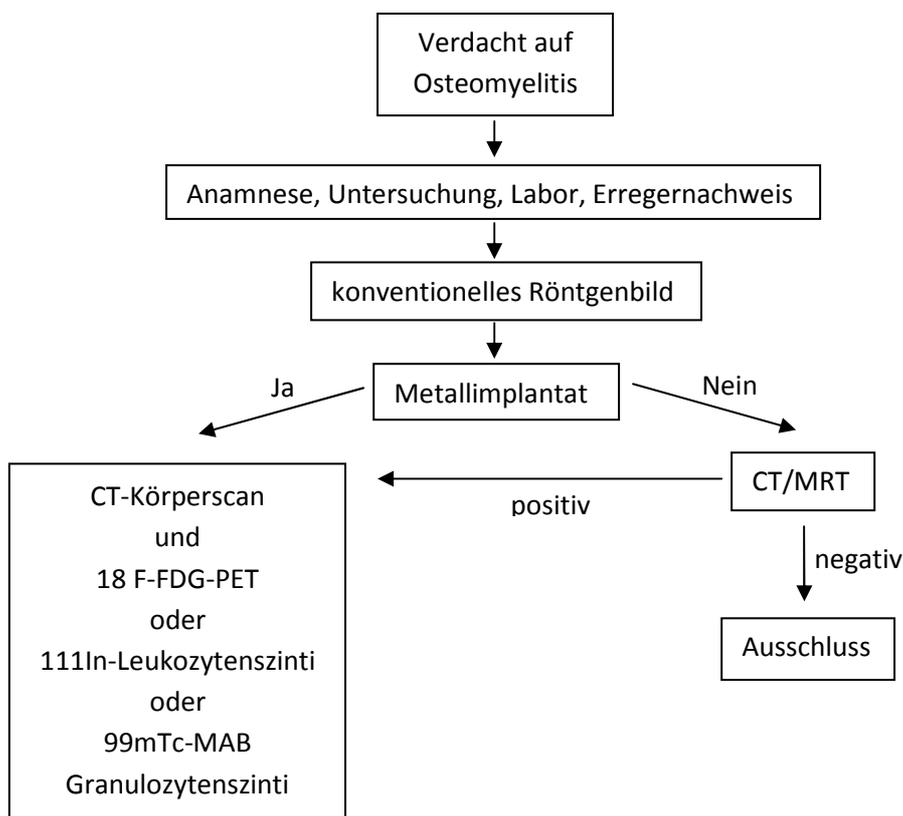


Abbildung 3: Schematischer Algorithmus der Bildgebung zur Diagnostik der Osteomyelitis, modifiziert nach [1].

Vor der Einführung des Penicillins 1940 durch Fleming, Florey und Chain[117], die dafür 1945 den Nobelpreis bekamen, wurde die Therapie der akuten Osteomyelitis

nach den Prinzipien des amerikanischen Chirurgen Winnett Orr (1877-1956) durchgeführt. Diese bestanden zum einen aus der chirurgischen Therapie (Entfernen aller befallenen Gewebeanteile) und zum anderen aus konservativen Maßnahmen, wie Immobilisation der betroffenen Partien durch Gipsverbände. Er betonte zudem die Notwendigkeit des antiseptischen Arbeitens vor, während und nach einer Operation[118].

Die akute Osteomyelitis konnte, vor allem durch die systemische antimikrobielle Therapie, maßgeblich unter Kontrolle gebracht werden[12]. Anders als die Therapie der chronischen posttraumatischen Osteomyelitis, die der Medizin, nicht zuletzt wegen dem notwendigen Einsatz von Implantaten und der steigenden Entwicklung von Antibiotikaresistenzen, noch große Schwierigkeiten bereitet[35,93,119].

Schon 1951 wusste man, dass bei einer chronischen Osteomyelitis eine alleinige antibiotische Therapie mit Penicillin beispielsweise (parenteral oder lokal) wie bei der akuten Osteomyelitis nicht ausreicht. Hier musste zusätzlich eine radikale Sanierungsoperation mit Entfernung allen kranken Knochengewebes erfolgen[120]. Staphylokokken sind heute nur noch selten gegen Penicillin empfindlich[6].

Um die Gefahr einer bakteriellen Kontamination oder chirurgischen Infektion gering zu halten, wird heute perioperativ standardmäßig, möglichst 20-40 Min. vor dem Eingriff, ein Staphylokokken-wirksames Antibiotikum als Einzeldosis systemisch gegeben, vor allem wenn Fremdkörper wie Implantate oder Prothesen in den Körper eingebracht werden sollen [27,121-123].

Bei einer akuten Osteomyelitis mit Allgemeinsystematik oder der Säuglingsosteomyelitis sollte möglichst frühzeitig, auch bevor ein Antibiotogramm vorliegt, mit einer intravenösen Breitband-Antibiotikatherapie über mind. 3 Wochen begonnen werden. Eine alleinige konservative Therapie kann nur erfolgen, wenn der Therapiebeginn innerhalb der ersten 48 Std. nach Erkrankungsbeginn liegt und in kürzester Zeit die Krankheitssymptome zurückgehen. Wenn dies nicht der Fall ist, muss eine zusätzliche operative Entlastung und Sanierung stattfinden[124].

Generell ist für eine optimale Therapie eine fachgerechte Analyse und Einschätzung der aktuellen klinischen Situation mit einer Stadieneinteilung, einem Erregernachweis mit Resistenzlage und einer kalkulierten antimikrobiellen Therapie unumgänglich. Erkrankungen oder Risikofaktoren wie z.B. Diabetes mellitus, Eisenmangel und Anämie sollten mitbehandelt werden, um den Heilungsverlauf positiv zu beeinflussen[42].

Für die posttraumatische Osteomyelitis gibt es eine für die Auswahl des richtigen Therapieverfahrens sehr hilfreiche Klassifikation (UTMB-Staging) von George Cierny und John T. Mader [23,39,125], die mehrere wichtige Faktoren bei der Einteilung in klinische Stadien der Osteomyelitis berücksichtigt. An erster Stelle steht der Gesundheitszustand des Patienten, der in drei Typen (A, B und C) unterschieden wird, von Typ A mit einem guten Immunsystem und guter Konstitution bis Typ C mit supprimiertem Immunsystem und schlechter gesundheitlicher Verfassung, der z.B. für eine radikale chirurgische Therapie nicht geeignet wäre.

In dieser Typ-Einteilung wird auch berücksichtigt, inwieweit der Patient durch die Erkrankung oder eine mögliche Therapie beeinträchtigt wird bzw. an Lebensqualität verliert. Auf der anderen Seite wird das Ausmaß der Osteomyelitis eingeschätzt. Hier werden vier verschiedene Typen nach der Lokalisation ihrer Ausbreitung unterschieden (I= medullär , II=superficial, III=lokalisiert und IV=diffus). Anhand der Beurteilung des Patienten (A-C) und des Ausmaßes der Osteomyelitis (I-IV) kann man die Erkrankung in 12 klinische Stadien einteilen, zu denen es verschiedene Therapiekonzepte gibt. Die Therapie reicht von einer konservativen Behandlung mit systemischer Antibiotikatherapie über radikales Debridement, Prothesenentfernung, Herdausräumung bis hin zur Amputation[39].

Bei der akuten postraumatischen Osteomyelitis, die oft auch Implantat-assoziiert ist, wird in jedem Fall mit Ruhigstellung und einer gezielten intravenösen Antibiotikatherapie für mind. 2 Wochen begonnen. Danach wird die Therapie peroral für bis zu 2 Monate nach Normalisierung der Entzündungsparameter (CRP, Leukozyten, Procalcitonin) im Blut weitergeführt, um eine Chronifizierung und Resistenzentwicklung zu vermeiden. Dabei sollte die betroffene Extremität mit Gipsverbänden, Schaumstoffschienen oder ggf. einem Fixateur externe ruhiggestellt und stabilisiert werden. Durch zusätzliche Hochlagerung wird einer Ödembildung entgegengewirkt[42]

Gehen die Symptome nicht zurück oder geht die akute posttraumatische Osteomyelitis in die chronische Form über, indem sich Sequester, Abszesse oder Fisteln bilden, muss unbedingt zusätzlich chirurgisch saniert werden, wenn es mit dem Gesundheitszustand des Patienten vereinbar ist[42,89].

Die richtige operative Technik und die ausreichende Stabilisierung einer vorliegenden Fraktur sind dabei wichtige Punkte zur Vermeidung einer Infektion, denn Instabilität im Frakturbereich ist einer der wichtigsten infektionsfördernden Faktoren[126].

Ein instabiles, infiziertes Implantat sollte frühzeitig entfernt und gegebenenfalls durch eine externe Fixierung ersetzt werden, wobei auf ein sorgfältiges chirurgisches Debridement von benachbartem infiziertem Gewebe geachtet werden muss[119, 123, 124]. Stabilitätssichernde Implantate oder Fixierungen sollten, wenn möglich, belassen werden, da sich Stabilität immer positiv auf die Infektionsbehandlung auswirkt[42]. Dafür müssen allerdings bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein[105]:

- Die Infektion darf nur akute Symptome zeigen (<14-28d)
- Das Implantat muss stabil sein, keine Zeichen der Lockerung
- Erfolgreich isolierter Mikroorganismus bei Monoinfektion
- Positiver histopathologischer Befund
- Erreger ist empfindlich gegen bakterizides Antibiotikum
- Das Antibiotikum muss eine erwiesene Effektivität gegen den Erreger haben

Gegebenenfalls werden wiederholte Revisionen mit radikaler chirurgischer Säuberung notwendig, denn Knochennekrosen sind infektkatalysierend und müssen unbedingt saniert werden[42,127-129].

Nach der Herdausräumung gibt es verschiedene Möglichkeiten der weiteren Sanierung. So können Antibiotikaketten mit Gentamicin [130] eingelegt werden, Defekthöhlen können mit autologem, homologem oder heterologem Knochenersatzmaterial geschlossen werden, ein größerer Knochendefekt kann z.B. mit einem gefäßgestielten autologen Knochentransplantat überbrückt werden [131,132]. Anschließend kann zusätzlich eine möglichst geschlossene Saug-Spül-Drainage angelegt werden, die eine kontinuierliche Reinigung durch Ausschwemmen von Eiter, Erregern, Blut und Sekret bewirkt[42,133].

Eine systemische Antibiotikatherapie sollte nach einem erfolgreichen Keimnachweis mit Anfertigung eines Resistogrammes immer gezielt erfolgen und wenn nötig geändert und angepasst werden, um das Ausbilden von Resistenzen zu vermeiden. Bekannte Probleme sind die diversen Nebenwirkungen einer mitunter langanhaltenden Antibiotikatherapie gerade bei älteren moribunden Patienten, sowie das Nicht-Erreichen von ausreichend hohen Wirkspiegeln im Knochen oder schlecht durchblutetem bzw. nekrotischem Gewebe[35]. Durch den oft unüberlegten breiten Einsatz von Antibiotika, die mitunter zu lange und in unterschwelligen Dosen gegeben werden, entstehen immer mehr resistente bis multiresistente Keime, wie der

Methycillin-resistente-*Staphylokokkus aureus* (MRSA) oder –*Stapylokokkus epidermidis* (MRSE)[134].

Die lokale antibiotische Therapie dagegen bringt eine Reihe von Vorteilen mit sich. So können zum Beispiel sehr hohe lokale Wirkspiegel des Antibiotikums am kritischen Übergang zwischen Gewebe und Oberfläche des Implantates erreicht werden, ohne die Gefahr von systemischen Nebenwirkungen oder Intoxikationen. Im Gegensatz zur systemischen wird die lokale Applikation kaum durch die meist bestehende verminderte Blutversorgung, Hämatome oder Ödeme behindert[135]. In mehreren Studien wurde die Gleichwertigkeit, wenn nicht sogar die Überlegenheit der lokalen Antibiotikatherapie gegenüber der systemischen Antibiotikagabe zur Infektionsprophylaxe gezeigt[90,135,136]. Dabei soll die lokale Therapie keineswegs die systemische ersetzen, sondern sie vielmehr ergänzen.

Schon länger gibt es die Möglichkeit, Antibiotika in Knochenzement, sog. Polymethymethacrylat (PMMA) zu mischen und dieses beim Wechsel von infizierten Prothesen als Zementierung oder als Spacer zu verwenden[137,138]. Allerdings erweist sich die Freisetzungskinetik von verschiedenen Zementtypen mit 4-8,4% des eingemischten Gentamicins im Laufe der ersten Woche als suboptimal[139,140]. Durch diese subinhibitorischen Antibiotikumkonzentrationen können zum einen lokale Resistenzen von Bakterien gefördert werden, zum anderen kann die Ausbildung eines bakteriellen Biofilmes nicht ausreichend verhindert werden[140].

Eine bahnbrechende Möglichkeit der lokalen Applikation von antibakteriellen Medikamenten in Kombination mit oft notwendigem Osteosynthesematerial ist die Entwicklung der Beschichtung mit Polymeren, die als Drug-Delivery-System verwendet werden können[81,134].

Poly-D.L-Laktid (PDLLA) ist das Racemat der beiden Enantiomer Poly-L-Milchsäure (PLLA) und Poly-D-Milchsäure(PDLA). Es stellt ein biokompatibles Polymer dar, das im Körper fast komplett durch Hydrolyse gespalten wird und so über Monate langsam degradiert. Die Geschwindigkeit des Abbaus hängt von dem anfänglichen Molekulargewicht ab[141]. Es besitzt eine hervorragende Gewebeverträglichkeit und wird im Körper vollständig resorbiert[142]. Zusätzlich konnte man der PDLLA-Beschichtung ein osteoinduktives Potential und somit einen positiven Effekt bei der Frakturheilung nachweisen[143]. Als Beschichtung auf Implantaten erschwert es Bakterien, vor allem dem *Staphylokokkus aureus*, die Adhäsion und Bildung eines Biofilms. Die erreichte Reduktion der Bakterienadhäsion ist zudem signifikant höher als bei unbeschichteten Titan-Implantaten[80,144].

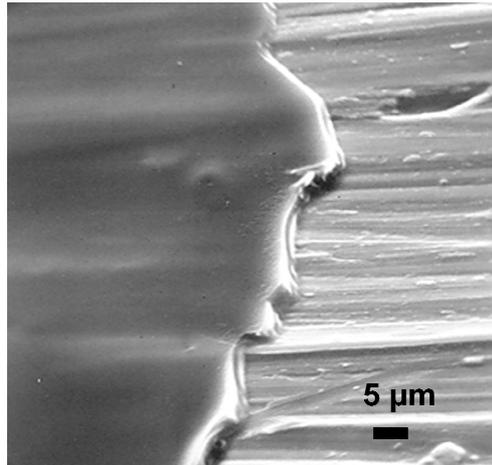


Abbildung 4: PDLLA-Beschichtung eines Titanimplantates (li.Bildhälfte), Elektronenmikroskopische Aufnahme, angefertigt im Labor der Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Uniklinik Münster

Die PDLLA-Beschichtung besitzt eine hohe mechanische Qualität, sodass bei der intramedullären Implantation von PDLLA-beschichteten Titanimplantaten nur 3,96% der PDLL-Beschichtung verloren geht[80,145]. Die Beschichtung wird im Körper vollständig abgebaut und die Abbauprodukte werden in den körpereigenen Zitronensäurestoffwechsel eingeschleust und ohne Rückstände zu Kohlendioxid und Wasser verstoffwechselt, so dass Folgeeingriffe zum Entfernen des beschichteten Implantates ausbleiben[143,145,146].

Durch die langsame hydrolytische Spaltung über 3-6 Monate nach Implantation, ist die PDLLA-Beschichtung als Medikamententräger prädestiniert.

Der limitierende Faktor einer effektiven lokalen Antibiotikatherapie, nämlich das notwendige Erreichen der kritischen Grenzfläche zwischen Implantatoberfläche und umgebendem Gewebe, kann mit der PDLLA-Beschichtung von Implantaten oder Osteosynthesematerial erfüllt werden[135]. Die hydrolytische Polymerspaltung findet dabei im gesamten Polymer-Gerüst statt, das Medikament wird mit einem initialen Peak in den ersten 24h zu 60% durch Hydrolyse und Diffusion freigesetzt und dann kontinuierlich abgegeben, bis nach 6 Wochen ca. 90% aus der Beschichtung gelöst sind[135].

Seine effektive Wirksamkeit in der Infektionsprophylaxe als Beschichtung mit 10% Gentamicin konnte schon mehrfach nachgewiesen werden[80,135,144].

Gentamicin ist ein Aminoglycosid-Antibiotikum mit einem breiten Wirkspektrum, das bei ruhenden und proliferierenden Bakterien eine Hemmung der Proteinbiosynthese verursacht. Dadurch wirkt es bakterizid. Angewendet wird es vor allem bei schweren Infektionen wie Sepsis, Endokarditis und Osteomyelitis durch gram-negative Stäbchen

und Staphylokokken, häufig dann in Kombination mit Betalaktamantibiotika. Es ist zugelassen für die lokale Anwendung als Zumischung in Knochenzement, Schwämmen oder als Beschichtung von Implantaten. Es zeigt typischerweise eine gute Wirkung gegen implantatassoziierte Infektionen, die durch *Staphylokokken*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiellen* verursacht sind[134]. Wegen seiner dosisabhängigen Nephro- und Ototoxizität nach systemischer Applikation, muss deren Indikation besonders bei Risikopatienten streng gestellt und bei laufender Therapie regelmäßig der Medikamentenspiegel im Blut kontrolliert werden[147].

Gentamicin wird in der orthopädischen Chirurgie schon breitflächig als ergänzende lokale Prophylaxe und Therapie von Knochen- und Gelenkinfektionen z.B. in Knochenzement, Schwämmen oder Ketten mit gutem Erfolg angewendet[148-154]. Auch neuere Aminoglycosid-Antibiotika, wie zum Beispiel Tobramycin werden in dem Bereich eingesetzt und weisen eine verbesserte Wirkung gegen Pseudomonaden auf[90].

Zur Vorbeugung der implantatassoziierten Infektion ist bis jetzt vor allem der mit Antibiotikum vermischte Knochenzement (Palacos®) weitestgehend als eine lokale Prophylaxe bei Implantationen von totalen Knie- oder Hüftgelenken akzeptiert[137]. In der Unfallchirurgie werden lokale Antibiotika-Applikationen noch nicht routinemäßig als Prophylaxe in der klinischen Praxis angewandt, da erst wenige experimentelle Daten vorliegen. Erfolgreich eingesetzt werden aber z.B. schon Gentamicin PMMA-Beads und Gentamicin beladene Kollagenfolien[155].

In der Therapie einer implantatassoziierten Infektion im Sinne eines septischen künstlichen Gelenkes, ist aktuell der zweizeitige Wechsel mit passagerem Einbau eines antibiotikumhaltigen Zement-Spacers der Gold-Standard. Je nach Resistenzlage und Therapie schwankt die Versagensrate der Therapie bei chronischen Osteomyelitiden, die durch *Staphylokokkus aureus* verursacht sind, zwischen 30 und 80%[4,156]. Wenn man alle Fälle von Osteomyelitis betrachtet, so wird aus einer akuten Osteomyelitis in bis zu 30 % ein chronischer Verlauf[4,51].

Eine akuter bis subakuter Verlauf zeigt eine sehr gute Prognose mit wenig Komplikationen und Langzeitschäden[12]. Periprosthetische Infektionen sind die zweithäufigste Komplikation bei Gelenkersatz nach der Prothesenlockerung[157].

Zeigt die Behandlung einer Infektion kein primäres Ansprechen oder wird sie gar zu spät begonnen, so breitet sie sich schnell aus. Es kann zu Markraumphlegmonen,

periostalen Abszessen, Fistelbildung, Nekrosen und Sequestrierung kommen. Die Epiphysenfugen und Kortikalisabschnitte können destruiert werden, was dann zu einem Einbruch in benachbarte Gelenke oder Weichteile mit Abszess- und Phlegmonenbildung, im schlimmsten Fall zur allgemeinen Sepsis führt.

Bei Kindern kann durch Beteiligung der Wachstumsfugen das Knochenwachstum empfindlich gestört werden, was zu vermindertem oder auch überschießendem Längenwachstum und letztlich zu Deformitäten führen kann. Bei etwa 10% der hämatogenen Osteomyelitis kann es zum Befall von mehreren Lokalisationen kommen. Rezidive können auch nach Jahren wieder auftreten[13].

Nach endoprothetischen Infektionen kann es nach fehlendem Ansprechen auf die Therapie nötig sein, das betroffene Gelenk durch Arthrodese zu versteifen. Im schlimmsten Fall muss bei lebensbedrohlichen septischen Verläufen sogar die betroffene Extremität amputiert werden[42]. Eine schwere Sepsis kann letztendlich natürlich auch zum Tod des Patienten führen.

Die Behandlung einer chronische Osteomyelitis verursacht neben den gravierenden Einbußen an Lebensqualität auch massive Kosten für den Patienten und das Gesundheitssystem[3].

Bezug nehmend auf die anspruchsvolle und schwierige Therapie der implantatassoziierten Osteomyelitis war das Ziel dieser Arbeit, ein chirurgisches Therapiemodell an der Rattentibia hier in Münster zu etablieren, mit dem wir sowohl chirurgische als auch medikamentöse Therapieansätze untersuchen und vergleichen können und mit dem auch in Zukunft weitere therapeutische Ansätze getestet werden können.

Dazu bauten wir auf verschiedene publizierte und nichtpublizierte Vorarbeiten zu dem Infektionsmodell an der Rattentibia auf, die in dem Labor der Hand- Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Uniklinik Münster und in der Uniklinik Berlin gemacht worden sind [135,144,158].

Voraussetzung für diese Arbeit war eine 100%ige Induktion einer implantatassoziierten Osteomyelitis in der Rattentibia durch das Einbringen des *Staphylokokkus aureus* (ATTC 49230) in Kombination mit der Implantation eines unbeschichteten Titanimplantates.

Für den therapeutischen Ansatz wurde eine chirurgische Methode des einzeitigen Implantatwechsels erfolgreich etabliert, der bei allen Tieren 7 Tage nach der primären Infektion stattfand. Es wurde entweder ein Implantatwechsel, ein Wechsel auf ein Drug-Delivery-System mit Gentamicin oder eine reine Explantation vorgenommen.

Zusätzlich wurde in drei Gruppen eine systemische Antibiotikagabe zum lokalen Therapieverfahren kombiniert.

Die klinischen Verlaufskontrollen und radiologischen Untersuchungen einmal wöchentlich sollten den Verlauf der implantatassoziierten Osteomyelitis unter den verschiedenen Therapieformen darstellen. Um Zeichen der Entstehung einer chronischen Osteomyelitis in der radiologischen Auswertung detektieren zu können, lief der Versuch bei jedem Tier über insgesamt 35 Tage.

Die in dieser Arbeit aufgeführten mikrobiologischen und immunhistologischen Analysen dienten der Auswertung der Effektivität der Therapien am Ende des Versuches.

Ziel dieser Arbeit war es außerdem, immunhistochemische Analysen und substratspezifische Färbungen in der Entzündungsdiagnostik und der Therapiekontrolle zu etablieren.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Materialien

Sprague-Dawley-Ratten , weiblich, ca. 12 Wochen alt	Harlan Winkelmann, Borken, Deutschland
Staphylokokkus aureus ATCC 94230	American Type Culture Collection, Manassas/USA
Kirschner-Drähte , Ø0,8/1mm, Titan, w/trocar tip, L 70mm	Syhtes, Oberdorf, Schweiz
10%Gentamicin-Poly-(D,L-Laktid) beschichteter Titandraht , Ø0,8mm, L 70mm	Syhtes, Oberdorf, Schweiz
Titandraht , unbeschichtet, Ø0,8mm, L 70mm	Syhtes, Oberdorf, Schweiz
Ketamin® 10% , 10ml, Ketaminhydrochlorid	Ceva sante animale, Düsseldorf
Xylacin® 2% , 25ml, Xylacinhydrochlorid	Ceva sante animale, Düsseldorf
Rimadyl® , Caprofen, 20ml	Pfizer, Berlin, Deutschland
Domitor® , 10ml, Medetomidinhydrochlorid	Pfizer, Berlin, Deutschland
Refobacin® , Gentamicin	Pfizer, Berlin, Deutschland
Antisedan® , 10ml, Atipamezolhydrochlorid	Pfizer, Berlin, Deutschland
Lavasept 5%, (Biguanid Polyhexanid)	Braun, Melsungen, Deutschland
Cryobank®-Röhrchen	MAST Diagnostika GmbH, Reinfeld, Deutschland
Leukoplast	BSN Medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Columbia Blutagarplatten	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Photometer	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Mikrospritze, Mikrosyringe, 705LT, 50µl	Hamilton Company, Reno, USA
Haematokrit-Kapillaren 75mm, 75µl	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Probengefäß, Mikrotube 1,3ml, 1,6ng EDTA/ml Blut	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Prolene 4/0, (1,5 metric)	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Digital-Thermometer	Paul Hartmann, Heidelberg, Deutschland
Kilomat-Präzisionswaage Typ 2106	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Blutkulturflasche, Bac Tec Peds	BD Diagnostics, Heidelberg, Deutschland
Schwingmühle/ Crymill	Retsch, Haan, Deutschland
Mahlbecher, Stahl	Eigenanfertigung, Feinmechanische Werkstatt der Klinik für Allgemeine Orthopädie, Uniklinik Münster
Flex Tube 1,5ml	Eppendorf HQ, Hamburg
Röntgenmobilette, Model No.: 6077379 X037E	Siemens AG, München, Deutschland
Röntgenplatte,ADCC HR / ADCC MD-Platte	AGFA-Gevaert N.V. B-2640 Mortsel-Belgium
Mikrotom, Leica RM 2145	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Hartmetallmesserklingen	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Image-Pro®-Plus	Media Cybernetics, Silver Spring, USA
Objektträger 26x76mm	Fa. Menzel, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser, 24x60mm	Fa. Menzel, Braunschweig, Deutschland
Eukitt®	O.Kindler GmbH&Co., Freiburg, Deutschland
Mikroskop, BX51, Bildanalysesystem	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland
Blutbildanalysegerätes Sysmex-XE-2100	Sysmex Digitana AG; Klinische Chemie des UKM
Pastorex®Test-Staph plus	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
BacTec 9250-Analysegerät	BD Diagnostics, Heidelberg
Vitek® 2XL	Bio Mérieux Deutschland GmbH, Nürtingen
Alkaline Phosphatase Standard, Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Alkaline Phosphatase Substrat Kit I	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Acid Phosphatase Leukocyte Trap Kit	Sigma Aldrich
SPSS (Version 15.0)	SPSS Inc. Chicago, USA

Tabelle 1: Verwendete Materialien im gesamten Versuchsablauf

Für die operativen Eingriffe wurden steriles Standard OP-Instrumentarium und -Materialien verwendet. Diese konnten über die zentrale Materialwirtschaft der Uniklinik Münster bestellt und bezogen werden.

Für die mikrobiologischen und immunhistologischen Arbeiten wurden Materialien, Lösungen und Medien verwendet, die der typischen Ausstattung eines mikrobiologischen oder immunhistochemischen Labors entsprechen. Diese wurden entweder durch das Labor der Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie und dem

Institut der Medizinischen Mikrobiologie der Uniklinik Münster zur Verfügung gestellt oder konnten ebenfalls über die zentrale Materialwirtschaft bezogen werden.

2.2. Versuchstiere

Die Bezirksregierung Münster hat den Tierversuch G47/2004 mit der Projektnummer Ra2/109/04 (Teilvorhaben: 2-Q002) am 28.Juni 2004 (Aktenzeichen: 50.0835.1.0) genehmigt.

Für diesen Versuch wurden weibliche, ca. 12 Wochen alte, Sprague-Dawley Ratten (Harlan Winkelmann, Hameln) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 230-300 g verwendet. In die Versuchsauswertungen des gesamten Versuches gingen n=120 Tiere. Alle Tiere wurden mindestens 14 Tage vor dem Versuchsbeginn geliefert, damit sie sich in der neuen Umgebung ausreichend akklimatisieren konnten. Die Haltung und Versorgung der Tiere übernahm das Tierlabor der Medizinischen Mikrobiologie der Uniklinik Münster nach den Richtlinien für die Tierhaltung in einem S2-Labor. Die Tiere wurden jeweils zu zweit in Typ 3-Käfigen bei konstant gehaltenen Bedingungen artgerecht untergebracht. Wasser (mikrobiologisch gefiltert) und Nahrung waren in den Käfigen jederzeit zugänglich. Die Umgebungstemperatur wurde konstant bei 22°C gehalten und es wurde ein Tag-/Nachtrhythmus simuliert.

2.3. Studiendesign:

In dem gesamten Projekt wurden 4 verschiedene Auswertungsmethoden angewandt:

1. Mikrobiologische Auswertung (n=40)
2. Immunhistochemische Auswertung (n=40)
3. Histologische Auswertung (n=40)
4. Radiologische Auswertung (n=120)

Während ich mich in meiner Arbeit auf die beiden ersten Auswertungen konzentrierte, war mein Studienkollege Daniel Günther mit der 3. und 4. Auswertungsmethode befasst.

Auf die ersten drei Auswertungsmethoden entfielen jeweils n=40 Tiere. Da alle Tiere zudem radiologisch untersucht wurden, entfielen auf diese Auswertung n=120 Tiere. Randomisiert wurden die Tiere fünf verschiedenen Gruppen zugeteilt, die sich in der Art des therapeutischen Ansatzes unterschieden. Alle Tiere wurden im Abstand von 7 Tagen zweimal operiert. Der erste Eingriff war bei allen Tieren gleich und bestand aus der Inokulation einer *Staphylokokkus aureus*-Suspension und der Einbringung eines unbeschichteten Titan Kirschner-Drahtes in den Markraum der linken Tibia.

Der zweite Eingriff stellt den chirurgischen und medikamentösen Therapieansatz dar und variierte von Gruppe zu Gruppe, siehe Tabelle 2.

