

Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung
silber- bzw. calciumhydroxidhaltiger
Hydroxylapatitbeschichtungen zur Prophylaxe der
implantatassoziierten Osteitis am Tiermodell der Ratte

Johannes Karl Gorkotte

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen
Universität München zur Erlangung eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Rainer Burgkart
2. apl. Prof. Dr. Norbert Harrasser

Die Dissertation wurde am 30.01.2025 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Medicine and Health am 30.04.2025 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Veröffentlichungen.....	5
2	Abkürzungsverzeichnis	5
3	Einleitung.....	6
3.1	Epidemiologie und Relevanz	6
3.2	Infektmodelle	7
4	Material und Methoden	10
4.1	Metaphysäres PPI-Modell an der Rattentibia	10
4.1.1	Material	10
4.1.1.1	Implantat	10
4.1.1.2	Instrumentarium	10
4.1.1.3	Bakterienstamm	11
4.1.1.4	Versuchstiere.....	11
4.1.1.5	Sterile Medien	12
4.1.1.6	Photometer	12
4.1.1.7	Ultraschallbad.....	12
4.1.2	Methoden.....	13
4.1.2.1	Beimpfungsvolumen.....	13
4.1.2.2	Herstellung der Bakteriensuspension	13
4.1.2.3	Implantation	14
4.1.2.4	Euthanasie und Operative Entnahme der Proben	15
4.1.2.5	Röntgen	16
4.1.2.6	Semi-quantitative Beurteilung des Drehmoments.....	17
4.1.2.7	Mikrobiologische Untersuchung der Proben	18
4.2	Biokompatibilität von Ca(OH) ₂ - und Silber-dotiert beschichteten Implantaten an der Rattentibia	20
4.2.1	Material	20
4.2.1.1	Implantat	20
4.2.1.2	Instrumentarium	20
4.2.1.3	Versuchstiere.....	20
4.2.1.4	Sterile Medien	20
4.2.1.5	Photometer und Ultraschallbad	20
4.2.2	Methoden.....	20
4.2.2.1	Beimpfungsvolumen.....	20
4.2.2.2	Implantation	20

4.2.2.3	Euthanasie und Operative Entnahme der Proben	21
4.2.2.4	Röntgen	21
4.2.2.5	Semi-quantitative Beurteilung des Drehmoments.....	21
4.2.2.6	Mikrobiologische Untersuchung der Proben	21
4.2.2.7	Zelluläre Blutuntersuchung	21
5	Ergebnisse.....	22
5.1	Metaphysäres PPI-Modell an der Rattentibia	22
5.1.1	Klinische Beurteilung	22
5.1.2	Labortechnische Blutuntersuchung.....	22
5.1.3	Mikrobiologische Untersuchungen	23
5.1.3.1	OP-Tag (Tag 0)	23
5.1.3.2	Explantations-Tag (Tag 42)	23
5.1.4	Postmortale radiologische Bildgebung.....	25
5.1.5	Semi-quantitative Beurteilung der Osseointegration anhand des Drehmoments	25
5.2	Biokompatibilität von Ca(OH) ₂ - und Silber-dotiert beschichteten Implantaten an der Rattentibia	26
5.2.1	Klinische Beurteilung	26
5.2.2	Mikrobiologische Untersuchungen	26
5.2.3	Postmortale radiologische Bildgebung.....	26
5.2.4	Semi-quantitative Beurteilung der Osseointegration anhand des Drehmoments	26
6	Diskussion.....	27
6.1	Metaphysäres PPI-Modell an der Rattentibia	27
6.1.1	Auswahl des Referenzkeims	27
6.1.2	Bestimmung der Lebendkeimzahl im Schraubenlager	27
6.1.3	Modelllokalisierung	27
6.1.4	Keimkonzentration	27
6.1.5	Beurteilung der Osseointegration	27
6.1.6	Implantatbeschaffenheit	27
6.1.7	Zuverlässige Infektprovokation	28
6.1.8	Radiologische Bildgebung.....	28
6.1.9	Silber-dotierte HA-Beschichtung	29
6.1.10	Limitationen.....	29
6.2	Biokompatibilität von Ca(OH) ₂ - und Silber-dotiert beschichteten Implantaten an der Rattentibia	30
6.2.1	Kontaminationsfreies Modell	30

6.2.2	Exzellente Osseointegration aller drei Beschichtungen	30
6.2.3	Substrat der drei Beschichtungen	31
7	Zusammenfassung.....	32
8	Danksagung	33
9	Abbildungsverzeichnis.....	34
10	Tabellenverzeichnis	34
11	Literaturverzeichnis.....	35

1 Veröffentlichungen

Einzelne Inhalte dieser Arbeit sind bereits vorab publiziert worden:

Harrasser, N., de Wild, M., Gorkotte, J., Obermeier, A., Feihl, S., Straub, M., Burgkart, R. (2016).

Evaluation of calcium dihydroxide- and silver-coated implants in the rat tibia.

J Appl Biomater Funct Mater, 14(4), e441-e448. doi:10.5301/jabfm.5000323

Harrasser, N., Gorkotte, J., Obermeier, A., Feihl, S., Straub, M., Slotta-Huspenina, J., Burgkart, R. (2016).

A new model of implant-related osteomyelitis in the metaphysis of rat tibiae.

BMC Musculoskelet Disord, 17, 152. doi:10.1186/s12891-016-1005-z

2 Abkürzungsverzeichnis

al.	altera
ATCC	American Type Culture Collection
bzw.	beziehungsweise
Ca(OH) ₂	Calciumhydroxid
ca.	circa
CFU	Colony forming units
HA	Hydroxylapatit
i.v.	intravenös
KBE	Kolonie bildende Einheit
KG	Körpergewicht
McF	McFarland
MSSA	Methicillin sensibler Staphylococcus aureus
MH	Mueller-Hinton
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
OD	Optische Dichte
PPI	Periprothetische Infektion
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMMA	Polymethylmethacrylat
HA-Ag	silberdotiertes Hydroxylapatit
spp.	Spezies
S.	Staphylococcus
TEP	Totalendoprothese

3 Einleitung

3.1 Epidemiologie und Relevanz

Periprotetische Infektionen (PPI) stellen mit 15,3 % bei Hüft-Totalendoprothesen-Revisionen die vierthäufigste Indikation nach aseptischer Lockerung (36,5 %), Polyethylen-Verschleiß mit und ohne Osteolyse (19,3 %) sowie TEP-Luxation (17,7 %) dar (Wetters et al., 2013). Jedoch sind Revisionen hier mit einer wesentlich höheren Mortalität assoziiert: Die 5-Jahres-Mortalität liegt bei 25,9 % gegenüber 12,9 % bei aseptischen Revisionen (Zmistowski et al., 2013). Das angepasste relative 1-Jahres-Mortalitätsrisiko nach H-TEP-Revisionen aufgrund einer PPI liegt bei 2,18 gegenüber den