Gruppe	1. Eingriff	Implantatwechsel
Titan	Unbeschichteter Titan-Kirschner-Draht + 20µl <i>Staphylokokkus aureus</i> - Suspension	Unbeschichteter Titan-Kirschner-Draht
Genta		PDLLA+10%-Gentamicin beschichteter Titan-Kirschner-Draht
Expl./syst		Kein 2. Implantat und system. Gentamicingabe
Titan/syst		Unbeschichteter Titan-Kirschner-Draht und system. Gentamicingabe
Genta/syst		PDLLA+10%-Gentamicin beschichteter Titan-Kirschner-Draht und system. Gentamicingabe

Tabelle 2: Gruppenbeschreibung und -Benennung

Der Einfachheit halber werden im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch die jeweiligen oben genannten Gruppenkurzbezeichnungen (1.Spalte) angegeben. Jede Gruppe wurde in zwei Auswertungsbereiche aufgeteilt, die mikrobiologische und die immunhistochemische Auswertung, deren Gruppengröße jeweils n=8 betrug. Alle Tiere standen insgesamt 35 Tage unter Beobachtung und wurden an den OP-Tagen und zudem 7d, 14d, 21d und 28d nach dem Nailexchange (NE) zusätzlich untersucht, bevor sie dann 28d nach dem NE getötet und die operierten Tibiae den Auswertungsbereichen zugeteilt wurden.

Im Versuchablauf zeigten 8 Tiere nach dem 1. Eingriff keine erfolgreiche Infektion. Da die primäre Infektion Voraussetzung für die Evaluation der verschiedenen Therapieansätze war, mussten diese ersetzt werden. Ein Tier zeigte dagegen eine solch überschießende Infektion trotz normaler OP-Prozedur, dass dieses wahrscheinlich immunkompromittierte Tier aus der Wertung genommen werden musste.

Weitere 6 Tiere starben aus ungeklärter Ursache in Narkose nach einem der operativen Eingriffe. Ein Tier wurde tot im Käfig gefunden, ohne dass ein Grund dafür erkennbar gewesen wäre. Die Drop-out-Rate liegt somit bei 16/136 Tieren (11,76%). Um die statistische Evidenz des Versuches nicht zu gefährden, mussten die 16 Tiere ersetzt werden.

2.4. In Vivo-Infektion

2.4.1. Erreger

Zum Erstellen der Erregersuspension für das Inokulat wurde das Bakterium *Staphylokokkus aureus* der Subspezies Rosenbach (ATCC 49230; CDC 587; American Type Culture Collection, Manassas/USA) verwendet. Es handelt sich hier um ein Isolat von einer jungen Patientin mit chronischer Osteomyelitis aus Little Rock, Arizona. Der Stamm zeigt eine Sensibilität gegenüber den gängigen Antibiotikagruppen wie Aminoglycosiden, Cephalosporinen und Makroliden. Er ist resistent gegenüber Penicillin G[159]. Sonstige verwendeten Lösungen, Medien und Geräte wurden freundlicherweise von der Medizinischen Mikrobiologie des UKM zur Verfügung gestellt. Gelagert wurde der Erreger in einer Glycerinkultur mit chemisch behandelten Glasperlen (Cryobank®) bei -80°C. Zwei Tage vor dem Eingriff wurde der eingefrorenen Glycerinkultur mit einer sterilen Öse eine geringe Menge entnommen und auf eine Blutagarplatte gebracht. Diese wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. 17 Std. vor dem operativen Eingriff wurden genau 3 CFU des gewachsenen *Staphylokokkus aureus* mit einer sterilen Öse von der Blutagarplatte in ein Reagenzglas mit 5ml Glukoseboullion gegeben und in einem Wasserbad bei 37°C über Nacht schwenkend inkubiert. Am Tag des Eingriffs wurde die angezüchtete Keimsuspension im Verhältnis 1:3 mit PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4; 1000g Aqua dest. 8gNaCl, 0,2g KCl, 0,25gKH²PO⁴, 1,35g Na²HPO⁴x 2H²O) verdünnt. Von der verdünnten Keimsuspension wurde die optische Dichte (OD) mittels eines Photometers im Vergleich zu PBS gemessen. Durch interne Vorversuche wurde evaluiert, dass eine OD von 1 einer Keimkonzentration der Suspension von 10⁸ CFU/ml entspricht. Anhand dessen und anhand der tatsächlich gemessenen OD unserer Keimsuspension konnte man nun eine Ausgangssuspension mit der Konzentration von 10⁸ CFU/ml herstellen. Die weiteren Schritte der Verdünnungsreihe sind in Abb.5 grafisch dargestellt:

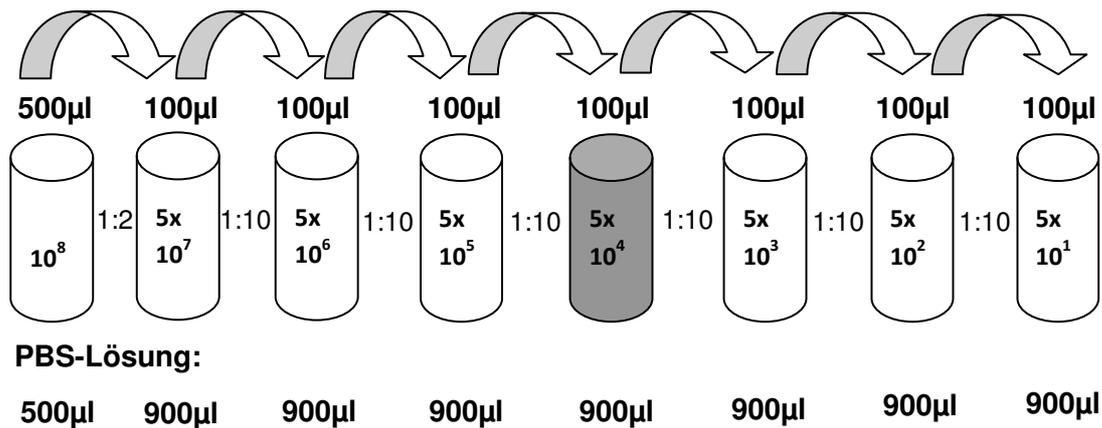


Abbildung 5: Vorgehen der Verdünnungsreihe zur Herstellung des Keiminokulates mit der Zielkonzentration 10^3 CFU/20µl.

Die angestrebte Keimmenge, die den Tieren in den Markraum injiziert werden sollte, betrug 10^3 CFU. Dazu wurden den Versuchstieren 20µl der Verdünnungsstufe 5×10^4 /ml (grau markiert) direkt nach Herstellung intraoperativ appliziert.

Zur Kontrolle der Keimkonzentration wurden die einzelnen Verdünnungsstufen auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Keimauszählung am nächsten Tag ergab eine tatsächliche durchschnittliche Keimzahl der eingebrachten Erregersuspension von $942,45 \text{ CFU} (\pm 773,11 \text{ CFU})$ bei $n=120$ Tieren.

2.4.2. Operative Eingriffe

Vor dem Eingriff wurden die Tiere mit 80-100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin 10% (Ceva Sante Animale, Düsseldorf) und 12 mg/kg KG Xylazin 2% (Ceva Sante Animale, Düsseldorf) in einer Mischspritze intraperitoneal (i.p.) narkotisiert, so dass sie für ca. 60min ausreichend analgisiert, sediert und relaxiert waren und die 20-30 min dauernde Operation ohne Risiko stattfinden konnte. Nach individueller Markierung am Schwanzende wurden die Tiere gewogen. Ihre Körpertemperatur wurde rektal gemessen und am rechten Auge mit einer Haematokrit-Kapillare (Hirschmann® Laborgeräte) retrobulbär ca. 1ml Blut entnommen und in ein EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben.

Dann wurde der linke Hinterlauf für die Operation großzügig enthaart, ausreichend desinfiziert und mit einem selbstklebenden sterilen Lochtuch abgedeckt. Der Zugang zum Markraum erfolgte unter sterilen Kautelen über eine ca. 5mm lange vertikale Hautinzision am linken Unterschenkel medio-proximal auf Höhe der Tuberositas tibiae. Mithilfe eines Kirschner-Bohrdrahtes (\varnothing 1mm Titan; Synthes GmbH, Switzerland)

wurde medial von der Tibiavorderkante die Kortikalis senkrecht in posterior-lateraler Richtung aufgebohrt und so der Markraum eröffnet. Das Bohrloch wurde unterhalb des Patellarsehnenabsatzes angesetzt, wobei besonders auf den Schutz der Sehne, des umliegenden Periostes und Muskelgewebes geachtet wurde. Der Markraum wurde dann zunächst weiter über eine Strecke von circa 3-5mm Richtung distales Tibiaende aufgebohrt und anschließend durch ein stumpfes Verschieben eines dünneren Bohrdrabtes (\varnothing 0,8mm Titan; Synthes GmbH, Schweiz) weiter eröffnet. Je nach Länge und Stärke der Tibia wurde der Markraum über eine gesamte Strecke von 2,8-3,2mm kanalisiert. Mit einer Mikroliter-Spritze (Hamilton, Schweiz) und den passenden Kanülen (Hamilton, Schweiz) konnte nun die Inokulation von genau 20 μ l der hergestellten Keimsuspension in den vorgefertigten Knochenkanal erfolgen. Danach wurde ein unbeschichtetes Titanimplantat (Implantat I) (\varnothing 0,8 mm; Synthes, Schweiz) in den Markraum der Tibia eingebracht und mit einem Metallkneifer kurz über Knochenniveau abgesetzt. Die Inzision wurde mit Einzelknopfnähten verschlossen, die Naht anschließend desinfiziert und mit einer sterilen Kompresse verbunden.

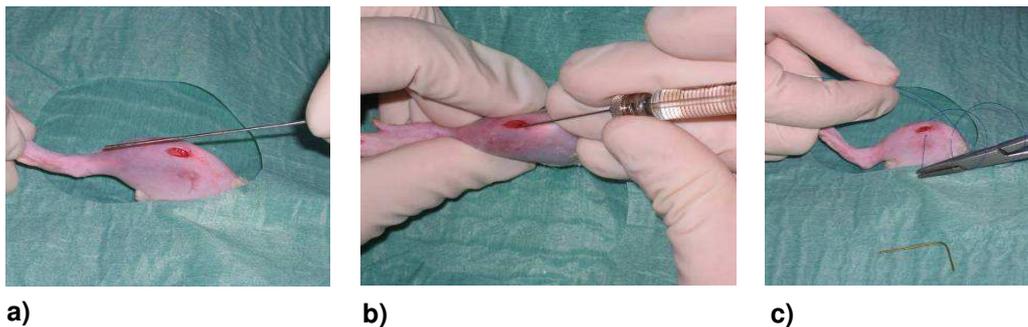


Abbildung 6: Ablauf des Operativen Eingriffes a) zeigt die Hautinzision und den Bohrdrabt, mit dem der Markkanal eröffnet wurde, b) das Eingeben des Inokulates mit der Hamilton-Spritze und c) das Vernähen der Inzision nach Absetzen des Implantates.

Die Tiere bekamen als postoperative analgetische Behandlung Rimadyl® (Pfizer, Karlsruhe) ins Trinkwasser (0,16ml/500ml) und s.c. 4mg/kg Körpergewicht injiziert. Bei dem operativen Folgeeingriff, sieben Tagen nach der ersten Operation, wurde die prä- und postoperative Versorgung sowie die Narkotisierung nach oben beschriebenen Schema durchgeführt. Nach erneuter Hautinzision wurde jetzt durch vorsichtiges und stumpfes Präparieren versucht, die Spitze des eingebrachten Titanimplantates freizulegen. Diese wurde mithilfe eines kleinen Nadelhalters gefasst und unter vorsichtigen achsengerechten Dreh- und Zugbewegungen das Implantat aus dem Markraum entfernt. Nach ausgiebiger Spülung und Lavage des Knochenkanals mit 20ml Lavasept®5% (Braun Melsungen AG) wurde dann je nach Gruppe ein neues,

steriles unbeschichtetes Titanimplantat (\varnothing 0,8 mm), ein PDLLA (Poly-D, L-Lactic-Acid)+10%-Gentamicin-beschichtetes Implantat (\varnothing 0,8 mm, Titan; Synthes, Schweiz) oder gar kein Implantat eingesetzt. Die PDLLA/10% Gentamicin-Beschichtung wurde durch Synthes industriell in einer Kaltbeschichtungstechnik angefertigt.

Das Kürzen des Implantates II auf Hautniveau, der Wundverschluss und die analgetische Behandlung erfolgten in der gleichen Art und Weise wie beim ersten Eingriff. Die Tiere, die zusätzlich eine systemische Behandlung mit Gentamicin erhalten sollten, bekamen direkt nach dem Eingriff die erste Gabe Refobacin® (Wirkstoff: Gentamicin; 5mg/kg KG; Pfizer, Karlsruhe) i.p. gespritzt. Die systemische Antibiotikagabe wurde bis zum 5. Tag postop durchgeführt. Nach beiden Eingriffen wurden die Tiere zur Lagekontrolle des Implantates (li.Tibia a.p./lat.) geröntgt (Mobilett II Röntgengerät, Siemens).

2.5. Verlaufskontrollen

An beiden OP-Tagen, zu den Zeitpunkten 7d, 14d und 21d postop (ab dem Zeitpunkt des Implantatwechsels) und am Tag der Tötung 28d wurden Verlaufskontrollen durchgeführt. Die Tiere wurden mit Domitor® (0,15ml/kg KG s.c.; Pfizer, Karlsruhe) sediert, sodass sie auf einer digitalen Waage gewogen, ihnen rektal die Körpertemperatur bestimmt und peripher an der V. tibialis posterior re. Blut entnommen werden konnte.

Anschließend wurden sie für die radiologische Verlaufskontrolle in zwei Ebenen (li.Tibia a.p./lat.) auf der Röntgenplatte platziert und geröntgt. Um die Sedierung aufzuheben, bekamen die Tiere als Antidot Antisedan® (0,15ml/Tier s.c.; Pfizer, Karlsruhe) gespritzt, das sie ca. 20 Sekunden später wieder erwachen ließ. Es wurden die Parameter Gewicht, Körpertemperatur, Blutbild sowie der radiologische Verlauf bestimmt und dokumentiert. Bei der Auswertung des Blutbildes mit dem Blutbildanalysegerätes Sysmex-XE-2100 (Sysmex Digitana AG; Klinische Chemie des UKM) interessierten uns das Hämoglobin (Hb [g/dl]) und der Hämatokrit (Hkt [%]) als allgemeine Parameter und als Entzündungsparameter die Leukozyten (WBC [x1000/ml]).

2.6. Tötung

Die Tötung erfolgte bei allen Tieren 28 Tage nach dem Implantatwechsel. Die Narkotisierung wurde auf die gleiche Art und Weise durchgeführt wie bei den operativen Eingriffen. Nach der Messung der bekannten Verlaufsparemeter und der radiologischen Aufnahme der li. Tibia wurden die Tiere durch eine transkutane intrakardiale Injektion ins Herz mit einer KCl 10%-Lösung getötet. Für die immunhistochemische / zytochemische Auswertung wurde nach Präparation der Haut an der li. Tibia erst das Articulatio genu und dann das obere Sprunggelenk exartikuliert. Anschließend konnte die Tibia vom Weichteilmantel befreit werden.

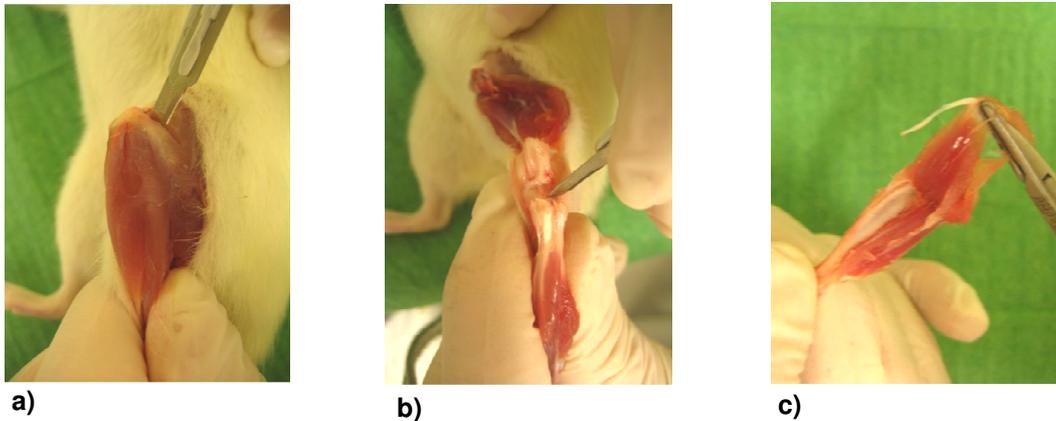


Abbildung 7: Präparationsvorgang der Rattentibia nach der Sakrifikation, a) Exartikulation Kniegelenk, b) Exartikulation Sprunggelenk, c) Freipräparation der Tibia

Die Fibula wurde vorsichtig abgetrennt und das Implantat II konnte mithilfe eines kleinen sterilen Nadelhalters aus dem Markraum gezogen werden. Das Implantat II wurde zur mikrobiologischen Auswertung auf einer Blutagarplatte abgerollt, inkubiert und am nächsten Tag beurteilt. Die Tibiae für die immunhistochemische Auswertung wurden zur Fixierung in 4% Paraformaldehyd gegeben. Die Tibiae für die mikrobiologische Auswertung wurden wie im nächsten Abschnitt beschrieben verarbeitet.

2.7. Mikrobiologische Auswertung

Die Tötung der Tiere für die mikrobiologische Auswertung variierte von der oben beschriebenen Methode insofern, dass zum einen zwingend unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden musste und zum anderen vor der tödlichen KCl 10%-Injektion steril Herzblut entnommen wurde. Zu diesem Zweck wurde der Thorax enthaart, desinfiziert und während vollständiger Narkose durch eine vertikale Thorakotomie eröffnet. Anschließend wurden ca. 2ml Herzblut steril entnommen. Davon wurden 1,5ml direkt in eine Blutkulturflasche (Bac Tec Peds Plus® Blutkulturmedium; BD Diagnostics, Heidelberg) und der Rest in ein EDTA-Röhrchen gegeben. Nun konnte unter Sicht die direkte intrakardiale Injektion von KCl-Lösung 10% bis zum Exitus letalis erfolgen.

Nach der sterilen Präparation der Tibia wurde erst ein Abstrich von der Insertionsstelle des Implantates durchgeführt und dann das Implantat II mit einem sterilen Nadelhalter entnommen. Beides wurde zur Inkubation und anschließenden Analyse auf Blutagarplatten und in Boullions gebracht. Randomisiert wurden in jeder Gruppe jeweils zwei Tieren die Nieren steril post mortem entnommen. Die Tibiae und die Nieren wurden in einen sterilisierten Mahlbecher aus Titan gegeben, in flüssigem Stickstoff gefroren und dann kryogen zermahlen (Schwingmühle; Retsch®). Von dem entstandenen Knochen- bzw. Nierenmehl wurden 30-70 mg in ein vorher gewogenes Flex-Tube (1,5ml; Eppendorf HQ, Hamburg) abgefüllt und das genaue Gewicht bestimmt. Nachdem die zehnfache Menge an PBS-Puffer hinzugesetzt wurde, musste die Suspension 2min sorgfältig durchmischt werden. Aus dieser Ausgangssuspension wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, indem man sie Schritt für Schritt jeweils um den Faktor 1:10 bis zur Stufe 10^{-4} verdünnte. Dies ergab fünf unterschiedlich konzentrierte Lösungen, von denen jeweils 100 µl auf einer Blutagarplatte ausgestrichen wurden. Von dem entnommenen Herzblut wurden ebenfalls 100 µl auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Die Implantate wurden nach dem Abrollen auf der Platte mit einer sterilen Pinzette in eine Glucoseboullion gegeben. Alle Blutagarplatten und Glucoseboullions wurden über Nacht inkubiert (37°C) und am nächsten Tag ausgewertet. So konnten zum einen die CFU/g Knochenmehl bzw. Nierenmehl bestimmt werden und zum anderen die Abstriche, Implantatabrollungen und das Herzblut mithilfe der folgenden Beurteilungen eingeteilt werden:

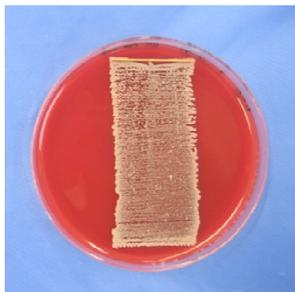
steril

Geringgradiges Wachstum (ggr.)

Mittelgradiges Wachstum (mgr.)

Hochgradiges Wachstum (hgr.)

Bakterienrasen (Rasen)

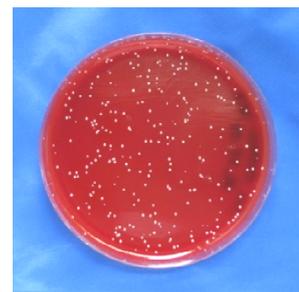


a)

Abbildung 8: Implantatabrollungen
mit a) Bakterienrasen und b) Ggr.
Wachstum



b)



**Abbildung 9: Abstrich-
Ausstrich** der
Insertionsstellen mit mgr.
Wachstum

Nachdem das Implantat, wie in Abbildung 8 dargestellt, abgerollt wurde, kam es in ein Nährmedium, das aus Glucoseboullion bestand. Nach 24 Std. Inkubationszeit wurden diese Boullions auf Trübung, Gasbildung, Verfärbung oder Bodensatz untersucht.



a)



b)

Abbildung 10: Inkubierte Glucoseboullions a) klar und
b) getrübt mit eingebrachtem Implantat nach 24h
Inkubation

Bei jedem Erregerwachstum wurde zur Identifikation des *Staphylokokkus aureus* ein Pastorex®-Test (Bio-Rad, München) durchgeführt, zur Dokumentation ein digitales Foto angefertigt und zur Asservierung eine Probe in einer Glycerinkultur bei -80°C eingefroren. Bei allen Tieren, die lokal oder systemisch mit Gentamicin behandelt wurden (alle außer der Gruppe **Titan**) wurden die bewachsenen Blutagarplatten 48-72h auf die Bildung von Small Colony Variants (SCV) des *Staphylokokkus aureus* untersucht und diese ggf. isoliert. Die isolierten Kolonien, die verdächtig auf SCV waren und der Erreger von jeweils zwei Tieren mit den höchsten Keimzahlen im Knochenmehl einer Gruppe wurden zur Keimidentifizierung und Resistenzbestimmung im Vitek® 2XL (Bio Merieux) analysiert und ggf. in der PCR weiter untersucht. Die Blutkulturen wurden von der Medizinischen Mikrobiologie Münster vollautomatisch mit dem BacTec 9250-Analysegerät (BD Diagnostics, Heidelberg) ausgewertet. Sonstige verwendeten Lösungen, Medien und Geräte wurden freundlicherweise von der Medizinischen Mikrobiologie des UKM zur Verfügung gestellt.

2.8. Immunhistochemische Auswertung

Während einer Infektion kommt es auch immer zu einer Vermehrung körpereigener Entzündungszellen, die über Phagozytose eingedrungene Erreger aufnehmen und zerstören. Die verschiedenen Entzündungszellen, wie Makrophagen, Monozyten und Leukozyten bilden zahlreiche Mediatoren, wie Zytokine, Interleukine oder Chemokine, um ihre Immunantwort zu steuern, zu modulieren und um weitere Abwehrzellen anzulocken. Dazu gehören auch die Interleukine IL-1 α , IL-6 und MCP-1[3,45,46].

Die Tibiae für die immunhistochemische Auswertung und die zytochemische Färbung wurden nach vollständiger Präparation und Entnahme des Implantates in 4% Paraformaldehyd-Lösung für 12-24h fixiert und nach einem zeitlich festgelegten Ablaufplan, der in Tabelle 3 aufgeführt ist, entkalkt, entwässert und in Paraffin eingebettet. Die verwendeten Lösungen, Puffer und andere Substanzen wurden von den Firmen Roth, AppliChem, McCornick, Eppendorf, Merck und der Apotheke des Uniklinikums Münster bezogen. Der Phosphatpuffer wurde aus den Stammlösungen A (0,1M Kaliumdihydrogenphosphat, 200ml/l) und B (0,1M Dinatriumhydrogenphosphat 800ml/l) vom Labor der Unfallchirurgie hergestellt.

Lösung	Zeit	Temperatur	Beschreibung/ Besonderheit
4% Paraformaldehyd	12-24 h	4°C	Fixierung
0,1M Phosphatpuffer pH 7,4	24 h	RT	3x wechseln
20% EDTA-Lösung mit 0,2% Paraformaldehyd	6-8 Wo., je nach Masse	RT	Entkalken, 3x wöchentl. Lösung wechseln
0,1M Phosphatpuffer pH 7,4	24 h	RT	3x wechseln
70% Alkohol	8 h	RT	Entwässern, 2x wechseln
90% Alkohol	24 h	RT	Entwässern, 2x wechseln
96% Alkohol	24 h	RT	Entwässern, 2x wechseln
100% Alkohol	24 h	RT	Entwässern, 2x wechseln
Zedernholzöl	24 h-x	RT	
Zedernholzöl-Paraffin (1:1)	24 h	48°C	
Paraffin I	8 h	60°C	Aufsteigender Reinheitsgrad
Paraffin II	16 h	60°C	
Paraffin III	8 h	60°C	
Paraffin IV	16 h	60°C	
Paraffin V	4 h	60°C	
Einbetten in flsg. Paraffin		60°C	

Tabelle 3: Vorgehen bei der Paraffin-Gewebeeinbettung

Die in Paraffin eingebettete Tibia wurde mit dem Mikrotom (Microtom Leica RM 2145; Leica Microsystems GmbH) axial mit einer Schichtdicke von 5µm geschnitten, auf einen beschichteten Objektträger gebracht und über Nacht bei 37°C getrocknet.

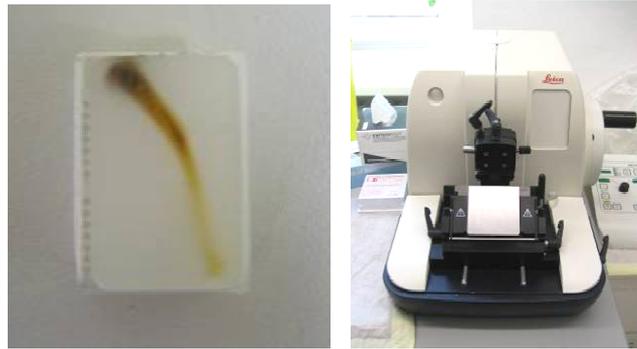


Abbildung 11: Material für die Immunhistochemische Auswertung, links Paraffinblock mit Tibia und rechts das verwendete Mikrotom (Leica®) RM 2145

Danach konnten die Schnitte für die immunhistochemischen und zytochemischen Färbungen verwendet werden. Die Antigene, die untersucht wurden, sind zum einen die inflammatorisch wirksamen Zytokine IL-1alpha und IL-6, zum anderen das vor allem von Endothelzellen gebildete Chemokin MCP-1, das für die Rekrutierung von Leukozyten und Monozyten im Entzündungsprozess von wesentlicher Bedeutung ist. Die Färbungen wurden nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) durchgeführt, wobei man sich die hohe Affinität von Avidin zu Biotin zu Nutze macht und biotinylierte Zweitantikörper verwendet, wie die Abbildung 12 anschaulich zeigt:

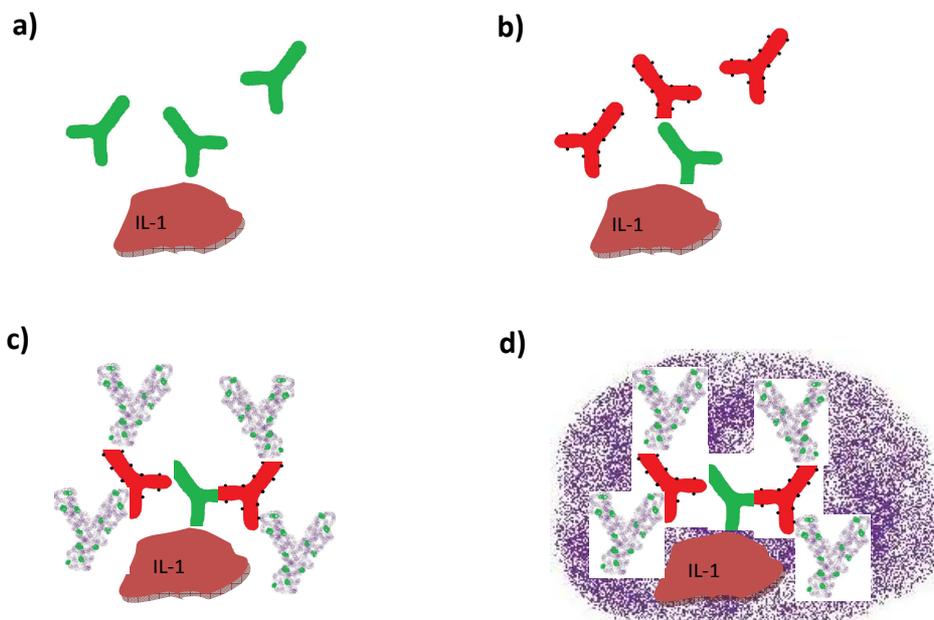


Abbildung 12: Avidin-Biotin-Komplex Methode, schematisch zeichnerisch dargestellt, eigene Anfertigung

Erklärung zu Abb.12: In einem ersten Schritt **(a)** gibt man den primären Antikörper auf den Schnitt, der an das gewünschte Substrat bindet. In unserem Fall z. B. der IL-1-Antikörper, der an vorhandenes IL-1 im zu untersuchenden Gewebe bindet. In einem zweiten Schritt **(b)** wird ein mit Biotinmolekülen besetzter sekundärer Antikörper auf den Schnitt gegeben, der spezifisch an den primären Antikörper bindet. Als nächstes wird dann ein Avidin-Enzymkomplex **(c)** auf die Probe gegeben. Da Avidin und Biotin eine sehr hohe Bindungsaffinität zeigen, bindet der Enzymkomplex fest an die gebundenen sekundären biotinylierten Antikörper. Das Enzym ist eine alkalische Phosphatase, die dann das Substrat aufspaltet, das man im 4. Schritt **(d)** auf die Probe gibt. Das gespaltene Substrat erzeugt eine mikroskopisch nachweisbare Färbung auf der Probe.

Die verwendeten primären und sekundären Antikörper und Seren sind detailliert in Tabelle 4 aufgeführt:

	Spezifität/ Verdünnung	Spezies	Anti-	clonal	Firma
1. AK	IL-1alpha/ 1:500	goat	mouse/rat	poly	Santa Cruz
	IL-6 (M-19)/ 1:1000	goat	mouse/rat	poly	Santa Cruz
	MCP1/ 1:200	rabbit	mouse/rat	poly	NatuTec eBioscience
2. AK	1:300	horse	goat, biotinyliert		Vector Laboratories
	1:400	goat	rabbit, biotinyliert		Vector Laboratories
Serum	Made in horse	horse			Vector Laboratories
	Made in goat	goat			Vector Laboratories

Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Seren bei der immunhistochemischen Färbung

Die Paraffinschnitte wurden, wie in Tabelle 3 aufgeführt, in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer abfallenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%) und Aqua dest. bewässert. Die intermittierenden Abpufferungen und Waschungen wurden mit Tris-Puffer (1000g Aqua dest., 0,9g Tris, 6,85g Tris-HCl (1M), 8,78g NaCl) und Aqua dest. durchgeführt und werden im Folgenden nicht mehr extra erwähnt. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Gewebeprobe mit Trypsin 1% (10min bei 37°C; 10min bei RT) behandelt. Bis zu diesem Punkt unterschied sich der Ablauf bei den verschiedenen immunhistochemischen Färbungen nicht.

Für die IL-1 α - und IL-6-Färbung wurden die Proben mit Horse-Serum 10%, für die MCP1-Färbung mit Goat-Serum 10% geblockt (30min bei Raumtemperatur (RT)), um Kreuzreaktionen zwischen dem Zweitantikörper und endogenen Immunglobulinen in der Gewebeprobe zu verhindern.

Der Primärantikörper gegen IL-1 α und IL-6 wurde mit Horse-Serum 2%, der gegen MCP1 mit Goat-Serum 2% verdünnt, auf die Gewebeprobe gegeben und 16h bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag konnte der biotinylierte Zweitantikörper (verdünnt in Tris1%) aufgetragen und für 30min bei RT einwirken. Der Avidin-Alkalische Phosphatase-Komplex (Alkaline Phosphatase Standard, Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories) musste 30min vor Gebrauch angesetzt werden (5ml PBS + 1Trpf.Lösung A + 1Trpf.Lösung B), wurde auf die Schnitte aufgetragen und für 30min bei RT stehen gelassen. Danach wurde das Substrat (Alkaline Phosphatase Substrat Kit I; Vector Laboratories) auf die Proben gegeben (5ml 100mM Tris-HCl + 1Trpf. Levamisol + je 2 Trpf. der Lösungen 1,2 und 3) und bei RT für 20min im Dunkeln inkubiert.

Die Schnitte wurden für 1min in Leitungswasser gespült und danach mit Methyl Grün (5min bei 60°C) gegengefärbt. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (96%, 100%) kamen die Proben in Xylol und konnten mithilfe des Einschlussmittels Eukitt® eingedeckt werden. Die Spezifität des sekundären Antikörpers wurde durch negative Kontrollfärbungen, die ohne Zusatz des primären Antikörpers durchgeführt wurden, bestätigt. Die Bestandteile des Schnittes, die mit den primären Antikörpern eine Verbindung eingegangen sind, zeigen sich rötlich angefärbt. Das restliche Gewebe erscheint grünlich.

Zwecks folgender Auswertungen wurden die behandelten Gewebeprobe mit dem Mikroskop (Mikroskop BX51; Olympus) und spezieller Software (Image Pro Plus®) in einer 10-fachen Vergrößerung abgescannt, von einer unbeteiligten Person verblindet und anschließend mithilfe des Mikroskopes und der Software analysiert. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen geschah zum einen quantitativ

durch eine computergestützte Berechnung der angefärbten und nicht gefärbten Pixelflächen auf der Gewebeprobe. Hier wurde der prozentuale Anteil der angefärbten Bereiche zum ungefärbten Restbereich der Tibia ermittelt.

Zum anderen wurde eine deskriptive Analyse der Intensität der angefärbten Areale von 3 unabhängigen Beobachtern vorgenommen. Für die deskriptive Auswertung wurde die Gewebeprobe im Bereich des Bohrkanals schematisch in vier Abschnitte, sog. Regions of Interest (ROI) eingeteilt:

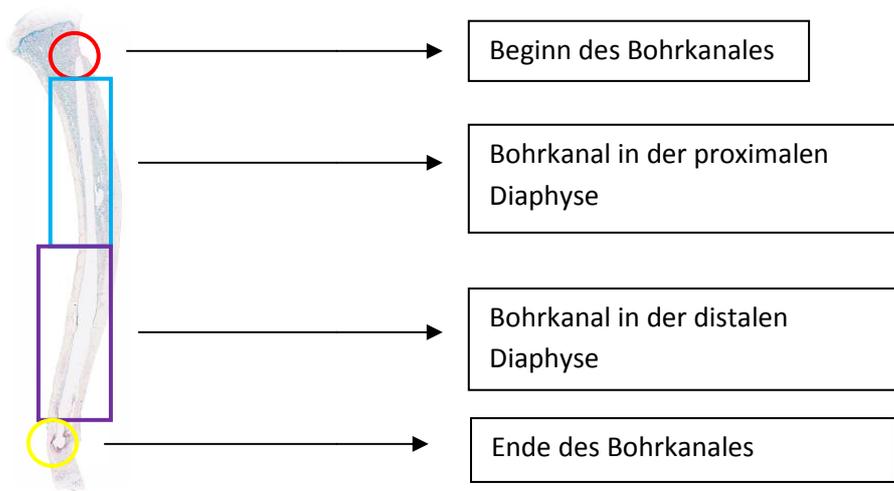


Abbildung 13: Die vier Regions of Interest (ROI) bei der deskriptiven immunohistochemischen Auswertung

Da der Bohrkanal nicht bei allen Gewebeproben in voller Länge angeschnitten war und auch bei der Gruppe **Expl./syst** kaum mehr vorhanden war, wurde hier der Bereich des mutmaßlichen Bohrkanals analysiert. Die Intensität der jeweiligen immunohistochemischen Färbung war an den osteolytischen Bereichen am stärksten und wurde in 4 verschiedenen Abstufungen angegeben. So konnten pro Schnitt 0-12 Scorepunkte erreicht werden.

0	Keine Färbung
1	Mild (Herd $\leq 0,3\text{cm}$)
2	Mäßig (Herd $0,3-0,7\text{cm}$)
3	Schwer (Herd $\geq 0,7\text{cm}$; mehrere Lokalisationen)

Tabelle 5: Scorewerte für die Bestimmung der Intensitäten der Anfärbung in der jeweiligen ROI

2.9. Zytochemische Substratfärbung

Mit der zytochemischen Substratfärbung wird die TRAP (Tartrate-resistant Acid Phosphatase) angefärbt, ein Enzym, das sich in den Zellen des mononukleären Phagozytensystems befindet. Es gilt als Biomarker für Osteoklasten und inflammatorische Makrophagen[160]. Wir verwendeten die Färbung, um in den Gewebeschnitten der Rattentibia die Osteoklasten aufzufinden und zu zählen.

Verarbeitet wurden hier ebenfalls die 5µm dicken axialen Paraffinschnitte der Tibia. Die Entparaffinisierung und Hydrierung liefen nach oben genanntem Schema ab. In einer Glasküvette wurden die Bestandteile aus dem Färbekit (Acid Phosphatase Leukocyte Trap Kit; Sigma Aldrich), 3,33µl/Gewebeprobe Naphtol AS-BI phosphoric acid, 13,32µl/Gewebeprobe Acetat solution und 6,66µl/Gewebeprobe Tartrate solution mit 80ml gewärmten Aqua dest. gemischt und mit den Proben im Dunkeln bei 37°C für 60min inkubiert. Anschließend wurde dieser Mischung jeweils 3,33µl/Gewebeprobe Fast Garnet GBC base solution und Sodium nitrite solution aus dem Kit hinzu gegeben und das Ganze erneut für 8min bei 37°C im Dunkeln stehen gelassen. Gegengefärbt wurde anschließend mit der Hematoxylin Solution. Danach mussten die Schnitte für 15min unter fließendem Leitungswasser entbläut werden und konnten dann mit einem wasserhaltigen Einschlussmittel eingedeckt werden. Das angefärbte Zytoplasma stellte sich nun rötlich da. Die Zellkerne blieben blau.

Auch hier wurde eine quantitative Auswertung am Olympus BX51 Mikroskop durchgeführt. Dafür wurden an den verblindeten Proben in 10 bis 40-facher Vergrößerung im Bereich des Bohrkanals die Kortikalis analysiert indem alle Trap-positiven multinukleären (≥ 3 Kerne) als Osteoklasten identifiziert und gezählt wurden. Da auffiel, dass die Anzahl der Zellkerne mit der Intensität der jeweiligen Destruktion korrelierte, wurden zusätzlich bei jedem Osteoklast die Zellkerne in 40-facher Vergrößerung gezählt.

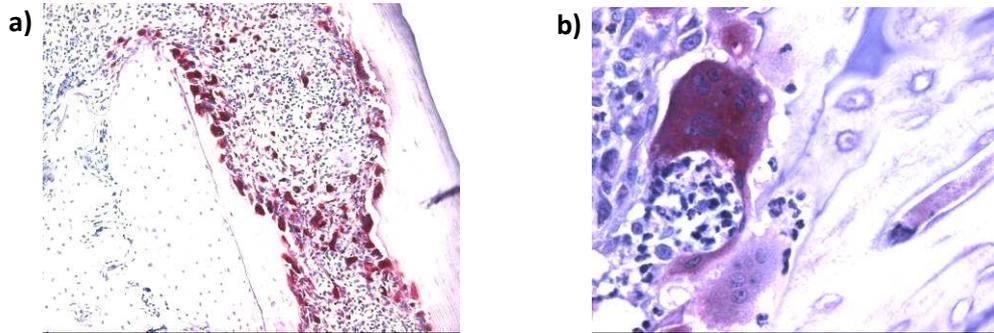


Abbildung 14: Fotos von Tartrate-resistent Acid-Phosphatase(TRAP)-positiven polynuklearen Osteoklasten in unseren Proben

Die Mikroskopfotos zeigen links **a)** eine Osteolysezone in der Kortikalis (20x) und rechts **b)** einen mehrkernigen Osteoklasten an der Kortikalis (40x)

2.10. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit freundlicher Unterstützung durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Universität Münster vorgenommen. Von den Verlaufsparemtern Körpertemperatur, Körpergewicht und Blutwerten wurden Mittelwerte und die Standardabweichungen errechnet.

Alle gewonnenen Daten wurden mit der Statistik-Software SPSS (Version 15.0, SPSS Inc. Chicago, USA) ausgewertet und bearbeitet. Dazu wurden Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane und Perzentilen sowie Korrelationsanalysen nach Spearman erstellt.

Um zwei voneinander unabhängige Stichproben miteinander vergleichen zu können, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Bei der Varianzanalyse mehrerer unabhängiger Stichproben benutzten wir den Kruskal-Wallis-Test. Die grafische Darstellung erfolgte in Form von Tabellen, Balken-Säulen- und Liniendiagrammen sowie in Form von Boxplots.

3. Ergebnisse

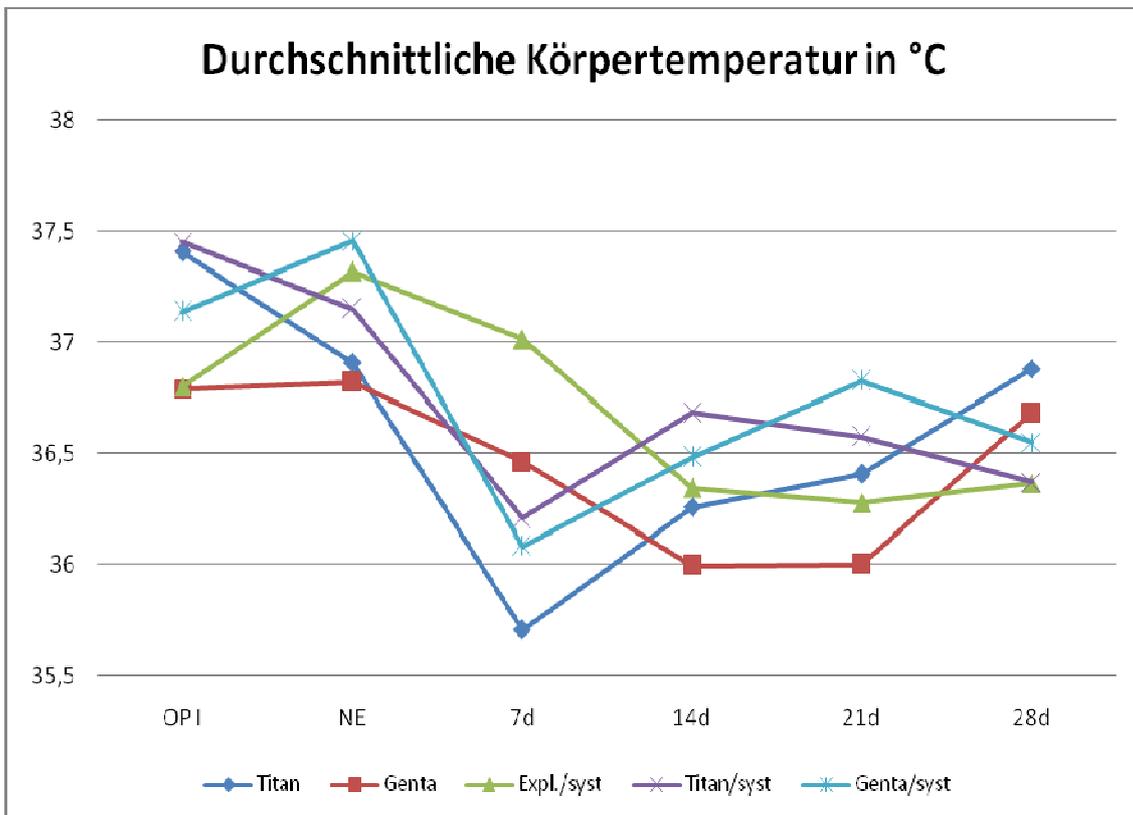
3.1. Verlaufskontrollen

3.1.1. Körpertemperatur

Die Verlaufparameter Körpertemperatur, Körpergewicht und das Blutbild wurden bei jedem operativen Eingriff und danach in wöchentlichen Abständen bis zum Tag der Tötung insgesamt 6-mal pro Tier erhoben und mit den physiologischen Werten für die Laborratte verglichen[161].

	OP	NE	U7d	U14d	U21d	U28d
Titan	37,4±0,6	36,9±0,7	35,7±1,5	36,3±0,6	36,4±0,7	36,9±0,5
Genta	36,8±0,6	36,8±0,5	36,5±0,6	36,0±0,9	36,0±0,6	36,7±0,6
Expl./syst	36,8±0,7	37,3±0,5	37,0±0,9	36,3±0,8	36,3±0,5	36,4±0,9
Titan/syst	37,5±0,8	37,2±0,6	36,2±0,9	36,7±0,7	36,6±0,6	36,4±0,4
Genta/syst	37,1±0,8	37,5±0,6	36,1±0,4	36,5±0,9	36,8±0,7	36,6±0,5

Tabelle 6: Mittelwerte der durchschnittlichen Körpertemperatur in °C ± Standardabweichung



Grafik 1: Mittelwerte der Körpertemperaturen [°C] im Verlauf als Liniendiagramm

Wenn man den Verlauf der Körpertemperatur betrachtet, so zeigt sich in der ersten Woche der Infektion nur in den Gruppen **Expl./syst** und **Genta/syst** ein Anstieg der Körpertemperatur, wobei die Erhöhungen nur im Vergleich zur Gruppe **Genta** signifikant sind. Deutlicher ist dagegen der Temperaturabfall in allen Gruppen vom Zeitpunkt des NE zum 7d, wobei hier die Gruppe **Expl./syst** signifikant höhere Werte aufweist als alle anderen Gruppen. Im weiteren Verlauf gleichen sich die Werte wieder an, bis an 28d in allen Gruppen die Ausgangstemperatur annähernd erreicht wird. Die Temperatur-Schwankungen befanden sich im Normbereich.

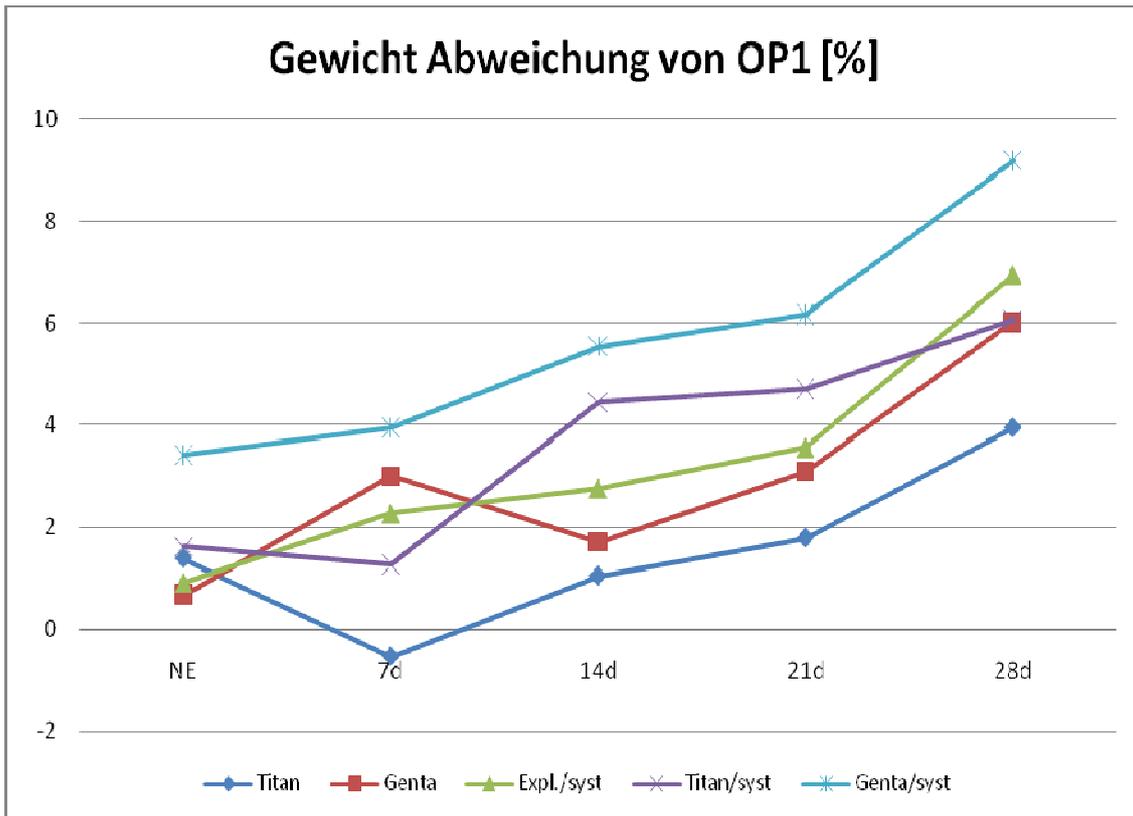
3.1.2. Körpergewicht:

	OP	NE	U7d	U14d	U21d	U28d
Titan	261±24	264±24	259±20	263±23	265±20	270±20
Genta	258±17	259±15	265±14	262±15	266±15	273±15
Expl./syst	243±10	245±11	248±11	249±9	251±10	259±11
Titan/syst	249±20	252±20	251±20	259±20	260±20	263±20
Genta/syst	237±10	245±14	247±13	250±11	252±13	259±11

Tabelle 7: durchschnittliches Körpergewicht als Mittelwerte [g] ± Standardabweichung

Im Laufe des Versuches kann man in allen Gruppen eine gesunde Wachstumstendenz der Tiere feststellen. Eine Gewichtsabnahme im Verlauf ist nur an 7d bei **Titan** und **Titan/syst** und an 14d bei **Genta** zu beobachten, wobei nur die Abnahme an 7d bei **Titan** auch um 0,38% unter das Ausgangsgewicht sinkt.

Ein signifikant höheres Gewicht finden wir in der Gruppe **Titan** gegenüber **Expl./syst** und **Genta/syst** an den Tagen NE und 21d und in der Gruppe **Genta** gegenüber **Expl./syst** und **Genta/syst** an allen Zeitpunkten. Allerdings war in den beiden Gruppen **Titan** und **Genta** das Ursprungsgewicht schon erheblich höher, womit sich diese Signifikanzen relativieren. Insgesamt stieg das Körpergewicht von durchschnittlich 249,4±9,9g am ersten OP-Tag zu 264,9±6,4g am Tag der Tötung an.

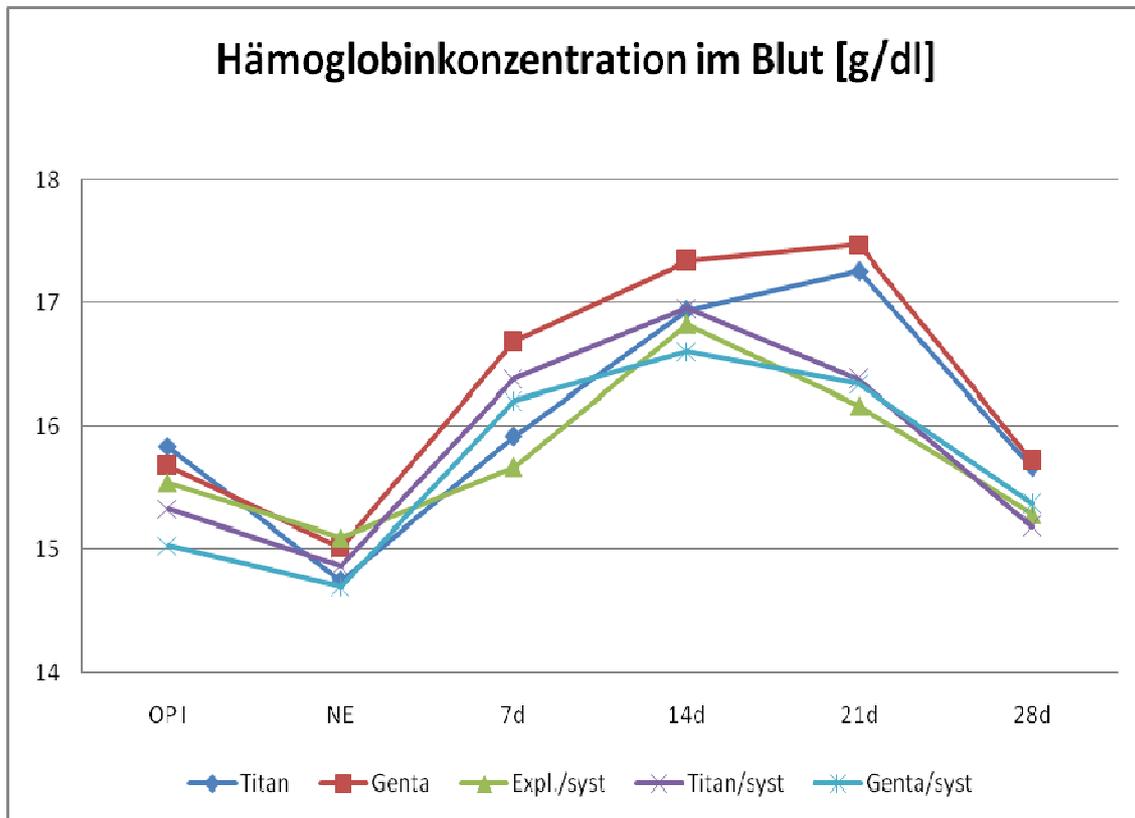


Grafik 2: prozentuale Abweichung des Körpergewichtes im Vergleich zum Ausgangsgewicht [%] als Liniendiagramm (Wertetabelle im Anhang)

3.1.3. Hämoglobin

	OP	NE	U7d	U14d	U21d	U28d
Titan	15,8±0,6	14,7±0,6	15,9±3,4	16,9±0,6	17,3±0,5	15,7±0,6
Genta	15,7±0,8	15,0±0,7	16,7±0,6	17,3±0,7	17,5±0,8	15,7±0,7
Expl./syst	15,5±0,6	15,1±0,6	15,7±1,1	16,8±0,9	16,2±0,7	15,3±0,8
Titan/syst	15,3±0,9	14,9±0,6	16,4±1	17,0±1,2	16,4±1	15,2±0,6
Genta/syst	15,0±0,6	14,7±0,6	16,2±0,8	16,6±0,6	16,3±0,5	15,4±0,5

Tabelle 8: Mittelwerte der Hämoglobinkonzentration [g/dl] im Verlauf ± Standardabweichung



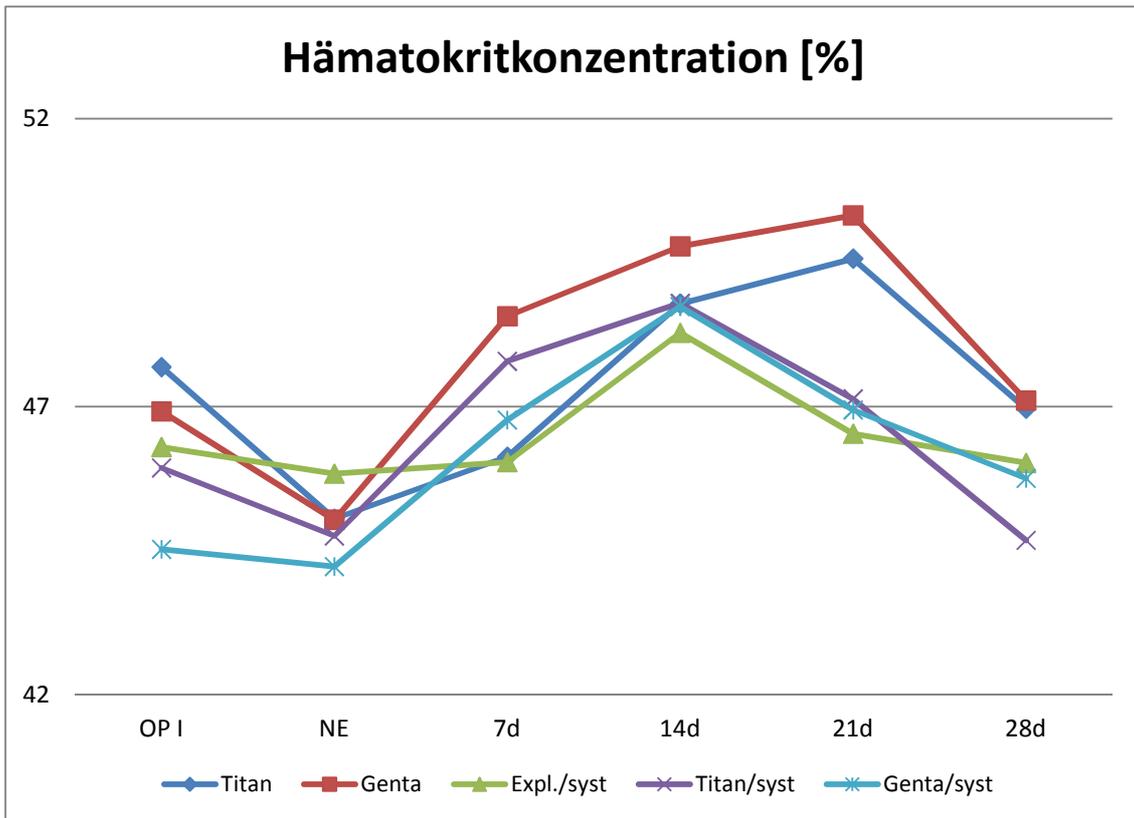
Grafik 3: Mittelwerte der Hämoglobinkonzentration [g/dl] im Verlauf als Liniendiagramm

Alle Hb-Werte bewegen sich in dem für Ratten physiologischen Bereich von 11-19,2 g/dl.

3.1.4. Hämatokrit

	OP	NE	U7d	U14d	U21d	U28d
Titan	47,7±1,9	45,1±1,7	46,1±8,9	48,8±1,7	49,6±1,2	47,0±1,9
Genta	46,9±2,0	45,0±1,6	48,6±1,6	49,8±1,5	50,3±1,9	47,1±1,4
Expl./syst	46,3±1,9	45,8±1,7	46,0±2,7	48,3±2,2	46,5±1,6	46,0±1,9
Titan/syst	45,9±2,4	44,8±1,7	47,8±2,7	48,8±3,3	47,1±2,6	44,7±1,6
Genta/syst	44,5±2,0	44,2±1,9	46,8±2,0	48,7±1,8	46,9±1,7	45,8±1,7

Tabelle 9: Mittelwerte der Hämatokritkonzentration [%] ± Standardabweichung



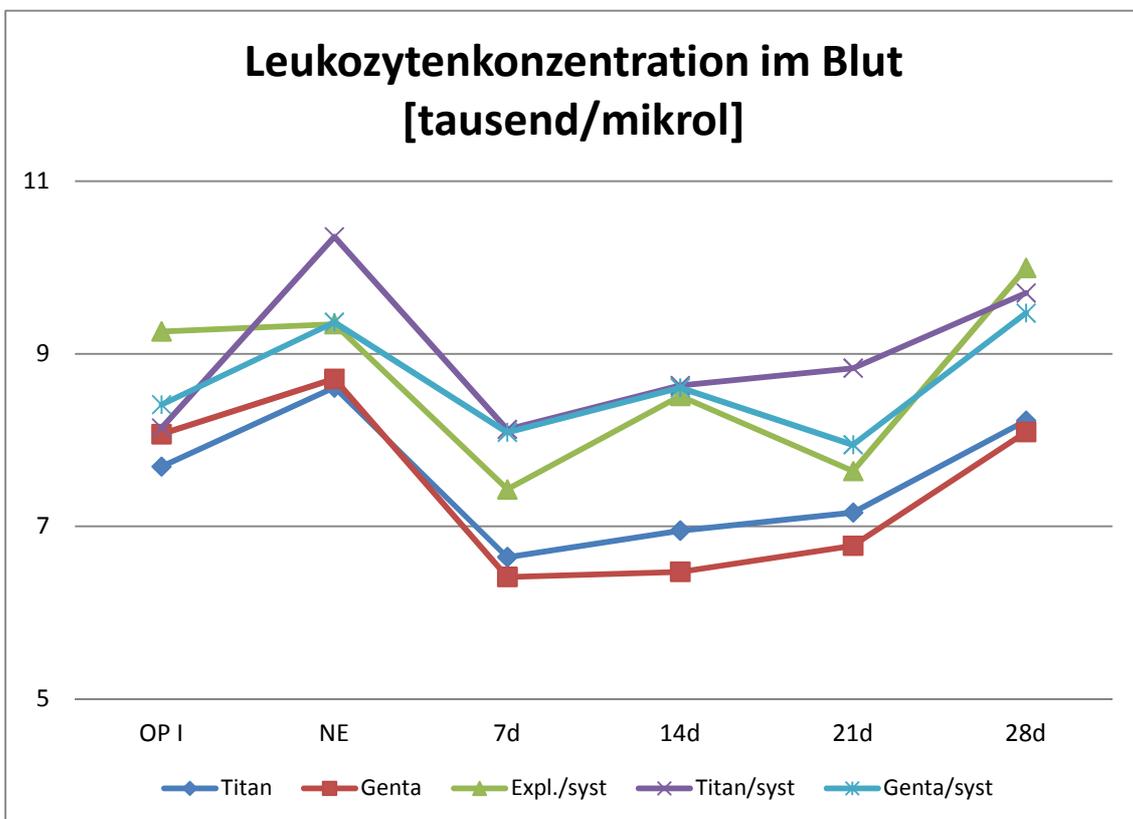
Grafik 4: Mittelwerte der Hämatokritkonzentration [%] im Verlauf als Liniendiagramm

Alle Hkt-Werte bewegen sich in dem für Ratten physiologischen Bereich von 36-54%. Nach der Infektion im ersten Eingriff fallen in allen Gruppen der Hb- und Hkt-Wert gleichförmig ab. Ab dem NE zeigt sich aber sofort wieder ein Anstieg der Werte, die ihr Maximum am 14d oder 21d erreichen. An Tag 21d haben die Gruppen **Titan** und **Genta** signifikant höhere Hkt-Werte als alle anderen Gruppen, allerdings sind in diesen Gruppen die Tiere auch am schwersten. Danach fallen sie in allen Gruppen an 28d wieder Richtung Ausgangswerte von OP I zurück.

3.1.5. Leukozyten

	OP	NE	U7d	U14d	U21d	U28d
Titan	7,7±2,4	8,6±2,7	6,6±2,6	7,0±1,7	7,2±1,7	8,2±2,2
Genta	8,1±1,6	8,7±1,8	6,4±1,3	6,5±2,0	6,8±1,5	8,1±1,5
Expl./syst	9,3±1,4	9,3±1,4	7,4±1,3	8,5±1,7	7,6±1,2	10,0±1,5
Titan/syst	8,1±1,2	10,4±1,9	8,1±2,0	8,6±2,1	8,8±3,1	9,7±1,7
Genta/syst	8,4±1,8	9,4±2,1	8,1±1,7	8,6±1,8	8,0±1,8	9,5±1,9

Tabelle 10: Mittelwerte der Leukozytenanzahl im Blut [Tausend/ μ l]
± Standardabweichung



Grafik 5: Mittelwerte der Leukozytenzahlen im Blut [Tausend/ μ l] im Verlauf als Liniendiagramm

Alle Leukozyten-Werte bewegen sich in dem für Ratten physiologischen Bereich von 6-18 Tausend/Mikroliter.

In der Grafik sieht man in allen Gruppen deutlich den Anstieg der Leukozytenkonzentration von OP I, dem Zeitpunkt der Infektion, zu NE. Den steilsten Anstieg erkennt man in der Gruppe **Titan/syst**, die auch signifikant höhere Werte als **Titan**, **Genta** und **Genta/syst** aufweist. Den flachsten Anstieg zeigt die Gruppe **Expl./syst**.

Im Verlauf fällt die Leukozytenkonzentration an 7d in allen Gruppen allerdings wieder rapide ab, um dann Richtung 28d zunehmend anzusteigen. Hier zeigen die Gruppen **Genta** und **Titan** den stärksten Abfall, wobei die Gruppe **Genta** signifikant niedrigere Leukozytenzahlen zeigt als alle Gruppen mit systemischer antibiotischer Therapie.

3.2. Mikrobiologische Auswertung

Die mikrobiologische Analytik bestand aus der Bestimmung der Colony Forming Units (CFU) im Inokulat und Knochenmehl, dem Nachweis von Erregern im Herzblut und Nierenmehl und der Beurteilung der Abstriche und abgerollten Implantate mit ihren Bouillons.

3.2.1 Keimzahl im Inokulat

	Inokulat (Anzahl der CFU)
Titan	514 ± 297
Genta	539 ± 302
Expl./syst	889 ± 0
Titan/syst	1000 ± 0
Genta/syst	875 ± 1190

Tabelle 11: Mittelwerte der injizierten Keimmengen bei den Tieren der immunhistochemische Auswertung ± Standardabweichung

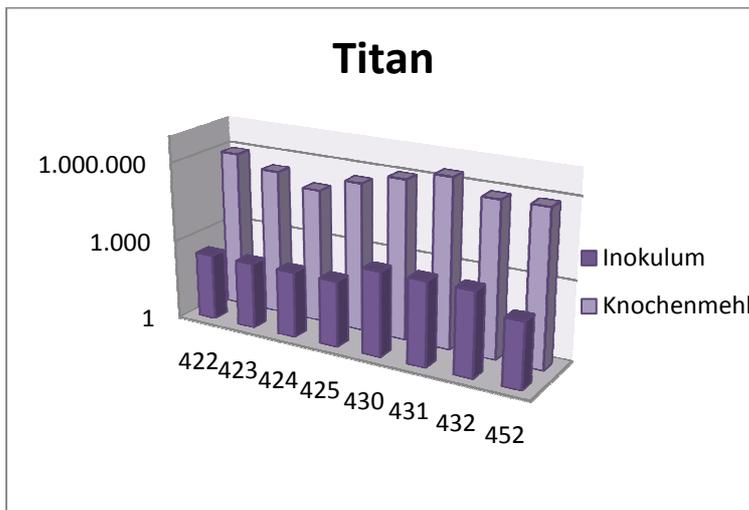
	Inokulat (Anzahl der CFU)
Titan	777 ± 643
Genta	1140 ± 1130
Expl./syst	1540 ± 1070
Titan/syst	937 ± 1160
Genta/syst	1220 ± 0

Tabelle 12: Mittelwerte der injizierten Keimmengen bei den Tieren der mikrobiologischen Auswertung ± Standardabweichung

3.2.2. Keimzahl im Knochenmehl

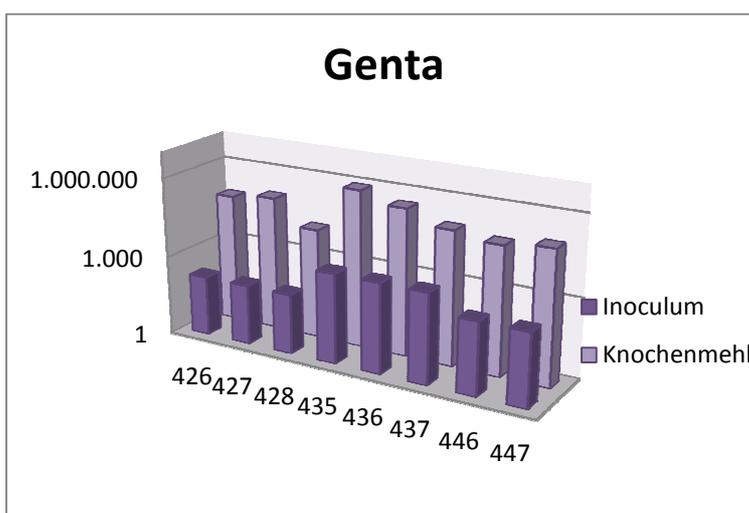
Das Knochenmehl (KM) wurde bei den Tieren der mikrobiologischen Auswertungsreihe (n=40) analysiert.

Die folgenden, nach Gruppen sortierten Diagramme und die dazugehörigen Tabellen verdeutlichen den Zusammenhang zwischen dem primär eingebrachten Keim-Inokulat und der resultierenden Keimmenge im Knochenmehl am Tag der Tötung (28d).



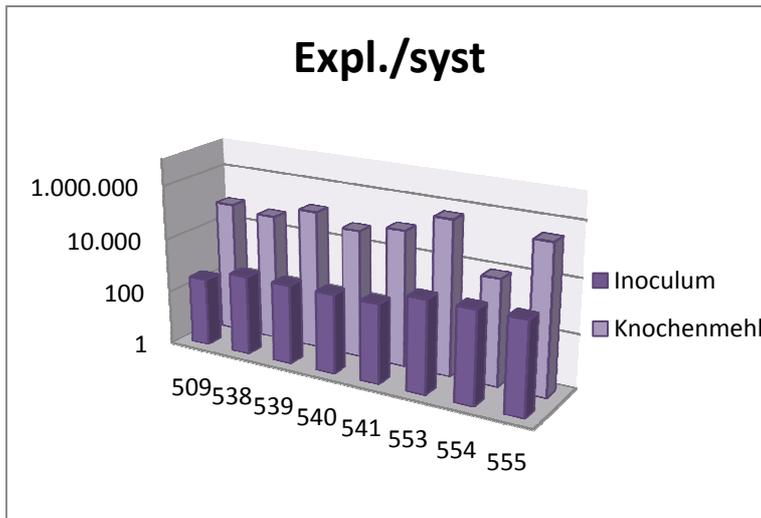
	CFU/g KM	Inokulat Titan
422	885000	313
423	328267	313
424	118045	313
425	401367	313
430	1031100	1553
431	2278900	1553
432	690033	1553
452	723558	300

Grafik 6: Vergleich der Mittelwerte von Inokulat [CFU] und Keimzahl im KM [CFU/g] in der Gruppe Titan anhand eines Balkendiagrammes mit Datentabelle



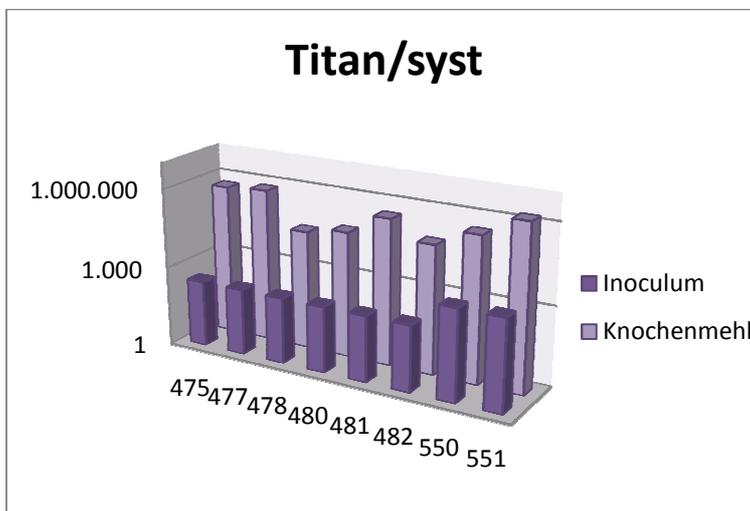
	CFU/g KM	Inokulat Titan
426	77310	181
427	123478	181
428	14560	181
435	866100	2486
436	356300	2486
437	113267	2486
446	66527	548
447	104980	548

Grafik 7: Vergleich der Mittelwerte von Inokulat [CFU] und Keimzahl im KM [CFU/g] in der Gruppe Genta anhand eines Balkendiagrammes mit Datentabelle



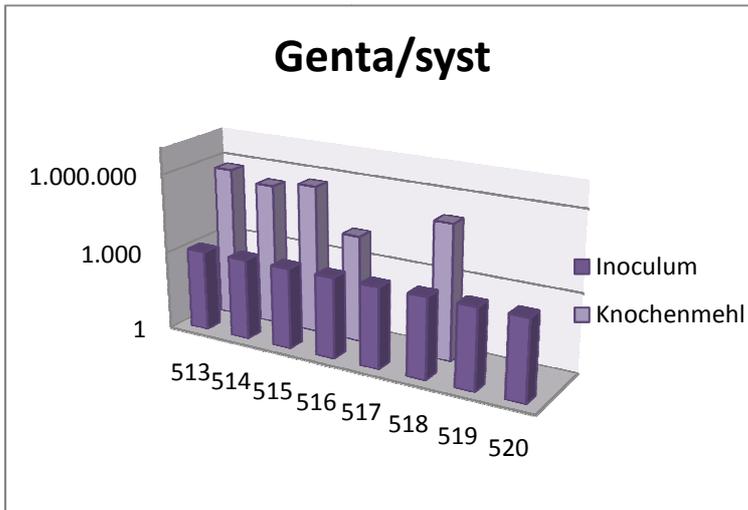
	CFU/g KM	Inokulat Titan
509	77310	333
538	50500	889
539	140900	889
540	54030	889
541	107100	889
553	511600	2810
554	8531	2810
555	320250	2810

Grafik 8: Vergleich der Mittelwerte von Inokulat [CFU] und Keimzahl im KM [CFU/g] in der Gruppe Expl./syst anhand eines Balkendiagrammes mit Datentabelle



	CFU/g KM	Inokulat Titan
475	495933	312
477	641250	312
478	31203	312
480	56060	312
481	335750	312
482	71740	312
550	305167	2810
551	1690167	2810

Grafik 9: Vergleich der Mittelwerte von Inokulat [CFU] und Keimzahl im KM [CFU/g] in der Gruppe Titan/syst anhand eines Balkendiagrammes mit Datentabelle



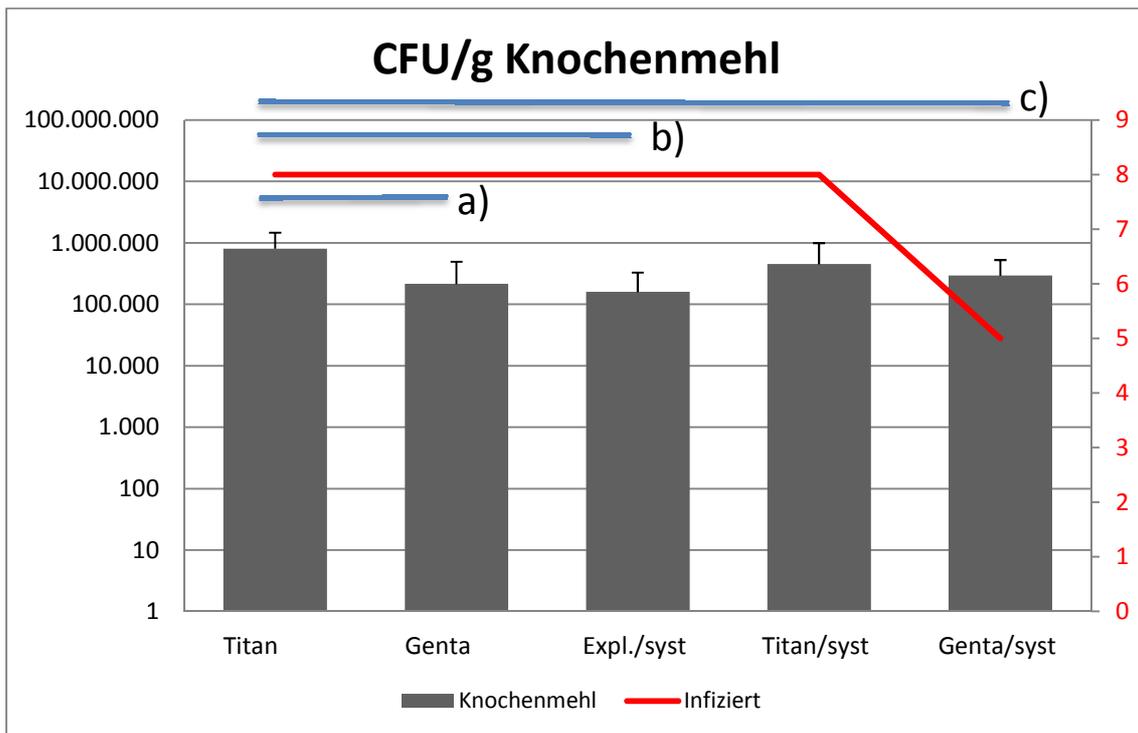
	CFU/g KM	Inokulat Titan
513	596750	1216
514	260200	1216
515	458825	1216
516	11547	1216
517	steril	1216
518	140853	1216
519	steril	1216
520	steril	1216

Grafik 10: Vergleich der Mittelwerte von Inokulat [CFU] und Keimzahl im KM [CFU/g] in der Gruppe Genta/syst anhand eines Balkendiagrammes mit Datentabelle

Überwiegend haben die Tiere mit den höchsten CFU/g Knochenmehl auch die konzentriertesten Keimsuspensionen initial bekommen.

Es gibt ein Tier, bei dem eine hohe initiale Keimzahl nur ein niedriges CFU/g Knochenmehl (**Expl./syst** Tier 554) erzeugt und drei Tiere, bei denen trotz konzentriertem Inokulat sogar eine sterile Tibia gefunden wird (**Genta/syst** Tiere 517/519/520).

In der folgenden Grafik 11 sind die durchschnittlichen Keimmengen [CFU/g] im Knochenmehl der infizierten Tiere in den verschiedenen Gruppen angegeben. Die rote Linie gibt die Anzahl der jeweils an 28d infizierten Tiere an (n=8 pro Gruppe).



Grafik 11: Durchschnittliche Mittelwerte der CFU-Anzahl/g KM und Infektionsrate pro Gruppe in Form eines kombinierten Balken-Liniendiagrammes; a)p=0,012, b)p=0,005, c)p=0,011

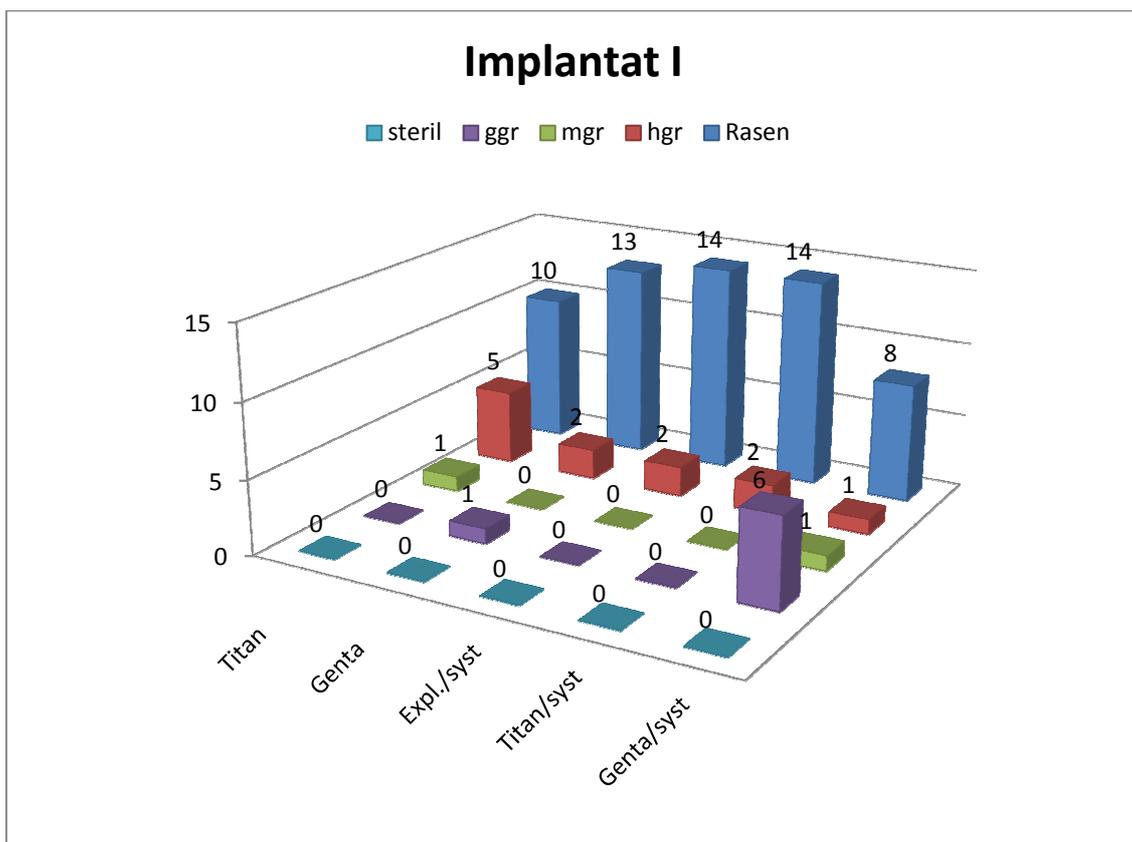
In der Gruppe, die ausschließlich mit Titanimplantaten therapiert wurde, zeigt sich durchschnittlich die höchste Keimzahl, sie ist signifikant höher als die der Gruppen a) **Genta** (p=0,012), b) **Expl./syst** (p=0,005) und c) **Genta/syst** (p=0,011). Die zweithöchste Keimzahl weisen die Tiere auf, die zusätzlich zu dem Titanimplantat eine systemische Gentamicingabe bekommen haben, allerdings ist diese nicht signifikant höher als die der anderen Gruppen.

Die drei niedrigsten Werte findet man in den Gruppen **Genta**, **Expl./syst** und **Genta/syst**, wobei diese sich untereinander nicht signifikant unterscheiden.

3.2.3. Implantat-Auswertung

In diese Auswertung gehen nur die Tiere der mikrobiologischen und immunhistochemischen Auswertung mit ein.

Das positive Keimwachstum auf der Abrollung des Implantat I ist, vergleichbar mit einem intraoperativem Abstrich, als sicheres Zeichen für die *S.aureus*-Infektion in der Tibia zu werten, die die Voraussetzung für unsere Versuchsreihe bildet.



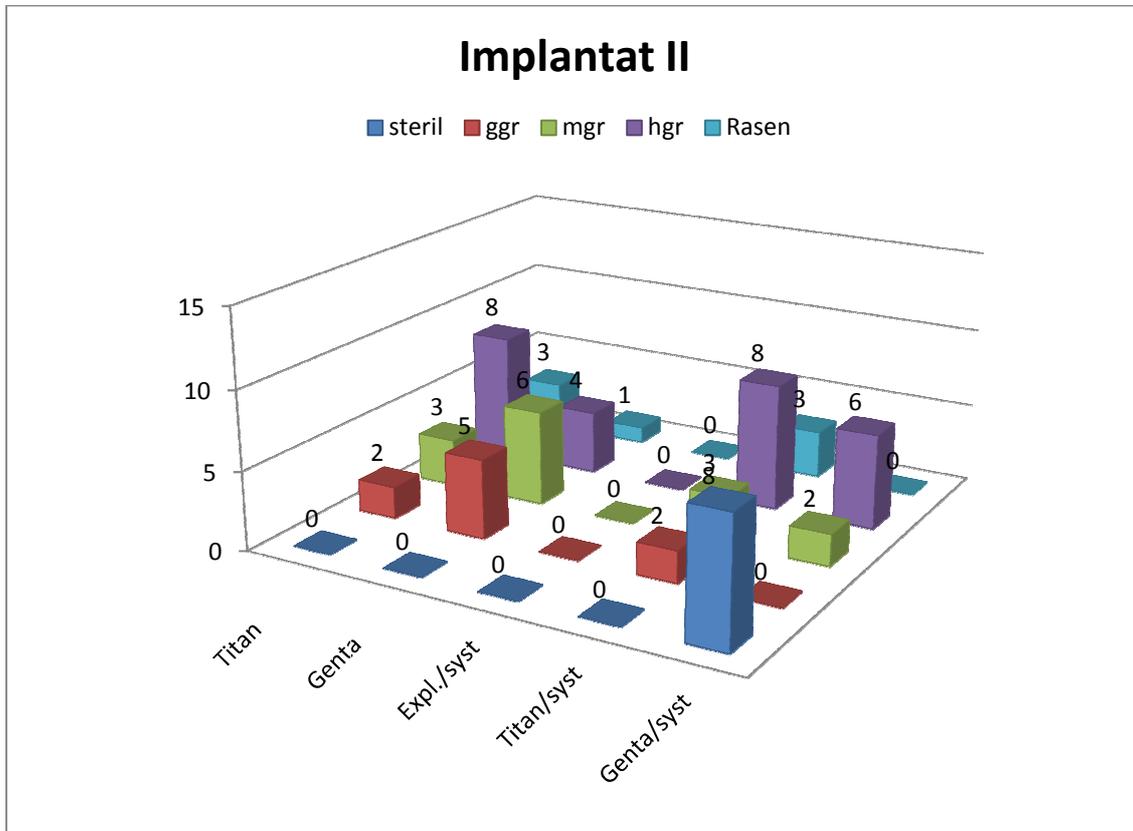
Grafik 12: Intensitäten der bewachsenen Abrollungen des Implantat I bei allen Tieren der Immunhistochemischen und mikrobiologischen Auswertung (n=80) in Form eines 3D-Säulendiagrammes

Da kein Implantat I steril geblieben ist, liegt hier eine 100%ige Infektionsrate vor.

Die Gruppen **Genta**, **Expl./syst** und **Titan/syst** unterscheiden sich kaum in der Ausprägung der Implantatbewachsung. Nur die Gruppe **Titan** mit 1mgr und 5 hgr bewachsenen und die Gruppe **Genta/syst** mit 6 ggr und 1 mgr bewachsenen Implantat-Abrollungen zeigen eine leicht verminderte Infektionsintensität.

Das Implantat II wurde beim NE allen Tieren außer der Gruppe **Expl./syst** implantiert (n=64) und bestand bei den Gruppen **Titan** und **Titan/syst** aus unbeschichtetem Titan

und bei den Gruppen **Genta** und **Genta/syst** aus PDLLA+10%Gentamicin beschichteten Titanimplantaten.



Grafik 13: Intensitäten der bewachsenen Abrollungen des Implantat II bei allen Tieren der Immunhistochemischen und mikrobiologischen Auswertung (n=64), (Ausschluss Gruppe Expl./syst) in Form eines 3D-Säulendiagrammes

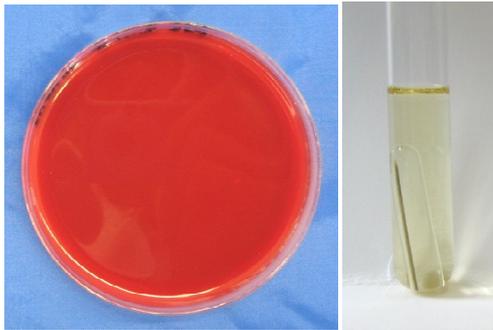
Hier finden wir in allen Gruppen weniger Rasen-, sondern eher mgr. bis hgr. Wachstum. Besonders die Gruppen **Titan** und **Titan/syst** liegen eher im oberen Bereich mit je 11 Implantaten, die Rasen- oder hgr- Wachstum zeigen. In der Gruppe **Genta** gibt es nur 1 Rasen und 4 hgr, in der Gruppe **Genta/syst** sogar kein Rasen und nur 6 hgr Kulturen.

Besonders fällt auf, dass unter den insgesamt 16 Tieren der Gruppe **Genta/syst** 8 Tiere in der Implantat II-Abrollung steril waren. Von den 8 Tieren wurden 3 Tiere mikrobiologisch ausgewertet: hier blieben ebenfalls die Abstriche vom Bohrkanal als auch die Analyse des Knochenmehls steril. Dies ist ein Therapieerfolg von 50% für die Anwendung des PDLL-10%Gentamicin-beschichteten Implantates und die zusätzliche systemische Antibiotikagabe.

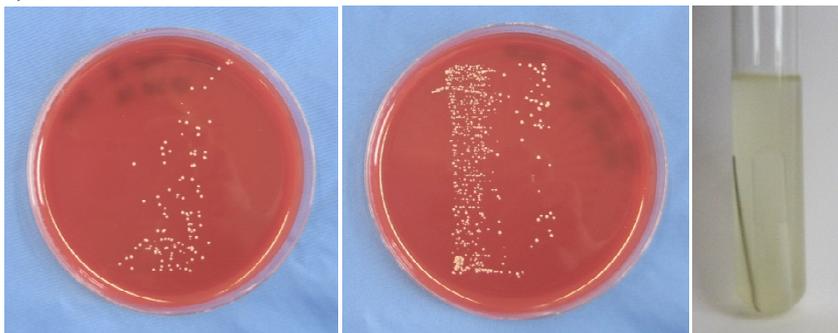
Alle Implantate, die ein Wachstum auf den Blutagarplatten zeigten, zeigten ebenfalls eine Trübung in der Boullion. Bodensatz, Verfärbungen oder Gasbildung fanden wir bei

keiner der Boullions. Die Implantate, die in der Abrollung steril geblieben sind, verursachten alle eine klare Boullion.

Die Zusammenschau der Daten für die Implantatabrollungen macht deutlich, dass sich das Keimwachstum an den Implantaten vom Zeitpunkt des NE bis zum Tag der Tötung 28d in allen Gruppen reduziert hat bzw. wenigstens gleichgeblieben ist. Am stärksten ist die Reduktion in den Gruppen **Genta** und **Genta/syst**.



a)



b)



c)

d)

Grafik 14: repräsentative Fotos der Implantatabrollung aus den verschiedenen Gruppen:

- a) sterile Blutagarplatte, klare Boullion, Gruppe Genta/syst;
- b) links: ggr. Wachstum, Mitte: mgr. Wachstum, leicht getrübt Boullion, Gruppe Genta;
- c) hgr. Wachstum mit getrübt Boullion, Gruppe Titan/syst;
- d) Bakterienrasen mit getrübt Boullion; Gruppe Titan;

Folgende Tabelle zeigt den Zusammenhang zwischen Inokulat und Keimmenge im Knochenmehl zu den Kulturen der beiden Implantate und dem Abstrich.

Gruppe	Tier	Inokulat [CFU]	Keimzahl [CFU/g KM]	Implantat I	Implantat II	Abstrich
Titan	422	313	885000	hgr	hgr	steril
	423	313	328267	hgr	mgr	ggr
	424	313	118045	mgr	ggr	steril
	425	313	401367	hgr	mgr	ggr
	430	1553	1031100	Rasen	hgr	mgr
	431	1553	2278900	Rasen	hgr	mgr
	432	1553	690033	Rasen	hgr	ggr
	452	300	723558	Rasen	Rasen	mgr
Genta	426	181	77310	hgr	mgr	steril
	427	181	123478	Rasen	ggr	ggr
	428	181	14560	Rasen	ggr	steril
	435	2486	866100	Rasen	Rasen	ggr
	436	2486	356300	Rasen	hgr	steril
	437	2486	113267	Rasen	hgr	steril
	446	548	66527	Rasen	hgr	ggr
	447	548	104980	Rasen	hgr	mgr
Expl./syst	509	333	77310	Rasen	x	hgr
	538	889	50500	Rasen	x	ggr
	539	889	140900	hgr	x	Rasen
	540	889	54030	Rasen	x	mgr
	541	889	107100	Rasen	x	steril
	553	2810	511600	Rasen	x	ggr
	554	2810	8531	hgr	x	ggr
	555	2810	320250	Rasen	x	Rasen
Titan/syst	475	312	495933	Rasen	Rasen	hgr
	477	312	641250	Rasen	Rasen	Rasen
	478	312	31203	Rasen	hgr	mgr
	480	312	56060	hgr	hgr	mgr
	481	312	335750	Rasen	ggr	steril
	482	312	71740	Rasen	hgr	mgr
	550	2810	305167	Rasen	hgr	Rasen
	551	2810	1690167	Rasen	mgr	steril
Genta/syst	513	1216	596750	Rasen	hgr	mgr
	514	1216	260200	Rasen	hgr	mgr
	515	1216	458825	Rasen	hgr	hgr
	516	1216	11547	Rasen	hgr	steril
	517	1216	steril	hgr	steril	steril
	518	1216	140853	Rasen	mgr	ggr
	519	1216	steril	ggr	steril	steril
	520	1216	steril	ggr	steril	steril

Tabelle 13: Zusammenfassung der mikrobiologischen Ergebnisse aller Gruppen

In den Gruppen ohne die systemische Gabe von Gentamicin ist es in der Regel so, dass ein hohes Inokulat auch eine hohe Keimzahl im Knochenmehl bzw. am Implantat erzeugt. Bei den drei Gruppen mit zusätzlicher syst. Gentamicingabe ist dies nicht mehr durchgängig der Fall. In der Gruppe **Expl./syst** bei Tier 554 finden wir bei einem Inokulat von 2810 CFU nur eine Keimanzahl von 8531 CFU/g Knochenmehl, das Implantat I ist zwar noch hgr bewachsen, das Implantat II dagegen nur noch ggr, was auch mit der Keimzahl im Knochenmehl korreliert.

Die Tiere, die an 28d als steril gelten (517, 519 und 520) sind auch im Abstrich steril geblieben.

3.2.4. Systemischer Keimnachweis

Die Ausstriche des Herzblutes auf den Blutagarplatten blieben bei allen Tieren steril.

In den Blutkulturen wurde bei zwei Tieren der Gruppen **Titan** und **Genta** ein positives Wachstum eines *S.aureus* gefunden.

In einer Blutkultur wurde ein *Streptokokkus agalactiae* gefunden, der nach Analyse der Medizinischen Mikrobiologie als Kontamination gewertet wurde.

Die Ausstriche des Nierenmehls waren bei 9 von 10 untersuchten Tieren steril. Bei einem Tier der Gruppe **Genta** fanden wir ein positives Wachstum eines *S.aureus*. Alle gefundenen *S.aureus* wurden durch eine Vitek®-Analyse der Mikrobiologische Medizin des UKM als der primär eingebrachte *Staphylokokkus aureus*-Stamm identifiziert.

Bei insgesamt drei Tieren (aus den Gruppen **Titan** und **Genta**) konnten wir so eine generalisierte Infektion im Sinne einer Sepsis nachweisen (7,5% bei n=40).

Gruppe	Tier	Inokulat [CFU]	Keimzahl [CFU/g KM]	Implantat I	Implantat II
Titan	423	313	328300	hgr	mgr
Titan	432	1550	690000	Rasen	hgr
Genta	427	181	123500	Rasen	ggr

Tabelle 14: Mikrobiologische Infektparameter der Tiere mit generalisierter Infektion

Die Keimzahlen im KM liegen bei allen drei Tieren im mittleren Bereich, wobei jeweils die Menge der eingebrachten CFU mit der CFU-Anzahl im Knochenmehl positiv korreliert. Das Ergebnis spiegelt auch die Analyse der Abrollungen des Implantats II wieder.

Die Abstriche vom Bohrkanal waren bei allen drei Tieren ggr bewachsen, der Ausstrich des Herzblutes war steril.

3.2.5 SCV-Diagnostik

Mikrobiologische Proben der Tiere mit lokaler bzw. systemischer Gentamicintherapie gingen in die weitergehende SCV-Diagnostik ein (n=96).

Die SCVs des *S.aureus* zeigen bekanntermaßen folgende Charakteristika [162]:

- bis zu 10-fach kleinere Kolonien
- langsames Wachstum (42-72 Std.)
- reduzierte Pigmentierung
- verminderte Koagulase-Aktivität
- reduzierte hämolytische Aktivität.

Insgesamt fanden wir so 4 definitive Verdachtsfälle von SCV-Wachstum, die von der Medizinischen Mikrobiologie der Uniklinik Münster (UKM) im Vitek® 2XL (Bio Merieux) weiter analysiert wurden.

Gruppe//Tier	Probe	Ergebnis im Vitek®
Genta//426	Knochenmehl	SCV nach zusätzl. PCR
Genta//427	Knochenmehl	98,78% <i>S.aureus</i> *
Titan/syst // 551	Knochenmehl	99% <i>S.aureus</i>
Genta/syst // 501	Implantat II	<i>Api coryne</i> -Bakterium (Kontamination)

Tabelle 15: Ergebnisse in der Vitek®-Analyse der auffälligen Proben in der oben beschriebenen SCV-Analytik

In der Vitek®-Untersuchung kann anhand der Abgleichung des typischen Biomusters eine Keimidentifizierung gemacht werden. Zusätzlich wird eine Resistenzbestimmung angefertigt, mit der wir die gefundenen Bakterien mit dem Ursprungskeim vergleichen können.

Eine der vier Proben erwies sich hier als SCV des verwendeten *S.aureus*-Stammes. Dieses Ergebnis wurde mit einer zusätzlichen PCR gesichert.

Bei den Tieren 427 und 551 wurde der mutmaßliche SCV als *S.aureus* identifiziert. Allerdings zeigt der Erreger von 427 eine Varianz im Biomuster (*=AGLU-), die Resistenzbestimmung stimmt aber überein.

Zusätzlich wurde in jeder Gruppe der Mikrobiologischen Auswertung das Knochenmehl der beiden Tiere mit der höchsten Keimmenge im Vitek® auf SCV getestet:

Gruppe//Tier	Ergebnis im Vitek®
Titan//430	99,0% <i>S.aureus</i>
Titan//431	99,0% <i>S.aureus</i>
Genta//435	85,0% <i>S.aureus</i> * ₁
Genta//436	99,0% <i>S.aureus</i>
Expl./syst//553	99,0% <i>S.aureus</i>
Expl./syst//555	99,0% <i>S.aureus</i>
Titan/syst//477	99,0% <i>S.aureus</i>
Titan/syst//551	99,0% <i>S.aureus</i>
Genta/syst//513	99,0% <i>S.aureus</i>
Genta/syst//514	99,0% <i>S.aureus</i>

Tabelle 16: Ergebnisse in der Vitek®-Analyse der zwei Tiere mit den höchsten Keimzahlen in jeder Gruppe (*1= AlaA-, sSOR+, URE+, NAG -)

Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass alle diese Tiere mit dem ursprünglich injizierten *S.aureus* infiziert waren. Einzig die Kultur des Tieres 435 zeigt Abweichungen in der Biomuster-Analyse (*1= AlaA-, sSOR+, URE+, NAG -), die Resistenzbestimmung stimmt überein.

Insgesamt wurden also n=98 Tiere, die lokal und/oder systemisch mit Gentamicin behandelt wurden oder die höchste Keimzahl aufwiesen, untersucht. Hierbei spielte es keine Rolle, ob sie der Mikrobiologischen, Immunhistochemischen oder Histologischen Auswertung angehörten.

Von den 98 untersuchten Proben konnten wir bei einem Knochenmehlausstrich den SCV des *S.aureus* isolieren. Dies ergibt eine Rate von **1,02%**.

Dieses Tier (426) wurde ausschließlich lokal mit einem PDLLA/10%Gentamicin-beschichteten Implantat (**Genta**) behandelt, welches über einen Zeitraum von 4 Wochen in der Tibia belassen wurde.

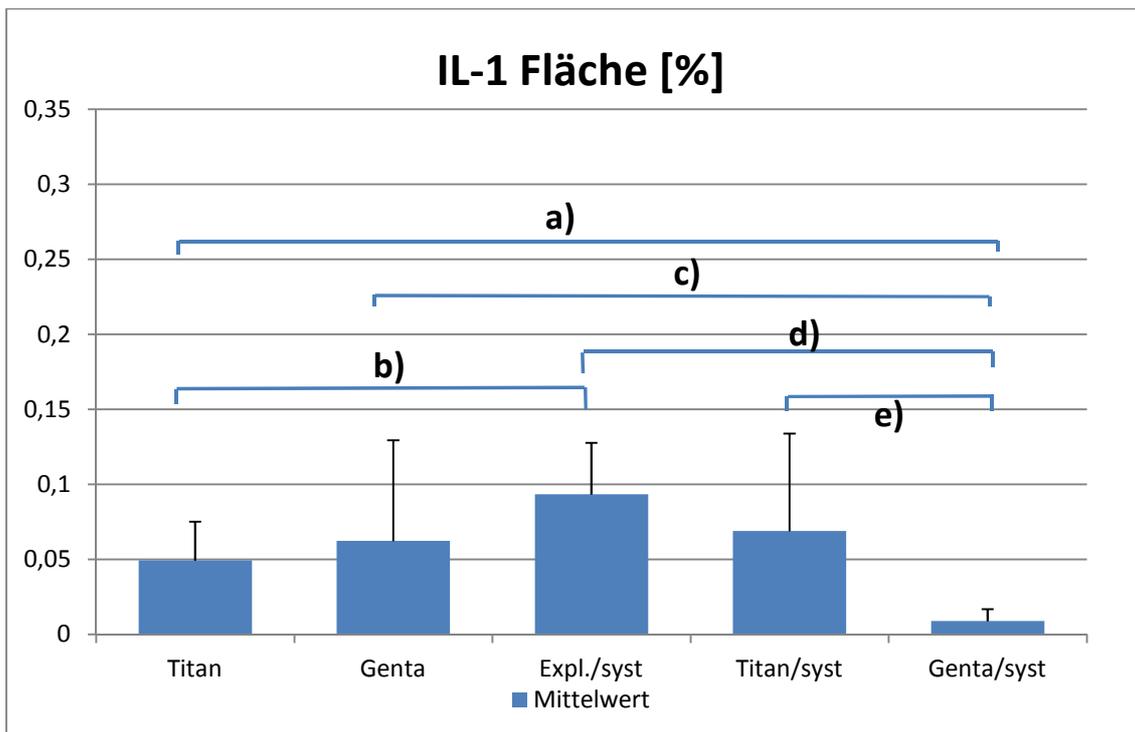
3.3. Immunhistochemische Auswertung:

Im Folgenden werden die Ergebnisse der quantitativen und deskriptiven Analysen der immunhistochemischen Färbungen **IL-1 α** , **IL-6** und **MCP-1** dargestellt.

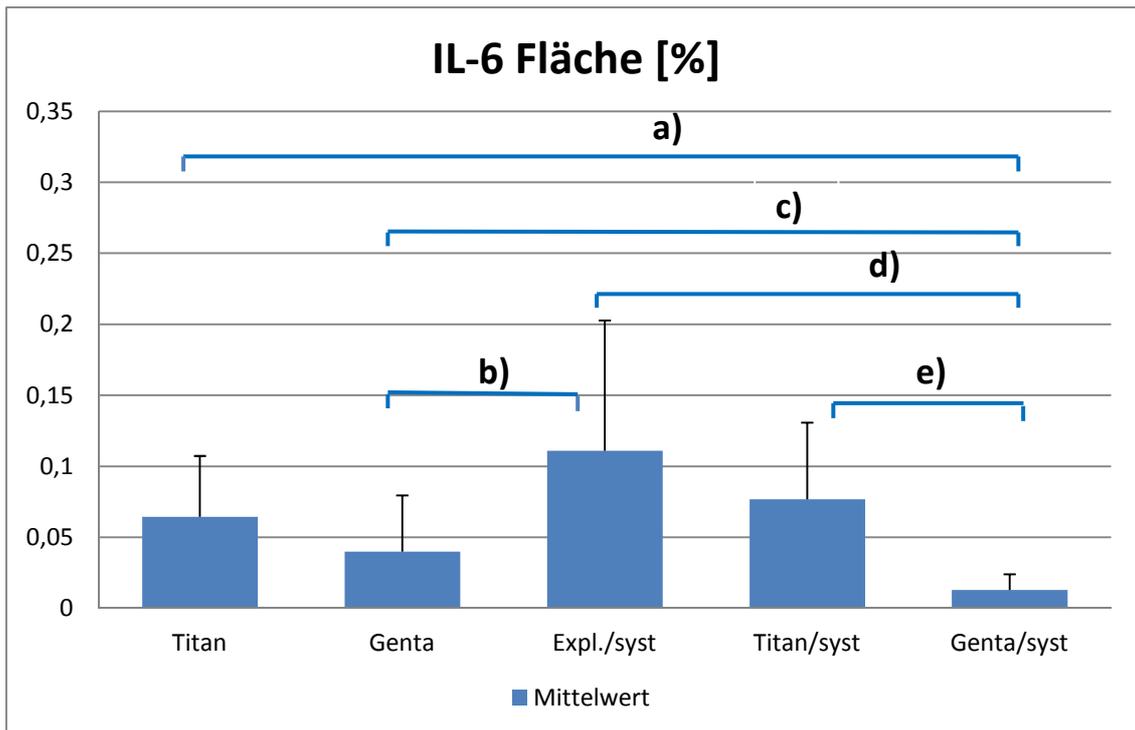
3.3.1. Quantitative Flächenberechnung:

	IL-1 [%]	IL-6 [%]	MCP-1 [%]
Titan	0,049 \pm 0,026	0,064 \pm 0,043	0,126 \pm 0,095
Genta	0,062 \pm 0,067	0,040 \pm 0,040	0,036 \pm 0,022
Expl./syst	0,093 \pm 0,035	0,111 \pm 0,092	0,184 \pm 0,124
Titan/syst	0,069 \pm 0,065	0,077 \pm 0,054	0,097 \pm 0,069
Genta/syst	0,009 \pm 0,008	0,013 \pm 0,011	0,059 \pm 0,042

Tabelle 17: Die errechneten Pixelflächen [%] als Anteil der Gesamtfläche des jeweiligen Tibiaschnittes



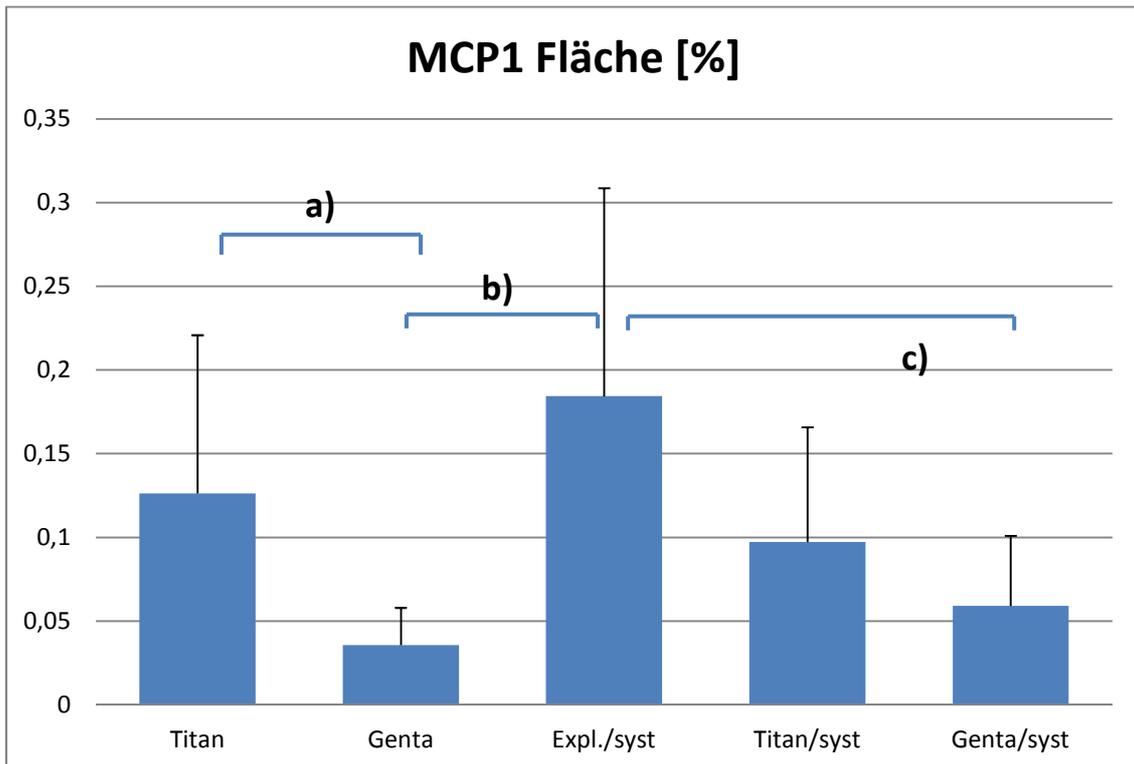
Grafik 15: Die errechneten MW der Pixelflächen [%] der IL-1-Färbung als Anteil der Gesamtfläche des Tibiaschnittes in Form eines Säulendiagrammes mit Standardabweichungen, Signifikanzen: a) p=0,002, b) p=0,027, c) p=0,027, d) p=0,001, e) p=0,012



Grafik 16: Die errechneten MW der Pixelflächen [%] der IL-6-Färbung als Anteil der Gesamtfläche des Tibiaschnittes in Form eines Säulendiagrammes mit Standardabweichungen, Signifikanzen: a) $p=0,003$, b) $p=0,021$, c) $p=0,046$ d) $p=0,001$ e) $p=0,009$

Bei den Interleukin-Färbungen zeigen die einzelnen Gruppen ganz ähnliche Tendenzen. **Genta/syst** zeigt signifikant die geringste angefärbte Fläche von allen Gruppen, was auf einen verminderten Entzündungsprozess bei diesen Tieren schließen lässt. Geringe Anfärbungen zeigt ebenfalls **Genta** in der IL-6 und MCP-1-Färbung, wobei die Signifikanz nur gegenüber **Expl./syst** und bei der MCP-1 Färbung auch gegen **Titan** gegeben ist. Hier zeigt die **Genta**-Gruppe sogar die niedrigste angefärbte Fläche.

Den höchsten Anteil der angefärbten Fläche in allen drei Färbungen zeigt deutlich die Gruppe **Expl./syst**. In der IL-1 Färbung ist sie gegenüber **Titan** und **Genta/syst**, bei der IL-6 und MCP1 Färbung gegenüber **Genta** und **Genta/syst** signifikant erhöht. Zum einen finden wir hier vermehrte makroskopisch sichtbare floride Entzündungen, zum anderen gibt es hier durch den fehlenden Bohrkanal auch mehr Fläche für das Ansammeln von Entzündungszellen und ihre Zytokine.



Grafik 17: Die errechneten MW der Pixelflächen [%] der MCP-1-Färbung als Anteil der Gesamtfläche des Tibiaschnittes in Form eines Säulendiagrammes mit Standardabweichungen, Signifikanzen: a) $p=0,021$, b) $p=0,016$, c) $p=0,046$

3.3.2. Deskriptive Beurteilung:

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen **IL-1**, **IL-6** und **MCP1** wurden zusätzlich deskriptiv analysiert. Die gefärbten Tibiaschnitte wurden randomisiert von drei unabhängigen Beobachtern analysiert und bewertet. Pro Schnitt konnten 0-12 Punkte für die Intensität der Färbung vergeben werden. Aus den Ergebnissen wurde in jeder Gruppe der Median berechnet und anhand von Boxplots statistisch analysiert.

	IL-1	IL-6	MCP 1
Titan	8,5	8,33	9,33
Genta	5,67	5,33	6,83
Expl./syst	10,5 ^a	10,33 ^a	10,67 ^c
Titan/syst	8,33	7,17	9,17
Genta/syst	2,00 ^b	1,67 ^b	3,83 ^b

Tabelle 18: Die Mediane der Scorepunkte aller Gruppen in den jeweiligen

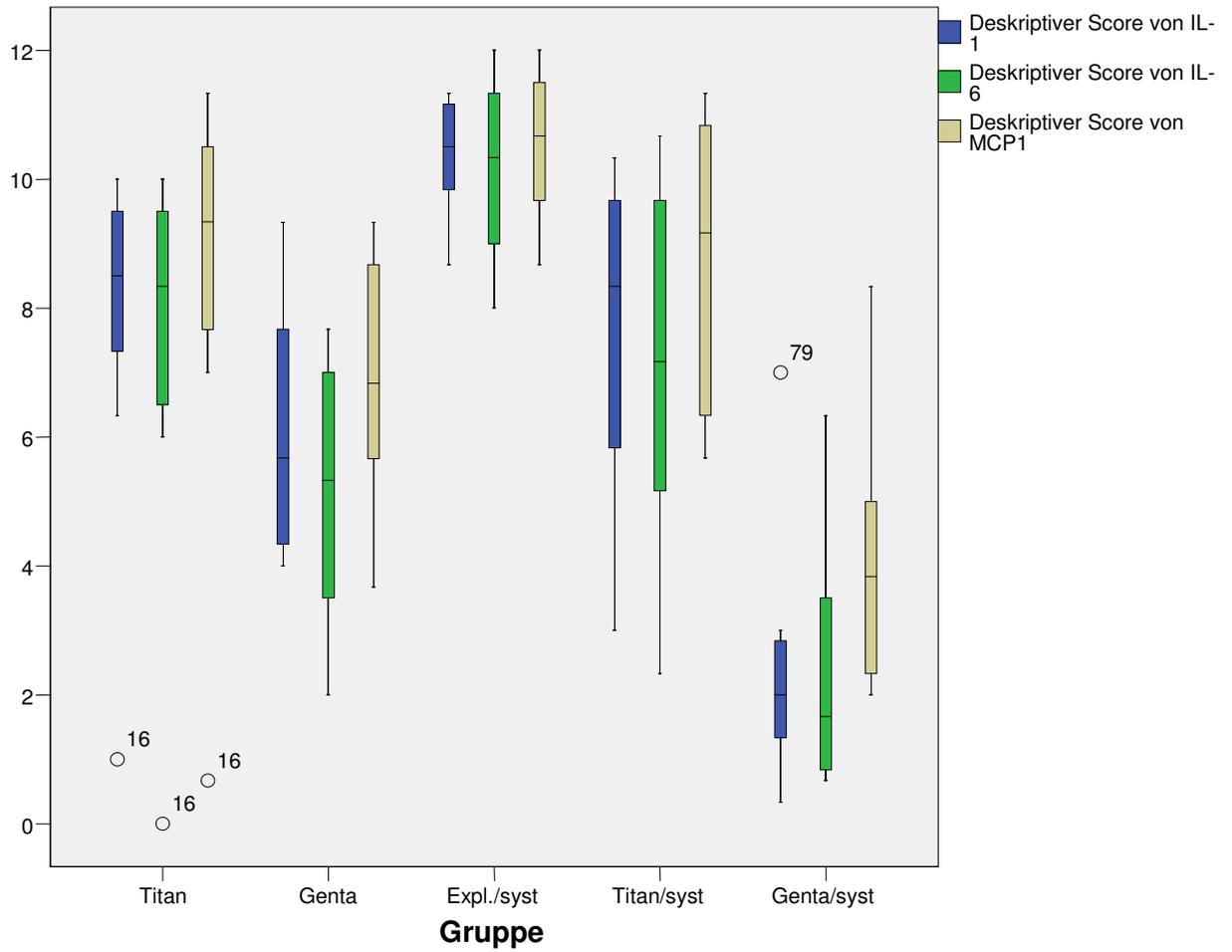
Antikörperfärbungen, **a**=signifikant höherer Score als alle anderen Gruppen, **b**= signifikant niedrigerer Score als alle anderen Gruppen, **c**= signifikant höherer Score als **Genta** und **Genta/syst**

In der statistischen Auswertung der deskriptiven Beurteilung zeigt die Gruppe **Expl./syst** in allen drei Färbungen die höchsten Scorewerte für die Intensität der Entzündungsherde. Diese sind in den Interleukinfärbungen signifikant ($p < 0,05$) höher als in allen anderen Gruppen, bei der MCP1-Färbung signifikant höher als bei **Genta** und **Genta/syst**.

Die Gruppe **Genta/syst** weist dagegen in allen drei Färbungen signifikant weniger angefärbte Bereiche auf als alle anderen Gruppen.

Die Gruppen **Genta**, **Titan** und **Titan/syst** unterscheiden sich nicht signifikant in ihren Scorewerten, dabei zeigt hier Genta die zweitniedrigsten Werte hinter der kombinierten Therapie, **Titan/syst** und **Titan** unterscheiden sich kaum und weisen die dritt- und vierthöchsten Werte auf.

Die vier ROI Bohrloch, proximaler und distaler Bohrkanal und Bohrkanalende zeigen in ihrer Anfärberate keine ausschlaggebenden signifikanten Unterschiede.



Grafik 18: Deskriptive Scoreverteilung über die Intensität der immunhistochemischen Färbungen in den verschiedenen Gruppen in Form eines Boxplots

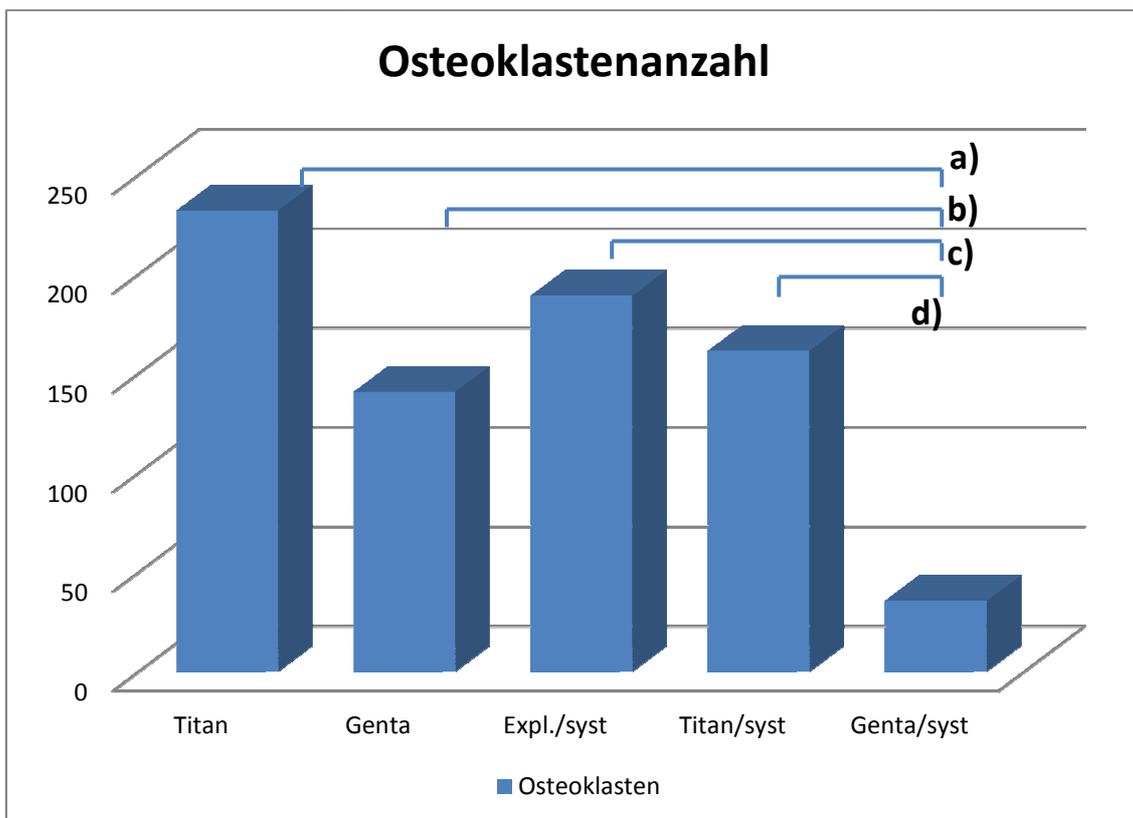
3.4. Zytochemische Substratfärbung

Die Trap-Färbung ist eine zytochemische Substrat-Färbung der Osteoklasten in einem Gewebe. Die Tartrat-Resistente Acid Phosphatase katalysiert die Hydrolyse verschiedener Phosphorsäure-Ester unter sauren Bedingungen im Zytoplasma der Osteoklasten.

3.4.1. Osteoklastenzahl

Osteoklasten treten vermehrt auf, wenn Knochensubstanz um- bzw. abgebaut wird, zum Beispiel auch im Laufe eines Entzündungsprozesses, der mit Osteolysen einhergeht. Vorläuferzellen von Osteoklasten fusionieren zu fertigen Osteoklasten. Durch wiederholte Fusionen kann ein Osteoklast bis zu 60 Zellkerne enthalten.

In der Zählung der Osteoklasten fällt auf, dass in der Gruppe **Genta/syst** signifikant weniger Osteoklasten zu finden sind als in allen anderen Gruppen. Die meisten Osteoklasten sind in den Gruppen **Titan** und **Expl./syst** zu finden, obwohl sich diese Ergebnisse signifikant nur von der Gruppe **Genta/syst** unterscheiden.

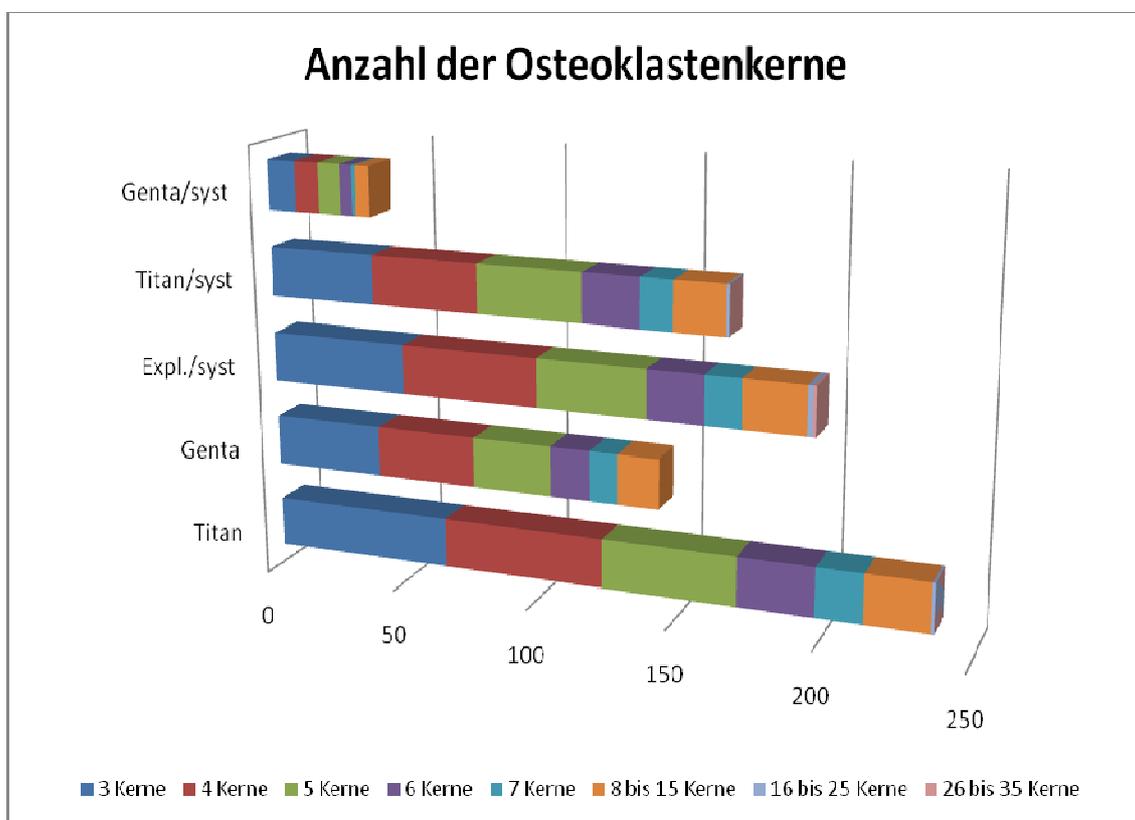


Grafik 19: Auszählung der Osteoklasten in bis zu 40facher Vergrößerung an der Kortikalis des Bohrkanales entlang, Darstellung in Form eines Säulendiagrammes
 Signifikanzen: a)p=0,001, b)p=0,003, c)p=0,001, d)p=0,001

3.4.2 Zellkernanzahl der Osteoklasten

Wie in der Einleitung beschrieben, geht eine erhöhte Aktivität der Osteoklasten mit einer erhöhten Zellkernanzahl einher. Deshalb wurden die Osteoklasten, die gezählt wurden, in 40facher Vergrößerung auch auf die Anzahl ihrer Zellkerne analysiert.

Den größten Anteil an den gezählten Osteoklasten machten in allen Gruppen die 3-5 kernigen Osteoklasten aus. Es fällt auf, dass die 16-35 kernigen Zellen nur in den drei Gruppen mit den größten Osteoklastenanzahlen auftreten. Diese drei Gruppen (**Titan**, **Expl./syst** und **Titan/syst**) zeigten auch im Röntgenbild an 28d die schwersten Osteolysen.



Grafik 20: Auszählung der Zellkerne in 40facher Vergrößerung in den gefundenen Osteoklasten in Form eines Balkendiagrammes

3.5. Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung ist nicht Teil dieser Promotionsarbeit und wurde durch Daniel Günther durchgeführt.

Es wurde eine Masson-Goldner-Färbung angewandt, um die unterschiedlichen Stufen der Osteomyelitis beurteilen zu können.

Die angefärbten Schnitte wurden randomisiert, digitalisiert und von 4 Personen unabhängig voneinander beurteilt und ausgewertet. Auswertungskriterien waren hierbei Vorhandensein von Abszessen, Sequester, Grad der Destruktion und Verbreiterung bzw. Verschmälerung der Kortikalis.

Zur Auswertung diente ein Scoresystem nach Petty et al[74].

Hierbei zeigten die Gruppen **Expl./syst** und **Titan** die schwersten Infektzeichen, wobei die Scorewerte signifikant höher waren als die der Gruppen **Titan/syst** und **Genta/syst**. Die Gruppen **Genta/syst** und **Titan/syst** wiesen dagegen nur minimale histologische Veränderungen im Sinne einer Infektion auf.

Als zweites histologisches Verfahren wurde die Van Kossa Färbung durchgeführt, um den Grad der Mineralisierung der Knochensubstanz nachzuweisen.

Auch hier findet man in der Gruppe **Expl./syst** die signifikant niedrigsten Mineralisierungsgrade als Ausdruck einer hohen Knochenschädigung. Die höchsten Werte zeigt die Gruppe **Genta/syst**, signifikant höher als die der Gruppen **Titan**, **Genta** und **Expl./syst**.

3.6. Radiologische Auswertung

Die radiologische Auswertung ist ebenfalls nicht Teil dieser Promotionsarbeit und wurde durch Daniel Günther durchgeführt.

Als klinischer Goldstandard der Diagnostik einer Osteomyelitis ist sie ein wichtiger Bestandteil unserer Arbeit und dient zusätzlich dazu, Zeichen eines chronischen Erkrankungsverlaufes zu erkennen.

Die Röntgenbilder im lateralen und p.a.-Strahlengang, die an den Tagen OPI, NE, 7d, 14d, 21d und 28d durchgeführt wurden, wurden randomisiert, von 4 unabhängigen Beobachtern analysiert und anhand eines modifizierten Scoresystems nach An und Friedmann ausgewertet[164]. Die Knochen wurden in drei Bewertungsregionen (Region of Interest=ROI) eingeteilt und auf Sequesterbildung, Spontanfrakturen und Deformitäten der Diaphyse untersucht. Ferner wurden die Weichteilschwellung, der Osteolysegrad und die diaphysäre periostale Reaktion beurteilt.

Die radiologischen Befunde stützen die Ergebnisse der anderen Auswertungen. Die ersten Zeichen der Osteomyelitis sieht man ab 7d nach dem einzeitigen Implantatwechsel, also 14d nach der Infektion. In keiner der Gruppen kann der Progress der Infektion aufgehalten werden. Sie unterscheiden sich jediglich in ihrer Ausprägung.

Im gesamten Verlauf nach dem Implantatwechsel zeigen die Gruppen **Genta/syst** und **Genta** die geringsten radiologischen Veränderungen im Sinne einer Osteomyelitis, die Gruppe **Expl./syst** dagegen die ausgeprägtesten. Auch am Tag der Tötung 28d findet man für die Tiere der Gruppe **Expl./syst** signifikant höhere Scorewerte als für die Gruppen **Genta**, **Titan/syst** und **Genta/syst**. Die Gruppe **Genta/syst** wurde dagegen zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant niedriger gescort als alle anderen Gruppen. Die alleinige lokale Therapie in der Gruppe **Genta** bekam zu allen Untersuchungszeitpunkten den zweitniedrigsten Scorewert, der aber nicht immer signifikant niedriger war als der der anderen Gruppen.

4. Interpretation der Ergebnisse

Die wöchentlichen klinischen, laborchemischen und radiologischen Verlaufskontrollen dienten zum einen der Sicherstellung des Gesundheitszustandes der Tiere und zum anderen dem Früherkennen einer systemischen Infektion.

Ein Anstieg der **Körpertemperatur** ist häufig ein Abwehrmechanismus des Körpers gegen eingedrungene Erreger bzw. eine Infektion.

Da Ratten einen weitaus aktiveren Stoffwechsel zeigen als Menschen, ist auch ihre normale durchschnittliche Körpertemperatur mit ca. 37,5-38,5°C höher.

Die Körpertemperatur der Ratte sollte nicht unter 35°C sinken, da sie bei solchen Temperaturen ihren Stoffwechsel nicht mehr aufrecht halten kann.

Die Körpertemperatur lag im gesamten Verlauf immer leicht unterhalb der für Ratten physiologischen Werte, wobei dies am ehesten durch den Gebrauch eines handelsüblichen Thermometers für Menschen zu erklären ist, mit dem man nicht tief in den Anus der Tiere gelangt und so auch nicht die echte Körperkerntemperatur sondern eher nur einen Verlauf messen kann.

Betrachtet man diesen Verlauf, so fällt in allen Gruppen die Temperatur nach dem Implantatwechsel an 7d ab, um ab 14d wieder anzusteigen.

Ein starker Temperaturanstieg oder -abfall im Sinne einer Sepsis konnte nicht beobachtet werden.

Das **Körpergewicht** stieg in allen Gruppen gleichförmig an, was mit dem physiologischen Wachstum zu erklären ist. Einen gravierenden Gewichtsabfall durch Schwächung des Tieres konnten wir nicht feststellen.

Bei einer Abnahme des Gewichtes von >10% des Ursprungsgewichtes hätte der Versuch aus tierschutzrechtlichen Gründen abgebrochen werden müssen. So eine Abnahme haben wir bei keinem der Tiere beobachtet.

Die Verlaufsgrafiken für den **Hb-Gehalt und die Hkt-Konzentration** sind bei allen Gruppen ähnlich.

So erreichen die Werte eine Woche nach der Infektion, also am Tag des Implantatwechsels in allen Gruppen den tiefsten Wert, was auf eine beginnende Schwächung des Organismus oder einen Blutverlust hindeuten kann. Nach dem zweiten Eingriff stiegen die Werte in allen Gruppen bis 21d an, um am 28d wieder etwas abzusinken, was auf den Beginn einer Chronifizierung der Infektion hinweisen kann.

Bei der Auswertung der **Leukozytenzahl** sticht hervor, dass in allen Gruppen der

Höchstwert am Tag des Implantatwechsels also eine Woche nach der initialen Infektion zu finden ist. Danach fallen auch hier die Werte gleichförmig ab, um an 28d wieder Richtung Höchstwert anzusteigen. Auch das kann auf eine Chronifizierung oder ein Wiederauflammen der Infektion hindeuten. Die Blutwerte liegen trotz der Schwankungen zu jedem Zeitpunkt im physiologischen Bereich, so dass wir hier an keinem Zeitpunkt des Versuches einen sicheren Hinweis für eine generalisierte Ausbreitung der Infektion sehen konnten.

Die **mikrobiologische Untersuchung** ist einer der wichtigsten Pfeiler zum klinischen Nachweis einer Infektion und dem verursachenden Erreger und letztlich zur Beurteilung der Effektivität der verschiedenen prophylaktischen und therapeutischen Ansätze in der Bekämpfung der implantatassoziierten Osteomyelitis unentbehrlich.

In der Analyse des Knochenmehls findet man insgesamt sehr hohe Keimzahlen ($>10^5$ CFU/g), die höchsten in der Gruppe **Titan**. Diese sind signifikant höher als in den Gruppen **Genta**, **Expl./syst** und **Genta/syst**, was die Notwendigkeit einer antibiotischen Therapie unterstreicht. Die zweithöchsten Keimzahlen zeigt die Gruppe **Titan/syst**, wobei diese nicht signifikant höher sind als in den anderen drei Gruppen.

Die Gruppen **Genta**, **Expl./syst** und **Genta/syst** unterscheiden sich in den durchschnittlichen Keimzahlen der infizierten Tiere nicht signifikant. Wichtig ist allerdings, dass in der Gruppe **Genta/syst** drei Tiere kein Keimwachstum im Knochenmehl, also keine Infektion zeigten.

Die Infektionsraten am Tag 28d sind demnach in den Gruppen **Titan**, **Genta**, **Expl./syst** und **Titan/syst** 100%, das entspricht einer Ausheilungsrate von 0,0%.

In der Gruppe **Genta/syst** sind drei Tiere steril geblieben. Hier beträgt die Infektionsrate 62,5%, das heißt, es konnte in 37,5% der Fälle durch die kombinierten Gentamicintherapie eine Ausheilung erreicht werden, was einen Therapieerfolg für die kombinierte Gentamicintherapie darstellt.

Für die Beurteilung der Effektivität der Therapie ist zu bedenken, dass die Mittelwerte der inokulierten Keime von Gruppe zu Gruppe variiert, obwohl eine Keimkonzentration von 10^3 CFU angestrebt wurde. So erreichten wir in den Gruppen **Titan** und **Titan/syst** durchschnittlich 777 bzw. 937 CFU, in den anderen Gruppen dagegen weit mehr: **Genta** mit 1140 CFU, **Expl./syst** mit 1540 CFU und **Genta/syst** mit 1220 CFU. Diese Informationen muss man in die Beurteilung der einzelnen Therapiemethoden mit einfließen lassen. Sie stärken die oben gemachten Aussagen über die geringe Wirksamkeit der alleinigen systemischen Therapie und die über die höhere Effektivität

der kombinierten Gentamicintherapie.

Auch war es logistisch nicht immer möglich, die Tiere einer Gruppe an einem Tag zu operieren, so dass sich innerhalb einer Gruppe unterschiedliche CFU-Mengen im Inokulat ergeben konnten.

Wie vorherige Arbeiten zeigten, machen auch unsere Ergebnisse deutlich, dass die Konzentration der eingebrachten Keimmenge ein ausschlaggebender Faktor für das Ausmaß einer primären Infektion ist[136,158]. Allerdings ist auch zu bedenken, dass es in diesem Zusammenspiel Ausnahmen gibt, bei denen offensichtlich noch andere Faktoren, wie das individuelle Immunsystem, das Alter, das Gewicht etc. eine Rolle spielen. Man muss hier, wie beim Menschen auch, von einem multifaktoriellen Geschehen ausgehen, was die Analyse der Therapieerfolge nicht einfacher macht.

Für weitere Arbeiten ist es wichtig, die Methode der Herstellung der initialen Keimsuspension zur Induktion der Infektion zu überdenken und zu verbessern, um den Störfaktor der unterschiedlich hohen Keiminokulate einzudämmen.

Die Abrollung des **Implantat I** wurde für den Beweis einer sicheren Infektion durchgeführt und zeigte eine Infektionsrate von 100%.

Mithilfe des Bewachungsgrades der **Implantatabröllung II** konnte die vorhandene Intensität der Infektion und so auch ein Therapieerfolg abgeschätzt werden.

Der Grad des Keimwachstums auf der Abrollung war in den Gruppen ohne lokale Therapie (**Titan** und **Titan/syst**) am höchsten.

Deutlich geringer war die Intensität in den Gruppen mit Gentamicin-beschichtetem Implantat (**Genta** und **Genta/syst**). In der Gruppe der kombinierten Gentamicintherapie (**Genta/syst**) gab es sogar 8 sterile Abrollungen bei n=16. Hier sprechen wir also von einer Ausheilungsrate von 50%. Die Tibiae dieser Tiere wurden teils mikrobiologisch, teils immunhistochemisch weiter analysiert und zeigten dort ebenfalls keine Anzeichen einer Infektion.

Die Auswertung der Abstriche, die unter sterilen Bedingungen am Tag der Tötung kurz vor Explantation des Implantates an der Bohrlochstelle der Tibia gemacht wurden, zeigen bei allen Tieren jeweils ein geringeres Wachstum an, als man es bei den entsprechenden Abrollungen der Implantate sieht. Die Aussagekraft des Abstriches in Bezug auf die Intensität der Infektion ist somit eher vernachlässigbar.

Eine Generalisierung der Infektion konnten wir bei drei Tieren, die keine systemische Therapie erhalten haben, nachweisen (2 Tiere **Titan**, 1 Tier **Genta**, n=40). Diese Sepsisrate von **7,5%** unterstreicht die Schwere der Osteomyelitis in den Gruppen **Titan** und **Genta**. Im Vergleich mit anderen Tieren dieser Gruppen, kann man keinen

prägnanten Unterschied in den sonstigen untersuchten Infektionsparametern feststellen.

Bei 98 Proben von Tieren mit lokaler und/oder systemischer Gentamicintherapie wurde auf einer Knochenmehl-Probe eines Tieres der Gruppe Genta ein SCV detektiert. Das ergibt eine Rate von 1,02%

Die Suche nach **SCV** des *S.aureus* macht vor allem Sinn, wenn man es mit chronisch, persistierenden Infektionen zu tun hat, die lokal oder systemisch mit Aminoglykosiden wie Gentamicin behandelt worden sind. Sie sind durch ihr Wachstumsverhalten schwieriger zu diagnostizieren, sind aber nicht selten Verursacher von komplexen Infektionsverläufen. Der Selektionsvorteil für die SCV bei Aminoglykosidtherapie ist als klarer Nachteil für diese Antibiotikagruppe zu werten und legt nahe, auch nach Alternativen zu suchen.

Eine weitere Auswertungsmethode stellt die **immunhistochemische Auswertung** dar. Hier werden die Zytokine IL-1, IL-6 und MCP-1, die als Entzündungsmediatoren und potente Osteolysefaktoren [184,185] während einer Infektion gelten und somit vermehrt in entzündlichem Gewebe zu finden sind [57-59], auf Gewebeschnitten angefärbt und in ihrer Intensität quantitativ und deskriptiv ausgewertet.

Beide Ergebnisse korrelieren miteinander und können gemeinsam diskutiert werden.

Die signifikant niedrigsten Werte, also die abgeschwächtesten Entzündungsreaktionen, sind bei den Tieren mit der kombinierten Therapie (**Genta/syst**) zu finden. Nur in der quantitativen Auswertung der MCP-1 Färbung sind die Werte der alleinigen lokalen Therapie (**Genta**) noch niedriger. Da die Gruppen **Genta** und **Genta/syst** in allen immunhistochemischen Färbungen quantitativ und deskriptiv die jeweils niedrigsten Werte zeigen, weist dies auf die gute Effektivität der kombinierten lokal/syst. Gentamicintherapie in der Eindämmung der Entzündung hin.

Die Gruppen **Titan** und **Titan/syst** zeigen hier, wie nach der mikrobiologischen Auswertung zu erwarten, ebenfalls hohe Entzündungsintensitäten, die fast immer signifikant höher sind als die Ergebnisse von **Genta/syst**. Diese Resultate weisen, wie die mikrobiologischen Analysen auch, auf eine nur unzureichende Wirkung der alleinigen systemischen Gentamicintherapie hin.

Abweichend von den bisherigen Analysen ist, dass die Gruppe mit dem explantierten Implantat (**Expl./syst**) in der immunhistochemischen Auswertung immer die höchste Entzündungsaktivität aufweist. Dies zeigten auch die histologischen und radiologischen Ergebnisse durch Daniel Günther, die insgesamt eng mit den Resultaten der

immunohistochemischen Auswertung korrelieren.

Die alleinige Explantation mit systemischer Antibiotikatherapie ist also kein sinnvoller Therapieansatz. Der Knochen scheint nach einer Woche Infektion und durch die Explantation so geschwächt oder instabil zu sein, dass die Infektion weiter unterhalten wird. Wahrscheinlich sorgt der aufgebohrte Markraum für genügend Platz und Oberfläche zur weiteren bakteriellen Besiedlung. Eine Instabilität durch vermehrte Osteolysen kann ein weiterer Grund der Infektionsausbreitung sein[126].

Dies scheint den ersten Eingriff, die Implantat-Entfernung, eines zweizeitigen Verfahrens in Frage zu stellen, obwohl hier zu bedenken ist, dass in der Klinik doch überwiegend der passagere Einbau eines Spacers oder Fixateurs zur Stabilisierung bevorzugt wird, den wir hier nicht simuliert haben.

Neben den Anfärbungen der Zytokine führten wir eine **zytochemische Substratfärbung** der **TRAP** (Tartrate-resistant-acid-phosphatase) im Zytosol der Osteoklasten durch[160], um diese auszuzählen.

Da Osteoklasten für den Knochenabbau zuständig sind und dieser vermehrt in geschädigtem oder entzündetem Gewebe zu finden ist, kann uns die Auszählung der Osteoklasten einen Hinweis auf die Schwere der Infektion geben.

Die Ergebnisse korrelierten annähernd mit denen aus der mikrobiellen und immunohistochemischen Auswertung. Das heißt, auch hier findet man in der Gruppe **Genta/syst** die signifikant niedrigste Anzahl von Osteoklasten. Die Gruppe ohne jegliche Therapie (**Titan**) zeigt die meisten Osteoklasten. Hier finden wir den aktivsten Knochenan- und abbau, direkt gefolgt von der Gruppe **Expl./syst**, die ja die schwersten Infektionszeichen in der immunohistochemischen Auswertung präsentierte. Die Gruppen **Genta** und **Titan/syst** zeigten wenig Unterschiede.

Zusätzlich fiel auf, dass in den drei Gruppen mit den höchsten Osteoklastenzahlen auch die Osteoklasten mit den meisten Kernen zu finden waren, was auf den erhöhten Aktivitätsgrad dieser Zellen hindeutet.

Insgesamt zeigen alle hier aufgeführten Auswertungen die Sinnhaftigkeit einer kombinierten, lokalen und systemischen, Antibiotikatherapie im Falle einer ausgedehnten implantatassoziierten Osteomyelitis.

5. Diskussion

Ein Hauptteil der orthopädischen und unfallchirurgischen Chirurgie besteht heutzutage immer öfter aus dem Ein- und Ausbau von Gelenkprothesen, Osteosynthesematerial oder Fixateursystemen.

So wurden 2008 in Deutschland laut Daten der BQS (Bundesgeschäftsstelle Qualitätssicherung GGmbH) insgesamt 302.939 Hüft- und Knie-Endoprothesen erstimplantiert[165].

Hüft-Endoprothesenwechsel wurden 2008 bei 22.631, Knie-Endoprothesenwechsel bei 10.387 Patienten durchgeführt[166].

Durch unsere demografische Entwicklung wird es in Zukunft immer mehr Patienten mit künstlichem Gelenkersatz geben, zudem wird die Anzahl von komplizierten Frakturen und Weichteiltraumen durch die ansteigende Zahl der Verkehrsunfälle zunehmen.

Eine Studie aus Amerika versucht die Entwicklung der Knie- und Hüft-Endoprothetik von 2005 bis 2030 in Abhängigkeit von der Bevölkerungsentwicklung und dem medizinischen Fortschritt vorherzusagen. So sollen die Zahlen der primären Implantation einer Knie-Endoprothese um 174% und einer Hüft-Endoprothese sogar um 673% ansteigen. Dementsprechend werden auch die Revisionseingriffe bis 2030 gravierend ansteigen, wobei hier die Zahlen der Knie-Prothesenrevision (Anstieg um 601%) die der Hüftprothesenrevision (Anstieg um 137%) nach 2007 überragen sollen[167].

Da ein mehrfach erwiesenes stark erhöhtes Risiko einer Infektion und Osteomyelitis besteht, wenn Fremdkörper wie Prothesen, Osteosynthesen und Implantate in den Knochen eingebracht werden, sollte man in den nächsten 20 Jahren auch mit einer stark ansteigenden Inzidenz von fremdkörperabhängigen Knocheninfektionen und Osteomyelitiden rechnen[168-170].

Daher ist es umso wichtiger, die klinisch-wissenschaftliche Forschung für die Etablierung neuer effektiver Therapieansätze zur Behandlung der implantatassoziierten Osteomyelitis zu unterstützen.

Zusätzlich sollte man bedenken, dass die Behandlungen chronifizierter Knocheninfektionen aufgrund ihrer sozioökonomischen Folgen mit einer langen Leidensgeschichte für den Patienten und mit erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden sind. Außerdem sind Infektionsraten und die Anzahl von notwendigen Revisionseingriffen von chirurgischen Abteilungen wichtige

Parameter, die viel über die Qualität der jeweiligen Klinik aussagen.

Bei den unterschiedlichen Risikofaktoren und Verletzungsmustern sowie den interindividuellen Unterschieden eines Patientenkollektivs ist es schwierig, ein reproduzierbares klinisch orientiertes Modell zur Osteomyelitisforschung zu etablieren. Eine Möglichkeit, die Ausgangsbedingungen standardisiert und somit reproduzierbar zu machen, stellen die tierexperimentellen Modelle dar.

Die ersten tierexperimentellen Untersuchungen gehen auf das 19. Jahrhundert zurück. So induzierte unter anderem 1878 der berühmte Schweizer Chirurg Emil Theodor Kocher (1841-1917) eine ausgedehnte Osteomyelitis bei Hunden, indem er bakterienhaltige Lösungen durch ein Bohrloch in der Kortikalis in den Knochen injizierte [171,172]. Die erste reproduzierbare Osteomyelitis in einem Tierexperiment konnte von Rodet 1884 durch die i.v. Injektion von *S.aureus* verursacht werden, was zu typischen Entzündungsherden in den Tibia- und Femurmetaphysen führte [173,174].

Grundsätzlich unterscheidet man 2 Modellformen, mit der die Osteomyelitis im Experiment validiert werden kann. Die erste Form dient der Evaluation der Osteomyelitisentstehung. Es sollen nicht alle Tiere infiziert werden, sondern man untersucht hier die Abhängigkeit der Infektionsrate vom auslösenden Agens (z.B. verwendete Inokulumdosis, Vorhandensein einer Fraktur, Vorhandensein eines Implantates usw.). Viele Arbeiten, so auch die direkt vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe beschäftigen sich mit dieser Thematik [135,136,144,158,175].

Eine zweite Modellform geht von einer 100% Infektionsrate der zu untersuchenden Tiere aus, um z.B. den Verlauf einer chronischen Osteomyelitis zu evaluieren oder um verschiedene Therapieansätze zur Behandlung der akuten oder chronischen Osteomyelitis in ihrer Wirksamkeit zu untersuchen, wie in unserer Arbeit.

Die Erforschung neuer wirksamer Prophylaxen und Therapieansätze für die Behandlung einer chronischen implantatassoziierten Osteomyelitis ist vor dem Hintergrund der steigenden Implantationszahlen, des enormen volkswirtschaftlichen Schadens und vor allem des massiven physischen und psychischen Schadens der betroffenen Patienten unvermeidlich.

Diese Argumente waren ausschlaggebend für die Gründung unserer Arbeitsgruppe im Labor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand, und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Münster.

Gestützt wurden unsere Arbeiten durch die Forschungen von Lucke et al. aus Berlin, die zum einen ein valides Infektionsmodell für die implantatassoziierte Osteomyelitis an

der Ratte etablierten[158] und zum anderen die signifikant erhöhte Wirksamkeit einer lokalen Antibiotikaprophylaxe auf einem Drug-Delivery-System (10%Gentamicin-PDLLA-Implantate) gegenüber einer systemischen Gentamicin-Prophylaxe bewiesen[144]. Das von Lucke et al. etablierte Infektionsmodell mit Implantation eines Titan-Kirschner-Drahtes und der Inokulation von *S.aureus* in die Rattentibia war die Vorlage für unsere Arbeiten in Münster.

Die erste tierexperimentelle Arbeit unserer Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit der Frage, welche Rolle das verwendete Titanimplantat bei der Entstehung der Osteomyelitis spielt und welchen prophylaktischen Nutzen die verschiedenen Beschichtungen eines Titanimplantates im Verlaufe der Osteomyelitis haben [136].

Durch Lucke et al. wussten wir, dass eine Konzentration von 10^2 CFU (Colony Forming Units) *S.aureus* im Inokulat sicher ausreichen, um in Kombination mit einem in die Tibia eingebrachten Titan-Implantat eine Osteomyelitis zu generieren[158].

Neben anderen Veröffentlichungen wurde in der Arbeit von Forkel et al. nochmal deutlich, dass die Anwesenheit eines Implantates ein wichtiger Promotor für die Entstehung einer Infektion ist. So konnte in Verbindung mit dem Titanimplantat und 10^3 CFU *S.aureus* eine Infektionsrate von 97% erzeugt werden. In der Gruppe, die nur das *S.aureus*-Inokulum erhielt, konnte keine Infektion induziert werden[136].

Ausschlaggebend für die begünstigende Wirkung eines Implantates auf die Infektionsentstehung ist vor allem die Entwicklung eines Biofilmes an der Implantat-Oberfläche zu sehen, zu dem auch der *S.aureus* und der *S. epidermidis* fähig sind[82-85]. Durch das verlangsamte Bakterien-Wachstum im Biofilm und seine Bestandteile schützen sich die Bakterien vor dem Angriff körpereigener Abwehrzellen und einer Antibiotikatherapie[176-178].

Zu einer erfolgreichen Infektionsprophylaxe gehört folglich die Reduktion der Adhäsion von Erregern an einer Implantatoberfläche und deren Ausbildung eines Biofilmes.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, gibt es schon länger das Verfahren, Antibiotika in Knochenzement, Schwämmen oder Kügelchen einzuarbeiten, um eine lokale Wirkung zu erzielen[125,137,138]. Allerdings stellte sich die Freisetzungskinetik von z.B. Gentamicin aus Knochenzement oder aus Kunstharzen wie PMMA als unzureichend heraus. Nach einer initial hohen Freisetzungskonzentration folgt über Wochen und Monaten eine Phase mit eher subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen, die die Biofilmbildung nicht effektiv verhindern und sogar zu lokalen Resistenzen der Erreger führen können[139,140]. Um die Resistenzentwicklung zu verhindern, müssen die

Antibiotikaketten und Spacer nach kurzer Zeit wieder operativ entfernt werden.

Die neuartige Poly-D,L-Laktid-Beschichtung für medizinische Implantate ist nicht nur eine hochwirksame Beschichtung zur Reduktion der Bakterienadhäsion und Biofilm-Entstehung sondern auch ein sehr suffizientes Drug-Delivery-System[80,81]. Durch die Arbeit von Gollwitzer et al. wurde deutlich, dass die PDLL-Beschichtung auf Implantaten in vitro zu einer hochsignifikanten Reduktion der Adhäsion wachstumsfähiger Keime führt, im Vergleich zu unbeschichteten Titanimplantaten. Es wurde sogar eine bakterizide Wirkung nachgewiesen[81]. Allerdings zeigte der Einsatz der PDLL-Beschichtung am Titanimplantat im Tiermodell unserer Arbeitsgruppe ohne Antibiotikum keine signifikante Reduktion der Infektion[135].

Die Beschichtung hat eine gute mechanische Widerstandskraft und zeigt als Drug-Delivery-System eine Freisetzungskinetik, die den antibiotischen Wirkstoff optimal wirken lässt. So erkennt man in der ersten Stunde nach Implantation einen initialen Peak des in der Beschichtung angereicherten Antibiotikums, wodurch einer lokalen bakteriellen Besiedlung effektiv entgegengewirkt wird. In den ersten 24h werden 60% des Antibiotikums freigesetzt, dann folgt ein Plateau bis nach 6 Wochen ca. 90% des Wirkstoffes parallel zum Abbau der Beschichtung durch Diffusion freigesetzt wurden [81]. Danach bleibt nur noch das stabilitätsbringende Implantat bestehen, das heißt ein zweiter operativer Eingriff zur Entfernung des Drug-Delivery-Systems wie bei Antibiotikaketten oder Spacer ist nicht notwendig.

Gentamicin ist ein Aminoglycosid-Antibiotikum mit einem breiten Wirkspektrum, das bei ruhenden und proliferierenden Bakterien eine Hemmung der Proteinbiosynthese verursacht, wodurch es bakterizid wirkt[147]. Angewendet wird es vor allem bei schweren Infektionen wie Sepsis, Endokarditis und Osteomyelitis durch gram-negative Stäbchen und Staphylokokken, häufig dann als Kombinationspartner mit Betalaktamantibiotika. Es ist für die lokale Anwendung als Zumischung in Knochenzement, Schwämmen oder als Beschichtung von Implantaten zugelassen und zeigt in dem Zusammenhang eine gesicherte Effektivität[125,138,154,179]. Zudem kann man bei der streng lokalen Anwendung die gefürchtete dosisabhängige Nephro- und Ototoxizität, die für die systemische Applikation von Gentamicin bekannt ist, vernachlässigen.

Die Effektivität der 10%Gentamicin-PDLLA-Beschichtung auf Titanimplantaten in der Verhinderung einer *S.aureus*-Infektion in der Rattentibia wurde schon mehrfach bewiesen. So zeigten Lucke et al. bei einer initial eingebrachten *S.aureus*-Konzentration von 10^3 CFU eine 30%ige Prophylaxe[144]. Bei einem 10fach geringeren *S.aureus*-Inokulates (10^2 CFU) war sogar eine Infektionsvermeidung von 85% möglich[135]. Auch die Arbeit von Forkel et al. konnte die gute prophylaktische Wirkung der 10% Gentamicin-PDLLA-Beschichtung des Titanimplantates beweisen, indem in 84% der Fälle eine Infektion mit initial 10^3 CFU *S.aureus* verhindert wurde[136].

Den aktuellen Goldstandard in der klinischen Therapie der implantatassoziierten Osteomyelitis beim Menschen bildet der zweizeitige Wechsel des Implantates mit passagerem Einbau eines Spacers aus Knochenzement-/Gentamicingemisch oder Fixateurs zur Stabilisierung und einer gleichzeitigen systemischen i.v. Antibiotikatherapie. Der Wiedereinbau eines Implantates/einer Osteosynthese geschieht dann zu einem späteren Zeitpunkt, an dem die Infektion nicht mehr nachweisbar ist[42,126].

Dieses Vorgehen beinhaltet also zwei operative Eingriffe mit erheblichem perioperativem Risiko, je nach Gesundheitszustand des Patienten. Darüberhinaus wird der Zeitraum der Behandlung gravierend verlängert, was letztendlich die Behandlungskosten in die Höhe treibt.

Auf Basis der oben genannten Erkenntnisse über die Induktion und die Prophylaxe der implantatassoziierten Osteomyelitis in der Rattentibia, konzentriert sich unsere Forschungsarbeit nun auf die Evaluation verschiedener einzeitiger Therapieansätze zur erfolgreichen Behandlung dieser Erkrankung.

In unserer Arbeit gehen wir davon aus, dass die gefürchtete implantatassoziierte Infektion nach elektiven Eingriffen in den meisten Fällen durch Eindringen des Erregers während des operativen Eingriffes verursacht wird. Als häufigster Erreger in diesem Zusammenhang wird der *S.aureus* genannt[180], nicht zuletzt deshalb, weil er in der Lage ist, einen schützenden Biofilm an der Oberfläche von eingebrachten Implantaten zu bilden und sich so vor dem Angriff der körpereigenen Abwehr oder einer antibiotischen Therapie zu schützen[181,182].

In unserem Versuch wird die Infektion deshalb mithilfe des Bakteriums *Staphylokokkus aureus* (ATCC 49230) Subspezies Rosenbach (Amerika, Manassas) verursacht, der

von einem Patienten mit chronischer Osteomyelitis isoliert wurde. Seine Fähigkeit, eine Knocheninfektion in der Ratte auszulösen wurde schon mehrfach belegt [135,136,158,179]. Das Bakterium ist u.a. sensibel gegenüber Gentamicin, Clindamycin, Ciprofloxacin und Erythromycin aber resistent gegenüber Penicillin-G und Ampicillin[183].

Im Rahmen des ersten operativen Eingriffes zur Induktion der Infektion und zur Einbringung des unbeschichteten Titanimplantates hielten wir uns streng an die operativen Standards, die schon von Lucke et al. und Forkel et al. etabliert wurden[136,158].

Um die Wirkung der Therapiestrategien analysieren zu können, war eine nachgewiesene Infektion eine Woche nach dem ersten operativen Eingriff mit Infektion und Einbringen des unbeschichteten Titanimplantates obligat. Die folgende implantatassoziierte Osteomyelitis wurde durch das Wachstum des eingebrachten *S.aureus* an der Abrollung des primär eingebrachten Implantates bestätigt und bewiesen.

In einem einzeitigen Implantatwechsel, der erst durch unsere Gruppe etabliert werden musste, wurde unter sterilen Kautelen nach Explantation des primären Implantates eine sorgfältige Lavage mit 20ml Lavasept®5% (Braun Melsungen AG) durchgeführt, um möglichst nah an der klinischen Vorgehensweise (z.B. Jet-Lavage) zu bleiben.

Um den ersten Eingriff eines möglichen zweizeitigen Wechsels zu simulieren, gab es zudem eine Gruppe, in der nur die Explantation in Kombination mit der systemischen Gentamicingabe durchgeführt wurde (Gruppe **Expl./syst**).

Die mikrobiologische Auswertung dieser Arbeit ist, wie in der Klinik der Erregernachweis in Form eines tiefen Abstriches oder besser einer intraoperativen Probeentnahme, das wichtigste diagnostische Mittel zum Beweis der Infektion. Darüber hinaus ist der Erregernachweis ausschlaggebend für die adäquate antiinfektive Behandlung in der Klinik.

Wie vorherige Arbeiten zeigten, machen auch unsere Ergebnisse deutlich, dass die Konzentration der eingebrachten Keimmenge ein ausschlaggebender Faktor für das Ausmaß einer Infektion ist[136,158]. Allerdings ist auch zu bedenken, dass es in diesem Zusammenspiel Ausnahmen gibt, bei denen offensichtlich noch andere Faktoren, wie evtl. das individuelle Immunsystem, das Alter, das Gewicht etc. eine Rolle spielen. Man muss hier, wie beim Menschen auch, von einem multifaktoriellen Geschehen ausgehen, was die Analyse der Therapieerfolge nicht einfacher macht.

Für weitere Arbeiten ist es wichtig, die Methode der Herstellung der initialen Keimsuspension zur Induktion der Infektion zu überdenken und zu verbessern, um den Störfaktor der unterschiedlich hohen Keiminokulate einzudämmen.

Ein wichtiger Teil der mikrobiologischen Auswertung stellt die **SCV-Diagnostik** dar.

Small Colony Variants (SCV) des *S.aureus* entstehen bevorzugt bei lokaler aber auch bei systemischer Anwendung von Gentamicin, da sich diese durch ein intrazelluläres Wachstum besonders gut der Gentamicinwirkung entziehen können und so einen Selektionsvorteil haben[97,104].

Die Entstehung von SCV in der Gegenwart von Gentamicin stellt ein nicht zu vernachlässigendes Risiko in der lokalen Therapie mit Antibiotika dar.

Mehrere Autoren wiesen schon in der Vergangenheit auf dieses Problem hin [97,162] und auch wir konnten dieses in unserer Arbeit bestätigen. Vor allem bei chronifizierten, persistierenden oder rekurrenten Verläufen der Osteomyelitis, die nur schwer behandelbar sind, muss man an das Vorhandensein von SCV denken.

Eine immunhistochemische Analyse spielt für die klinische Praxis zur Diagnostik der akuten Osteomyelitis eher eine untergeordnete Rolle, da sie viel zu aufwendig, zeit- und kostenintensiv ist. In unserer Arbeit bietet sie eine gute Möglichkeit zur Korrelation mit den anderen Auswertungsmethoden und zur Beurteilung der Intensität der Infektion. Der deskriptive Auswertungsscore wurde von uns entwickelt und das erste Mal angewendet und ist somit noch nicht so etabliert wie der von uns angewendete radiologische Score in der Auswertung. Die Randomisierung der Proben und die Auswertung durch drei unabhängige Beobachter bilden die Grundlage für aussagekräftige Ergebnisse.

Die Immunhistochemie bildet in Zukunft sicher die Basis für vielversprechende Therapieansätze im Bereich der Immunmodulation. So gibt es schon Studien, in denen durch spezifische Blockaden der bekannten Entzündungsmediatoren, wie in unserem Fall die untersuchten Interleukine oder das Chemokin MCP-1, z.B. durch Antikörper, eine infektionshemmende Wirkung nachgewiesen wurde[47,48,186].

In der Klinik gilt als Behandlungsgrundlage das Vorhandensein von Symptomen oder Beschwerden und ein mikrobieller Erregernachweis, um eine antimikrobielle Therapie einleiten zu können. Als Korrelat ist ebenfalls eine bildgebende Diagnostik anzustreben.

Hier gilt als Standard immer noch das konventionelle Röntgenbild, weil es schnell

verfügbar und kostengünstig ist. Allerdings ist hier eine diagnostische Lücke von 10-14 Tagen zu bedenken[42, 136, 158]. Auch in unserer radiologischen Auswertung zeigten sich erst ab Tag 7 nach dem Nailexchange also Tag 14 postinfektionem signifikante Infektionszeichen.

Die Auswertung der oberflächlichen Abstriche, die unter sterilen Bedingungen am Tag der Tötung kurz vor Explantation des Implantates an der Bohrlochstelle der Tibia gemacht wurden, zeigten bei allen Tieren jeweils ein geringeres Wachstum an, als man es bei den entsprechenden Abrollungen der Implantate sieht. Die Aussagekraft des Abstriches in Bezug auf die Intensität der Infektion ist somit eher vernachlässigbar und ein negativer Abstrich beweist wie in der Klinik nicht die Abwesenheit eines Erregers.

Die systemische Gabe von Refobacin® (Gentamicin) bekamen die Tieren aus den Gruppen **Expl./syst**, **Titan/syst** und **Genta/syst** insgesamt 5 Tage nach dem einzeitigen Implantatwechsel intraperitoneal (5mg/kg KG) appliziert.

Laut Studienlage ist es beim Menschen empfohlen, eine systemische Antibiotikatherapie für 4-6 Wochen durchzuführen[3,119]. Die kurze Dauer der systemischen Therapie in unserer Arbeit kann einer der Gründe für den nur mässigen Erfolg der systemischen Therapie sein.

Unser Tiermodell etablierte erfolgreich den Implantatwechsel als Folgeeingriff nach initialer Infektion und Implantateinbringung an der Ratte. Es bietet so die Möglichkeit, verschiedene Therapieansätze zur Behandlung der implantatassoziierten Osteomyelitis zu untersuchen. Weiterhin präsentiert es zahlreiche Methoden zur Diagnostik und Analyse der therapeutischen Effektivität aus den Bereichen der Mikrobiologie, Immunhistochemie, Histologie und Radiologie.

Durch unsere Analysemethoden konnte die Effektivität der kombinierten lokalen/systemischen Gentamicintherapie gezeigt werden.

Die lokale Antibiotikatherapie wird durch ihre immer wieder bewiesene Wirksamkeit und der niedrigen Nebenwirkungsrate in Zukunft eine unvermeidbare Säule in der Therapie der implantatassoziierten Osteomyelitis sein.

Die weitere Erforschung von Drug-Delivery-Systemen mit verwendbaren wirksamen antibiotischen Wirkstoffen sollte weiter intensiviert werden, um der steigenden Zahl von chronischen und komplizierten Verläufen der implantatassoziierten Osteomyelitis entgegen wirken zu können.

6. Zusammenfassung

Klinische Studien gestalten sich aufgrund der Menge der beeinflussenden Faktoren, eines meist sehr inhomogenen Patientenkollektivs und der Komplexität der Erkrankung sehr schwierig. Deshalb ist es umso wichtiger, valide und standardisierte Krankheitsmodelle zu entwickeln, mit denen man eine exakte Simulation des pathophysiologischen Verlaufes der Osteomyelitis erzeugen kann, um Therapieansätze evaluieren zu können.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Präsentation eines standardisierten, reproduzierbaren Osteomyelitis-Tiermodelles, das der experimentellen Evaluation von verschiedenen einzeitigen Therapiemöglichkeiten bei einer implantatassoziierten Osteomyelitis dienen soll.

Die weiterhin steigende Rate an implantatassoziierten Knocheninfektionen und Erregerresistenzen und die damit verbundenen einschneidenden Konsequenzen für die betroffenen Patienten machen eine intensivere und weitergehende Osteomyelitistherapie notwendig, mit deren Hilfe man wissenschaftliche Erkenntnisse mit klinischen Erfahrungen zur Verbesserung der Osteomyelitistherapie kombinieren kann.

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, den therapeutischen Einfluss des einzeitigen Implantatwechsels eine Woche post infectionem auf den Verlauf der implantatassoziierten Osteomyelitis zu untersuchen und in diesem Zusammenhang die Wertigkeit einer lokalen gegenüber einer systemischen Antibiotikatherapie zu vergleichen. Dazu wurde der Implantatwechsel, der Wechsel auf ein lokales Drug-Delivery-System mit Gentamicin und die reine Entfernung in ihrer Wertigkeit verglichen und mit einer systemischen Antibiotikagabe ergänzt.

Wir etablierten in diesem Tiermodell den einzeitigen Implantatwechsel und verwendeten für die Auswertung eine klinische, radiologische, mikrobiologische, histologische und immunhistochemische Diagnostik, um eine möglichst detaillierte Evaluation und klinische Vergleichbarkeit zu erreichen.

Unsere Auswertungen zeigten eine deutliche Überlegenheit der kombinierten lokalen und systemischen Antibiotikatherapie gegenüber der Explantation des Implantates und einer nicht-kombinierten Antibiotikatherapie.

Das hier vorgestellte Ratten-Infektmodell ist valide, gut reproduzierbar und bietet somit die Möglichkeit, andere wichtige Faktoren, wie Frakturen oder Gewebeischämie kontrolliert in ihrem Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu untersuchen oder weitere antimikrobielle oder immunmodulierende Medikamente in der lokalen und systemischen Anwendung zu evaluieren, um die Forschung in diesem Bereich auszuweiten und eine Eindämmung der implantatassoziierten Osteomyelitis zu erreichen.

7. Literaturverzeichnis

1. Kaim AH, Gross T, von Schulthess GK. Imaging of chronic posttraumatic osteomyelitis. *Eur Radiol* 2002;12:1193-1202
2. Waldvogel FA, Papageorgiou PS. Osteomyelitis: the past decade. *The New England journal of medicine* 1980;303:360-370
3. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *The New England journal of medicine* 1997;336:999-1007
4. Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN. Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. 3. Osteomyelitis associated with vascular insufficiency. *The New England journal of medicine* 1970;282:316-322
5. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004;364:369-379
6. Zimmerli W, Fluckiger U. [Classification and microbiology of osteomyelitis]. *Orthopade* 2004;33:267-272
7. Bishop W. The early history of surgery. In. Hale; London; 1960
8. Moodie RL. Osteomyelitis in the Permian. *Science* 1921;53:333
9. Peltier LF. *Orthopedics - A History and Iconography*: Norman Publishing; 1992:297
10. Nélaton A. *Elements de pathologie chirurgical*. Paris: Germer Bailliere; 1844
11. Böcker D, Heitz. *Pathologie*: Elsevier Urban&Fischer; 2004
12. Blyth MJ, Kincaid R, Craigen MA, Bennet GC. The changing epidemiology of acute and subacute haematogenous osteomyelitis in children. *J Bone Joint Surg Br* 2001;83:99-102
13. Lang S. [Osteomyelitis. A pathomorphologic overview]. *Radiologe* 1996;36:781-785
14. Tice AD, Hoaglund PA, Shoultz DA. Risk factors and treatment outcomes in osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1261-1268
15. Hansis M, Arens S, Wingenfeld C. [Rate of infection in trauma surgery. An overview based on recent German language literature]. *Unfallchirurg* 1997;100:457-464

16. Ostermann PA, Henry SL, Seligson D. Timing of wound closure in severe compound fractures. *Orthopedics* 1994;17:397-399
17. Chapman MW, Mahoney M. The role of early internal fixation in the management of open fractures. *Clin Orthop Relat Res* 1979:120-131
18. Fischer MD, Gustilo RB, Varecka TF. The timing of flap coverage, bone-grafting, and intramedullary nailing in patients who have a fracture of the tibial shaft with extensive soft-tissue injury. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:1316-1322
19. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma* 1984;24:742-746
20. Roth AI, Fry DE, Polk HC, Jr. Infectious morbidity in extremity fractures. *J Trauma* 1986;26:757-761
21. Gustilo RB, Anderson JT. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58:453-458
22. Tsukayama DT. Pathophysiology of posttraumatic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 1999:22-29
23. Mader JT, Cripps MW, Calhoun JH. Adult posttraumatic osteomyelitis of the tibia. *Clin Orthop Relat Res* 1999:14-21
24. Holtom PD, Smith AM. Introduction to adult posttraumatic osteomyelitis of the tibia. *Clin Orthop Relat Res* 1999:6-13
25. Crockarell JR, Hanssen AD, Osmon DR, Morrey BF. Treatment of infection with debridement and retention of the components following hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:1306-1313
26. Taylor GJ, Bannister GC, Calder S. Perioperative wound infection in elective orthopaedic surgery. *J Hosp Infect* 1990;16:241-247
27. Periti P, Mini E, Mosconi G. Antimicrobial prophylaxis in orthopaedic surgery: the role of teicoplanin. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:329-340
28. Bauer TW, Schils J. The pathology of total joint arthroplasty.II. Mechanisms of implant failure. *Skeletal Radiol* 1999;28:483-497
29. Brook I, Frazier EH. Aerobic and anaerobic microbiology of infection after trauma. *Am J Emerg Med* 1998;16:585-591

30. Meadows SE, Zuckerman JD, Koval KJ. Posttraumatic tibial osteomyelitis: diagnosis, classification, and treatment. *Bull Hosp Jt Dis* 1993;52:11-16
31. Bongartz T, Halligan CS, Osmon DR, et al. Incidence and risk factors of prosthetic joint infection after total hip or knee replacement in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;59:1713-1720
32. Ching DW, Gould IM, Rennie JA, Gibson PH. Prevention of late haematogenous infection in major prosthetic joints. *J Antimicrob Chemother* 1989;23:676-680
33. Arens S, Kutscha-Lissberg F, Hebler U, et al. [Pyogenic infection after joint replacement operations: incidence and economic effects]. *Kongressbd Dtsch Ges Chir Kongr* 2002;119:738-742
34. Heitemeyer U, Hax PM. [Economic aspects of bone infection]. *Aktuelle Probl Chir Orthop* 1990;34:162-164
35. Ciampolini J, Harding KG. Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? *Postgrad Med J* 2000;76:479-483
36. Andriole VT, Nagel DA, Southwick WO. A paradigm for human chronic osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am* 1973;55:1511-1515
37. Wilson MG, Kelley K, Thornhill TS. Infection as a complication of total knee-replacement arthroplasty. Risk factors and treatment in sixty-seven cases. *J Bone Joint Surg Am* 1990;72:878-883
38. Fluckiger U, Zimmerli W. [Diagnosis and follow-up management of postoperative bacterial osteitis]. *Orthopade* 2004;33:416-423
39. Cierny G, 3rd, Mader JT, Penninck JJ. A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 2003:7-24
40. Lipsky BA. Osteomyelitis of the foot in diabetic patients. *Clin Infect Dis* 1997;25:1318-1326
41. Matzen PDMhP. *Kinderorthopädie*. 1990/07/01 ed. München: Elsevier GmbH, München; 2007:679
42. Schwameis E, Abdolvahab F, Wurnig C. [Osteomyelitis. Clinical aspects, diagnosis and therapy]. *Radiologe* 1996;36:823-833
43. Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, et al. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *The Journal of infectious diseases* 1988;158:693-701

44. Chuard C, Vaudaux P, Waldvogel FA, Lew DP. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* growing on fibronectin-coated surfaces to bactericidal antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1993;37:625-632
45. Ning R, Zhang X, Guo X, Li Q. *Staphylococcus aureus* regulates secretion of interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 through activation of nuclear factor kappaB signaling pathway in human osteoblasts. *Braz J Infect Dis*;15:189-194
46. Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 1990;136:1229-1233
47. Melgarejo E, Medina MA, Sanchez-Jimenez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:998-1001
48. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta*;411:1570-1579
49. Tsukayama DT, Gustilo RB. Antibiotic management of open fractures. *Instr Course Lect* 1990;39:487-490
50. Ziran BH. Osteomyelitis. *J Trauma* 2007;62:S59-60
51. Andriole VT, Nagel DA, Southwick WO. Chronic staphylococcal osteomyelitis: an experimental model. *Yale J Biol Med* 1974;47:33-39
52. Nair SP, Meghji S, Wilson M, et al. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infection and immunity* 1996;64:2371-2380
53. Martin TJ, Ng KW. Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. *J Cell Biochem* 1994;56:357-366
54. Gillespie WJ, Allardyce RA. Mechanisms of bone degradation in infection: a review of current hypotheses. *Orthopedics* 1990;13:407-410
55. Mundy CR, Altman AJ, Gondek MD, Bandelin JG. Direct resorption of bone by human monocytes. *Science* 1977;196:1109-1111
56. Yoshii T, Magara S, Miyai D, et al. Local levels of interleukin-1beta, -4, -6 and tumor necrosis factor alpha in an experimental model of murine osteomyelitis due to *staphylococcus aureus*. *Cytokine* 2002;19:59-65
57. Klosterhalfen B, Peters KM, Tons C, et al. Local and systemic inflammatory mediator release in patients with acute and chronic posttraumatic osteomyelitis. *J Trauma* 1996;40:372-378

58. Taki N, Tatro JM, Lowe R, Goldberg VM, Greenfield EM. Comparison of the roles of IL-1, IL-6, and TNFalpha in cell culture and murine models of aseptic loosening. *Bone* 2007;40:1276-1283
59. Mundy GR. Immune system and bone remodeling. *Trends Endocrinol Metab* 1990;1:307-311
60. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 1993;8 Suppl 2:S505-510
61. de la Mata J, Uy HL, Guise TA, et al. Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *J Clin Invest* 1995;95:2846-2852
62. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990;145:3297-3303
63. Fuller K, Gallagher AC, Chambers TJ. Osteoclast resorption-stimulating activity is associated with the osteoblast cell surface and/or the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:67-73
64. Mundy GR. Local control of bone formation by osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res* 1995:19-26
65. Chambers TJ. The cellular basis of bone resorption. *Clin Orthop Relat Res* 1980:283-293
66. Gothlin G, Ericsson JL. The osteoclast: review of ultrastructure, origin, and structure-function relationship. *Clin Orthop Relat Res* 1976:201-231
67. Laughlin RT, Sinha A, Calhoun JH, Mader JT. Osteomyelitis. *Curr Opin Rheumatol* 1994;6:401-407
68. Lazzarini L, Mader JT, Calhoun JH. Osteomyelitis in long bones. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A:2305-2318
69. Arens S, Schlegel U, Printzen G, et al. Influence of materials for fixation implants on local infection. An experimental study of steel versus titanium DCP in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 1996;78:647-651
70. Elek SD, Conen PE. The virulence of *Staphylococcus pyogenes* for man; a study of the problems of wound infection. *Br J Exp Pathol* 1957;38:573-586
71. Bengtson S, Knutson K, Lidgren L. Treatment of infected knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1989:173-178

72. Melcher GA, Claudi B, Schlegel U, et al. Influence of type of medullary nail on the development of local infection. An experimental study of solid and slotted nails in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 1994;76:955-959
73. Luthi U, Rahn BA, Perren SM. [Area of contact between osteosynthesis plate and bone in internal fixation (author's transl)]. *Aktuelle Traumatol* 1980;10:131-136
74. Petty W, Spanier S, Shuster JJ, Silverthorne C. The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 1985;67:1236-1244
75. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987;237:1588-1595
76. Gerber H, Burge M, Cordey J, Ziegler W, Perren SM. [Quantitative determination of tissue tolerance to corrosion products in organ culture]. *Langenbecks Arch Chir* 1975;Suppl:389-394
77. Francois P, Vaudaux P, Lew PD. Role of plasma and extracellular matrix proteins in the physiopathology of foreign body infections. *Ann Vasc Surg* 1998;12:34-40
78. McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, et al. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem* 1997;247:416-424
79. Gristina AG, Naylor P, Myrvik Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med Prog Technol* 1988;14:205-224
80. Gollwitzer H, Ibrahim K, Meyer H, et al. Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:585-591
81. Gollwitzer H. Eine resorbierbare Poly-D,L-Laktid-Beschichtung zur Ausrüstung medizinischer Implantate: mit antithrombogenen Oberflächen in der Neonatologie und antiinfektiven Oberflächen in der Orthopädie. Promotionsarbeit an der Technischen Universität München 2002
82. Gristina AG. Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. *Clin Orthop Relat Res* 1994:106-118
83. Peters G, Locci R, Pulverer G. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 1982;146:479-482
84. Gristina AG, Oga M, Webb LX, Hobgood CD. Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. *Science* 1985;228:990-993

85. Eron LJ. Prevention of infection following orthopedic surgery. *Antibiot Chemother* 1985;33:140-164
86. Gristina AG, Hobgood CD, Webb LX, Myrvik QN. Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. *Biomaterials* 1987;8:423-426
87. Jansen B, Peters G. Foreign body associated infection. *J Antimicrob Chemother* 1993;32 Suppl A:69-75
88. Haas DW, McAndrew MP. Bacterial osteomyelitis in adults: evolving considerations in diagnosis and treatment. *Am J Med* 1996;101:550-561
89. Carek PJ, Dickerson LM, Sack JL. Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician* 2001;63:2413-2420
90. Ostermann PA, Henry SL, Seligson D. The role of local antibiotic therapy in the management of compound fractures. *Clin Orthop* 1993:102-111
91. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *The New England journal of medicine* 2004;350:1422-1429
92. Plaue R, Hinz P. [Osteomyelitis: germ-spectrum and resistance situation]. *Arch Orthop Unfallchir* 1970;69:83-92
93. Eckardt JJ, Wirganowicz PZ, Mar T. An aggressive surgical approach to the management of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 1994:229-239
94. Schierholz JM, Beuth J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect* 2001;49:87-93
95. König DP, Schierholz JM, Munnich U, Rutt J. Treatment of staphylococcal implant infection with rifampicin-ciprofloxacin in stable implants. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121:297-299
96. Littlewood-Evans AJ, Hattenberger MR, Luscher C, et al. Local expression of tumor necrosis factor alpha in an experimental model of acute osteomyelitis in rats. *Infection and immunity* 1997;65:3438-3443
97. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 1995;20:95-102
98. Kolle W. H, H. Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten mit besonderer Berücksichtigung der Immunitätslehre. Ein Lehrbuch für Studierende, Ärzte und Medizinalbeamte. Berlin: Urban&Schwarzenberg; 1906

99. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:295-305
100. von Eiff C, McNamara P, Becker K, et al. Phenotype microarray profiling of *Staphylococcus aureus* menD and hemB mutants with the small-colony-variant phenotype. *J Bacteriol* 2006;188:687-693
101. Balwit JM, van Langevelde P, Vann JM, Proctor RA. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *The Journal of infectious diseases* 1994;170:1033-1037
102. Proctor RA, Balwit JM, Vesga O. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis* 1994;3:302-312
103. Lewis LA, Li K, Bharosay M, et al. Characterization of gentamicin-resistant respiratory-deficient (res-) variant strains of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 1990;34:587-605
104. von Eiff C, Bettin D, Proctor RA, et al. Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clin Infect Dis* 1997;25:1250-1251
105. Widmer AF. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin Infect Dis* 2001;33 Suppl 2:S94-106
106. Roesgen M, Hierholzer G, Hax PM. Post-traumatic osteomyelitis. Pathophysiology and management. *Arch Orthop Trauma Surg* 1989;108:1-9
107. Perry CR, Pearson RL, Miller GA. Accuracy of cultures of material from swabbing of the superficial aspect of the wound and needle biopsy in the preoperative assessment of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:745-749
108. Barrack RL, Jennings RW, Wolfe MW, Bertot AJ. The Coventry Award. The value of preoperative aspiration before total knee revision. *Clin Orthop Relat Res* 1997:8-16
109. Ley BE, Linton CJ, Bennett DM, et al. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:247-253
110. Bonakdar-pour A, Gaines VD. The radiology of osteomyelitis. *Orthop Clin North Am* 1983;14:21-37

111. Tumeh SS, Aliabadi P, Weissman BN, McNeil BJ. Disease activity in osteomyelitis: role of radiography. *Radiology* 1987;165:781-784
112. Gold RH, Hawkins RA, Katz RD. Bacterial osteomyelitis: findings on plain radiography, CT, MR, and scintigraphy. *AJR Am J Roentgenol* 1991;157:365-370
113. Ledermann HP, Kaim A, Bongartz G, Steinbrich W. Pitfalls and limitations of magnetic resonance imaging in chronic posttraumatic osteomyelitis. *Eur Radiol* 2000;10:1815-1823
114. Kaim A, Ledermann HP, Bongartz G, et al. Chronic post-traumatic osteomyelitis of the lower extremity: comparison of magnetic resonance imaging and combined bone scintigraphy/immunoscintigraphy with radiolabelled monoclonal antigranulocyte antibodies. *Skeletal Radiol* 2000;29:378-386
115. Guhlmann A, Brecht-Krauss D, Suger G, et al. Chronic osteomyelitis: detection with FDG PET and correlation with histopathologic findings. *Radiology* 1998;206:749-754
116. Guhlmann A, Brecht-Krauss D, Suger G, et al. Fluorine-18-FDG PET and technetium-99m antigranulocyte antibody scintigraphy in chronic osteomyelitis. *J Nucl Med* 1998;39:2145-2152
117. Chain E, Florey HW, Adelaide MB, et al. Penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940. *Clin Orthop Relat Res* 1993:3-7
118. Orr HW. The treatment of acute osteomyelitis by drainage and rest. 1927. *Clin Orthop Relat Res* 2006;451:4-9
119. Mader JT, Shirliff ME, Bergquist SC, Calhoun J. Antimicrobial treatment of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 1999:47-65
120. Domanig E. [Problems in the treatment of hematogenous osteomyelitis.]. *Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir* 1952;271:189-198
121. Periti P, Stringa G, Mini E. Comparative multicenter trial of teicoplanin versus cefazolin for antimicrobial prophylaxis in prosthetic joint implant surgery. Italian Study Group for Antimicrobial Prophylaxis in Orthopedic Surgery. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:113-119
122. Bengtson S, Borgquist L, Lidgren L. Cost analysis of prophylaxis with antibiotics to prevent infected knee arthroplasty. *BMJ* 1989;299:719-720
123. Beck A, Kinzl L, Bischoff M. [Antibiotic prophylaxis and therapy in trauma surgery]. *Unfallchirurg* 1999;102:955-966

124. Joppich I. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie-Osteomyelitis 1999
125. Blaha JD, Calhoun JH, Nelson CL, et al. Comparison of the clinical efficacy and tolerance of gentamicin PMMA beads on surgical wire versus combined and systemic therapy for osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 1993;8-12
126. Worlock P, Slack R, Harvey L, Mawhinney R. The prevention of infection in open fractures: an experimental study of the effect of fracture stability. *Injury* 1994;25:31-38
127. Wall R, Klenerman L, McCullough C, Fyfe I. A comparison of teicoplanin and cefuroxime as prophylaxis for orthopaedic implant surgery: a preliminary report. *J Antimicrob Chemother* 1988;21 Suppl A:141-146
128. Wood MJ. The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:209-222
129. Evans RP, Nelson CL. Gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate beads compared with systemic antibiotic therapy in the treatment of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 1993:37-42
130. Vecsei V, Barquet A. Treatment of chronic osteomyelitis by necrectomy and gentamicin-PMMA beads. *Clin Orthop Relat Res* 1981:201-207
131. Taylor GI, Miller GD, Ham FJ. The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg* 1975;55:533-544
132. Zalavras CG, Femino D, Triche R, Zions L, Stevanovic M. Reconstruction of large skeletal defects due to osteomyelitis with the vascularized fibular graft in children. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:2233-2240
133. Dombrowski ET, Dunn AW. Treatment of osteomyelitis by debridement and closed wound irrigation-suction. *Clin Orthop Relat Res* 1965;43:215-231
134. Ibrahim K. Die Entwicklung eines "drug-delivery-system" auf Basis einer Poly-D,L-Laktatbeschichtung für den Einsatz an Biomaterialien in der Medizin. In. TU München; 2005
135. Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, et al. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone* 2005;36:770-778
136. Forkel P. Evaluation des Verlaufs und der Genese einer implantatassoziierten Infektion im Ratteninfektionsmodell. Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Uniklinik Münster 2009

137. Buchholz HW, Elson RA, Engelbrecht E, et al. Management of deep infection of total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1981;63-B:342-353
138. Hendriks JG, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. *Biomaterials* 2004;25:545-556
139. van de Belt H, Neut D, Uges DR, et al. Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release. *Biomaterials* 2000;21:1981-1987
140. van de Belt H, Neut D, Schenk W, et al. Gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Acta Orthop Scand* 2000;71:625-629
141. Schakenraad JM, Dijkstra PJ. Biocompatibility of poly (DL-lactic acid/glycine) copolymers. *Clin Mater* 1991;7:253-269
142. Heidemann W, Jeschkeit S, Ruffieux K, et al. Degradation of poly(D,L)lactide implants with or without addition of calciumphosphates in vivo. *Biomaterials* 2001;22:2371-2381
143. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, et al. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1) from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 2001;28:341-350
144. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, et al. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone* 2003;32:521-531
145. Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res* 2001;58:449-455
146. Kulkarni RK, Pani KC, Neuman C, Leonard F. Polylactic acid for surgical implants. *Arch Surg* 1966;93:839-843
147. Karow/Lang. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Köln: Thomas Karow; 2006
148. Nelson CL, Hickmon SG, Skinner RA. Treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of bioerodable, polyanhydride-gentamicin beads. *J Orthop Res* 1997;15:249-255
149. Bauer TW, Schils J. The pathology of total joint arthroplasty. I. Mechanisms of implant fixation. *Skeletal Radiol* 1999;28:423-432

150. Zhang X, Wyss UP, Pichora D, Goosen MF. Biodegradable controlled antibiotic release devices for osteomyelitis: optimization of release properties. *J Pharm Pharmacol* 1994;46:718-724
151. Calhoun JH, Henry SL, Anger DM, Cobos JA, Mader JT. The treatment of infected nonunions with gentamicin-polymethylmethacrylate antibiotic beads. *Clin Orthop Relat Res* 1993:23-27
152. Blaha JD, Calhoun JH, Nelson CL, et al. Comparison of the clinical efficacy and tolerance of gentamicin PMMA beads on surgical wire versus combined and systemic therapy for osteomyelitis. *Clin Orthop* 1993:8-12
153. Nelson CL, Evans RP, Blaha JD, et al. A comparison of gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate bead implantation to conventional parenteral antibiotic therapy in infected total hip and knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1993:96-101
154. Hettfleisch J, Schottle H. [Local preventive antibiotic treatment in intramedullary nailing with gentamycin impregnated biomaterials]. *Aktuelle Traumatol* 1993;23:68-71
155. Diefenbeck M, Muckley T, Hofmann GO. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. *Injury* 2006;37 Suppl 2:S95-104
156. Norden CW, Fierer J, Bryant RE. Chronic staphylococcal osteomyelitis: treatment with regimens containing rifampin. *Rev Infect Dis* 1983;5 Suppl 3:S495-501
157. Spangehl MJ, Masri BA, O'Connell JX, Duncan CP. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81:672-683
158. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, et al. A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003;67:593-602
159. Resistogramm. *Staphylokokkus aureus* (ATCC 49230). In. Uniklinik Münster: Institut der Medizinischen Mikrobiologie; 2006
160. Pradella SD, Slone SP, Wu YY, et al. Applications and performance of monoclonal antibodies to human tartrate resistant acid phosphatase. *J Immunol Methods*;372:162-170
161. Wolfrum PDU. *Vergleichende Anatomie und Physiologie von Versuchstieren. Versuchstierkurs, Johannes-Gutenberg Universität* 2008

162. von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury* 2006;37 Suppl 2:S26-33
163. Baumert N, von Eiff C, Schaaff F, et al. Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* small colony variants. *Microb Drug Resist* 2002;8:253-260
164. An YH, Friedman RJ. Animal models of orthopedic implant infection. *J Invest Surg* 1998;11:139-146
165. Oliver Boy SH. Basisstatistik über die Erstimplantation von Hüft- und Knieendoprothesen in Deutschland. In. Düsseldorf: Bundesgeschäftsstelle für Qualitätssicherung (BQS); 2008
166. Oliver Boy SH. Basisstatistik über den Wechsel von Hüft- und Knieendoprothesen und -komponenten in Deutschland. In. Düsseldorf: Bundesgeschäftsstelle für Qualitätssicherung (BQS); 2008
167. Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:780-785
168. Arens S. The risk of posttraumatic osteitis following osteosynthesis. *Trauma Berufskrankheiten* 2001;3:487-490
169. Mader JT, Shirliff M, Calhoun JH. The host and the skeletal infection: classification and pathogenesis of acute bacterial bone and joint sepsis. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 1999;13:1-20
170. Kalicke T, Kutscha-Lissberg F, Frangen TM, Muhr G, Arens S. [Pathophysiology of posttraumatic osteitis]. *Orthopade* 2004;33:405-410
171. Engelke GF. Die Induktion einer chronisch, posttraumatischen Osteomyelitis im Tiermodell. Universitätsklinikum Münster, Klinik und Poliklinik für Unfall- und Handchirurgie 2003
172. Altgelt C. Beitrag zur Lehre von der Osteomyelitis. Promotionsschrift, Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin 1886
173. Kalicke T, Schlegel U, Kraft C, et al. [Animal models of osteomyelitis]. *Orthopade* 2004;33:260-266
174. Rodet A. THE CLASSIC: an experimental study on infectious osteomyelitis. 1884. *Clin Orthop Relat Res* 2005;439:11-12
175. Lucke M. Local protection for surgical implants. *Chemistry & biology* 2005;12:958-959; discussion 1041-1048

176. Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res* 1991;37:91-105
177. Hoyle BD, Jass J, Costerton JW. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J Antimicrob Chemother* 1990;26:1-5
178. Cramton SE, Gerke C, Gotz F. In vitro methods to study staphylococcal biofilm formation. *Methods Enzymol* 2001;336:239-255
179. Solberg BD, Gutow AP, Baumgaertner MR. Efficacy of gentamycin-impregnated resorbable hydroxyapatite cement in treating osteomyelitis in a rat model. *J Orthop Trauma* 1999;13:102-106
180. Geipel U. Pathogenic organisms in hip joint infections. *Int J Med Sci* 2009;6:234-240
181. Patzakis MJ, Zalavras CG. Chronic posttraumatic osteomyelitis and infected nonunion of the tibia: current management concepts. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13:417-427
182. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002;292:107-113
183. Resistogramm. *Staphylokokkus aureus* (ATCC 49230). Institut der Medizinischen Mikrobiologie, Uniklinik Münster 2006
184. Manolagas SC. Role of cytokines in bone resorption. *Bone* 1995;17:63S-67S
185. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *The New England journal of medicine* 1995;332:305-311
186. Daly C, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation* 2003;10:247-257

8. Illustrationsverzeichnis: Seite

<p>Abbildung 1: Pathogenetische Charakteristika der chronischen Osteomyelitis, abgeändertes Schema nach Jauregui L.E. ed. Diagnosis and management of bone infections. New York: Marcel Dekker, 1995:37-108, zit.n.[5]</p>7
<p>Abbildung 2: Eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilmes, gebildet durch Staphylokokkus aureus-Kolonien, (©2001-2006 by Alfred B. Cunningham, Center for Biofilm Engineering&Rockford J.Ross, Departement of Computer Science, Montana State University, Montana)</p>9
<p>Abbildung 3: Schematischer Algorithmus der Bildgebung zur Diagnostik der Osteomyelitis, modifiziert nach [1].</p>16
<p>Abbildung 4: PDLLA-Beschichtung eines Titanimplantates (li. Bildhälfte), Elektronenmikroskopische Aufnahme, angefertigt im Labor der Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Uniklinik Münster</p>21
<p>Tabelle 1: Verwendete Materialien im gesamten Versuchsablauf</p>25-26
<p>Tabelle 2: Gruppenbeschreibungen und –Benennungen</p>28
<p>Abbildung 5: Vorgehen der Verdünnungsreihe zur Herstellung des Keiminokulates mit der Zielkonzentration 10^3CFU/20µl.</p>30
<p>Abbildung 6: Ablauf des Operativen Eingriffes: a) zeigt die Hautinzision und den Bohrdrabt, mit dem der Markkanal eröffnet wurde, b) das Eingeben des Inokulates mit der Hamilton-Spritze und c) das Vernähen der Inzision nach Absetzen des Implantates.</p>31
<p>Abbildung 7: Präparationsvorgang der Rattentibia nach der Sakrifikation, a) Exartikulation Kniegelenk, b) Exartikulation Sprunggelenk, c) Freipräparation der Tibia</p>33
<p>Abbildung 8: Implantatabrollungen mit a) Bakterienrasen und b) Ggr. Wachstum</p>35
<p>Abbildung 9: Abstrich-Ausstrich der Insertionsstelle mit mgr. Wachstum</p>35

<p>Abbildung 10: Inkubierte Glucoseboullions a) klar und b) getrübt mit eingebrachtem Implantat nach 24h Inkubation</p> 35
<p>Tabelle 3: Vorgehen bei der Paraffin-Gewebeeinbettung</p> 37
<p>Abbildung 11: Material für die Immunhistochemische Auswertung, links Paraffinblock mit Tibia und rechts das verwendete Mikrotom (Leica®) RM 2145</p> 38
<p>Abbildung 12: Avidin-Biotin-Complex Methode, schematisch zeichnerisch dargestellt, eigene Anfertigung</p> 38
<p>Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Seren bei der Immunhistochem. Färbung</p> 39
<p>Abbildung 13: Die vier Regions of Interest (ROI) bei der deskriptiven Immunhistochemischen Auswertung</p> 41
<p>Tabelle 5: Scorewerte für die Bestimmung der Intensitäten der Anfärbung in der jeweiligen ROI</p> 41
<p>Abbildung 14: Fotos von Tartrate-Resistant-Acid-Phosphatase (TRAP)-positiven polynuklearen Osteoklasten in unseren Proben. Die Mikroskopfotos zeigen links a) eine Osteolysezone in der Kortikalis (20x) und rechts b) einen mehrkernigen Osteoklasten an der Kortikalis (40x)</p> 43
<p>Tabelle 6: Mittelwerte der durchschnittlichen Körpertemperatur in °C ± Standardabweichung</p> 44
<p>Grafik 1: Mittelwerte der Körpertemperaturen [°C] im Verlauf als Liniendiagramm</p> 44
<p>Tabelle 7: durchschnittliches Körpergewicht als Mittelwerte [g] ± Standardabweichung</p> 45
<p>Grafik 2: prozentuale Abweichung des Körpergewichtes im Vergleich zum Ausgangsgewicht [%] als Liniendiagramm</p> 46

Tabelle 8: Mittelwerte der Hämoglobinkonzentration [g/dl] im Verlauf \pm Standardabweichung46
Grafik 3: Mittelwerte der Hämoglobinkonzentration [g/dl] im Verlauf als Liniendiagramm47
Tabelle 9: Mittelwerte der Hämatokritkonzentration [%] \pm Standardabweichung47
Grafik 4: Mittelwerte der Hämatokritkonzentration [%] im Verlauf als Liniendiagramm48
Tabelle 10: Mittelwerte der Leukozytenanzahl im Blut [Tausend/ μ l] \pm Standardabweichung49
Grafik 5: Mittelwerte der Leukozytenzahlen im Blut [Tausend/ μ l] im Verlauf als Liniendiagramm49
Tabelle 11: Mittelwerte der injizierte Keimmengen bei den Tieren der Immunhistochemische Auswertung \pm Standardabweichung50
Tabelle 12: Mittelwerte der injizierten Keimmengen bei den Tieren der Mikrobiologische Auswertung \pm Standardabweichung50
Grafik 6: Vergleich der Mittelwerte von Inokulat [CFU] und Keimzahl im Knochenmehl (KM) [CFU/g] in der Gruppe Titan anhand eines Balkendiagrammes mit Datentabelle51
Grafik 7: Vergleich der Mittelwerte von Inokulat [CFU] und Keimzahl im KM [CFU/g] in der Gruppe Genta anhand eines Balkendiagrammes mit Datentabelle51
Grafik 8: Vergleich der Mittelwerte von Inokulat [CFU] und Keimzahl im KM [CFU/g] in der Gruppe Expl./syst anhand eines Balkendiagrammes mit Datentabelle52

<p>Grafik 9: Vergleich der Mittelwerte von Inokulat [CFU] und Keimzahl im KM [CFU/g] in der Gruppe Titan/syst anhand eines Balkendiagrammes mit Datentabelle</p>52
<p>Grafik 10: Vergleich der Mittelwerte von Inokulat [CFU] und Keimzahl im KM [CFU/g] in der Gruppe Genta/syst anhand eines Balkendiagrammes mit Datentabelle</p>53
<p>Grafik 11: Durchschnittliche Mittelwerte der CFU-Anzahl/g KM und Infektionsrate pro Gruppe in Form eines kombinierten Balken- Liniendiagrammes; a)p=0,012, b)p=0,005, c)p=0,011</p>54
<p>Grafik 12: Intensitäten der bewachsenen Abrollungen des Implantat I bei allen Tieren der Immunhistochemischen und mikrobiologischen Auswertung (n=80) in Form eines 3D-Säulendiagrammes</p>55
<p>Grafik 13: Intensitäten der bewachsenen Abrollungen des Implantat II bei allen Tieren der Immunhistochemischen und mikrobiologischen Auswertung (n=64), (Ausschluss Gruppe Expl./syst) in Form eines 3D-Säulendiagrammes</p>56
<p>Grafik 14: repräsentative Fotos der Implantatabröckelung aus den verschiedenen Gruppen: a) sterile Blutagarplatte, klare Boullion, Gruppe Genta/syst; b) links: ggr. Wachstum, Mitte: mgr. Wachstum, leicht getrübbte Boullion, Gruppe Genta; c) hgr. Wachstum mit getrübbter Boullion, Gruppe Titan/syst; d) Bakterienrasen mit getrübbter Boullion; Gruppe Titan;</p>57
<p>Tabelle 13: Zusammenfassung der Mikrobiologische Ergebnisse aller Gruppen</p>58
<p>Tabelle 14: Mikrobiologische Infektparameter der Tiere mit generalisierter Infektion</p>59
<p>Tabelle 15: Ergebnisse in der Vitek®-Analyse der auffälligen Proben in der oben beschriebenen SCV-Analytik</p>60

<p>Tabelle 16: Ergebnisse in der Vitek®-Analyse der zwei Tiere mit den höchsten Keimzahlen in jeder Gruppe (*1= AlaA-, sSOR+, URE+, NAG -)</p> 61
<p>Tabelle 17: Die errechneten Pixelflächen [%] als Anteil der Gesamtfläche des Tibiaschnittes</p> 62
<p>Grafik 15: Die errechneten MW der Pixelflächen [%] der IL-1-Färbung als Anteil der Gesamtfläche des Tibiaschnittes in Form eines Säulendiagrammes mit Standardabweichungen, Signifikanzen: a)p=0,002, b) p=0,027, c) p=0,027, d) p=0,001, e) p=0,012</p> 62
<p>Grafik 16: Die errechneten MW der Pixelflächen [%] der IL-6-Färbung als Anteil der Gesamtfläche des Tibiaschnittes in Form eines Säulendiagrammes mit Standardabweichungen, Signifikanzen: a) p=0,003, b) p=0,021, c) p=0,046 d) p=0,001 e) p=0,009</p> 63
<p>Grafik 17: Die errechneten MW der Pixelflächen [%] der MCP-1-Färbung als Anteil der Gesamtfläche des Tibiaschnittes in Form eines Säulendiagrammes mit Standardabweichungen, Signifikanzen: a)p=0,021, b) p=0,016, c) p=0,046</p> 64
<p>Tabelle 18: Die Mediane der Scorepunkte aller Gruppen in den jeweiligen Antikörperfärbungen, a=signifikant höherer Score als alle anderen Gruppen, b= signifikant niedrigerer Score als alle anderen Gruppen, c= signifikant höherer Score als Genta und Genta/syst</p> 65
<p>Grafik 18: Deskriptive Scoreverteilung über die Intensität der immunhistochemischen Färbungen in den verschiedenen Gruppen in Form eines Boxplots</p> 66
<p>Grafik 19: Auszählung der Osteoklasten in bis zu 40facher Vergrößerung an der Kortikalis des Bohrkanales entlang, Darstellung in Form eines Säulendiagrammes Signifikanzen: a)p=0,001, b)p=0,003, c)p=0,001, d)p=0,001</p> 67
<p>Grafik 20: Auszählung der Zellkerne in 40facher Vergrößerung in den gefundenen Osteoklasten in Form eines Balkendiagrammes</p> 68

9. Abkürzungen:

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
BQS	Bundesgeschäftsstelle für Qualitätssicherung gGmbH)
CFU	Colony-Forming-Unit
F	Fluor
FDG	Fluor Desoxy Glukose
i.p.	Intraperitoneal
In	Indium
MCP-1	Monocyte chemoattractant Protein-1
MRSA	Methycillin-Resistenter Staphylokokkus aureus
MRSE	Methycillin-Resistenter Staphylokokkus epidermidis
NE	Nailexchange (Implantatwechsel)
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDLLA	Poly-D,L-Laktid-Acid
ROI	Region of interest
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SCV	Small-Colony-Variants
Ssp.	Subspecies
Tc	Technetium
TRAP	Tartrate-Resistant-Acid-Phosphatase
TSB	Tryptikase-Soja-Boullion

10. Danksagung

Großer Dank gebührt zuallererst Herrn Prof. Dr. med. Michael J. Raschke, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Münster, für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die Erlaubnis, die Räumlichkeiten und Materialien des Labors der Unfallchirurgie zu nutzen.

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. med Thomas Fuchs für die Betreuung der gesamten Arbeit, seine Unterstützung in deren Durchführung und seinen kompetenten Rat.

Frau Dr. rer. nat. Nancy Tholema danke ich für die tägliche engagierte wissenschaftliche Betreuung und die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse.

Ein ganz besonderer Dank geht an Daniel Günther für die bereichernde, gute und zuverlässige Zusammenarbeit.

Den Mitarbeitern des Forschungslabors für Unfallchirurgie möchte ich für die hervorragende, menschliche Zusammenarbeit und die tägliche Ansprechbarkeit und Unterstützung danken.

Weiterhin möchte ich allen Personen danken, die mich über die ganzen Jahre in meinem Studium und bei der Fertigstellung meiner Doktorarbeit begleitet haben, mir mit Kraft und Energie zur Seite standen und mich in meinem beruflichen Werdegang unterstützt haben. Diese Personen sind vor allem mein Ehemann, meine Eltern, Großeltern, Freunde und Studienkollegen.

11. Anhang

Resistogramm des verwendeten *Staphylokokkus aureus* (ATCC 49230)
 angefertigt am 5.12.2006 durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie des
 Universitätsklinikums Münster

Kommentar:

Keim #1: *Staphylococcus aureus* (staaur)

Antibiotics	staaur (1)
Penicillin-G	R
Oxacillin	S
+Ampicillin	R
+Ampicillin/sulbactam	S
+Amoxicillin/CA	S
+Cefuroxime - Sodium	S
+Cefaclor	S
+Cefotaxime	S
+Ceftriaxone	S
+Imipenem	S
Erythromycin	S
Clindamycin	S
Tetracycline	S
Gentamicin	S
Tobramycin	S
Norfloxacin	I
Ciprofloxacin	S
Levofloxacin	S
Trimethoprim/Sulfa	S
Rifampin	S
Vancomycin	S
Teicoplanin	S
Fosfomycin	S
Fusidic Acid	S
Nitrofurantoin	S
+Azithromycin	S
+Clarithromycin	S
Linezolid	S
Moxifloxacin	S

S= sensibel I= intermediär R= resistent MS= mässig sensibel

	NE	U7d	U14d	U21d	U28d
Titan	1,44±3,12	-0,38±2,83	1,06±3,8	1,81±4,28	3,88±5,11
Genta	0,69±3,53	3,06±3,89	1,75±3,77	3,06±4,06	6±4,44
Keins/syst	0,88±4,62	2,38±4,33	2,88±3,24	3,69±3,86	6,94±5,01
Titan/syst	1,56±3,44	1,31±4,38	4,63±3,81	4,69±4,44	6,13±4,16
Genta/syst	3,38±3,61	3,88±4,67	5,44±4,76	6,13±4,4	9,25±3,8

Tabelle : prozentuale Abweichung zum Ausgangsgewicht als Mittelwerte [%]
± Standardabweichung

DER
OBERBÜRGERMEISTER

STADT  MÜNSTER

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-
und Wiederherstellungschirurgie
Waldeyerstraße 1

48149 Münster

Veterinär- und Lebensmittel-
überwachungsamt

MS-Roxel, Schelmenstiege1

Auskunft erteilt:

Frau Feldkamp

Zimmer: 105

Telefon: 02534/971 - 304

Telefax: 02534/971 - 399

E-Mail:

boenigkr@stadt-muenster.de

Sprechzeiten:

nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:

Mein Zeichen:
39.32.5.4

Münster,
08.11.2004

Tierschutz

Änderung

Tierversuch: G 47/2004

Versuchsleiter: Dr. Thomas Fuchs

Stellvertreter: Dr. Richard Stange

Sehr geehrter Herr Dr. Fuchs,

gemäß § 11 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der z.Z. gültigen Fassung erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Haltung von

576 Ratten für das Versuchsvorhaben.

Diese Erlaubnis ergeht unter folgenden Nebenbestimmungen:

1. Die Tiere werden im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Domagkstr. 10, 48149 Münster, gehalten.
2. Die Verantwortung für die Haltung, Unterbringung und Pflege der Tiere liegt bei Ihnen. Bei einem Wechsel der verantwortlichen Person erlischt diese Erlaubnis.
3. Für die Pflege und Betreuung ist Herr Olaf Schütt benannt. Es ist dafür zu sorgen, dass den Tieren - ihrer Art entsprechend - ausreichende Beschäftigungsmöglichkeiten geboten werden.
4. Es ist ein Tierbestandsbuch zu führen. Sie haben über die Herkunft und den Verbleib der Tiere Aufzeichnungen zu machen und diese drei Jahre lang aufzubewahren. Außerdem sind die Tiere zu kennzeichnen.
5. **Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei der Tierart und der Tierzahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.**
6. Die medizinische Versorgung der Tiere hat durch Herrn Dr. M. Lücke, Leiter der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Münster (ZTE), zu erfolgen. Über

Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster Kto.-Nr. 752
Landeszentralbank Münster Kto.-Nr. 40 001 700
Postbank Dortmund Kto.-Nr. 21 1 36-461
Bank für Gemeinwirtschaft Kto.-Nr. 1 010 305 100
Bankhaus Lampe Münster Kto.-Nr. 306 002

(BLZ 400 501 50) Commerzbank Münster
(BLZ 400 000 00) Deutsche Bank Münster
(BLZ 440 100 46) Dresdner Bank Münster
(BLZ 400 101 11) Volksbank Münster eG
(BLZ 480 201 51) Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 393 210 0/00
Kto.-Nr. 0470 005
Kto.-Nr. 006 465 800
Kto.-Nr. 4 200 800
Kto.-Nr. 61 226

(BLZ 400 400 28)
(BLZ 400 700 80)
(BLZ 400 800 40)
(BLZ 401 600 50)
(BLZ 400 500 00)

Zentrale Verbindungen

⇒ Hauptvermittlung: (0251) 492-0
Telefax: (0251) 492-7700
Datelex-J: *0251492#
E-Mail: Stadtverwaltung@stadt-muenster.de
...

- 2 -

die Haltung ist er ebenfalls zu informieren.

7. Für den Fall von erheblichen oder wiederholten Verstößen gegen die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes behalte ich mir den Widerruf dieser Erlaubnis vor.
8. Die nachträgliche Aufnahme, Änderung und Ergänzung von Nebenbestimmungen behalte ich mir vor.
9. Diese Genehmigung gilt für die Versuchsdauer, längstens jedoch bis zum 30.06.2007.

Hinweis:

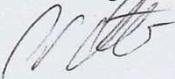
Bei Arbeiten mit genmanipulierten Tieren müssen die Vorschriften nach dem Gentechnikrecht eingehalten werden.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diese Erlaubnis können Sie innerhalb eines Monats, nachdem Ihnen die Erlaubnis bekannt gegeben worden ist, schriftlich oder zur Niederschrift bei dem Oberbürgermeister der Stadt Münster (Postanschrift: Der Oberbürgermeister, 48127 Münster) Widerspruch erheben. Der Nachbriefkasten befindet sich am Stadthaus I, Klemensstraße 10. Sie können den Widerspruch auch direkt beim Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt (Postanschrift: Der Oberbürgermeister, Amt 39, 48127 Münster, Hausanschrift: Schelmenstiege 1, 48161 Münster) erheben.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



Dr. Otto
Städt. Veterinärdirektor



WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung (ZTE)

der Medizinischen Fakultät

LEITER: DR. MED. VET. M. LÜCKE

Teilnahmebescheinigung

Frau Fania Goldmann, geb. 29.04.1981, cand.med.

hat im Wintersemester 2005/2006 in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster an einem 18-stündigen

Kursus der Versuchstierkunde

teilgenommen.

Es wurden theoretische und praktische Kenntnisse vermittelt, insbesondere

- rechtliche Bestimmungen für die Durchführung von Tierversuchen
- Maus, Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen als Versuchstier: Zucht, Haltung, Handling; biologische Daten, anatomische und physiologische Besonderheiten; klinische Beurteilung des Gesundheitszustandes; Applikationstechniken (i.v., i.m., i.p., s.c., oral); Blutentnahme
- Anästhesie: Methoden der Lokal- und Allgemeinanästhesie; Narkosestadien, Überprüfung der Narkosetiefe; Vorbereitung, Einleitung, Unterhaltung und Ausleitung der Narkose; postoperative Versorgung, Schmerzerkennung und -behandlung
- Versuchstierkennzeichnung
- tierschutzgerechte Tötung und Sektion von Versuchstieren
- Bewertung der Belastung von Versuchstieren im Tierexperiment
- Ergänzungs- und Ersatzmethoden zum Tierversuch

Münster, 7. Februar 2006

(Dr. med. vet. M. Lücke)
Fachtierarzt für Versuchstierkunde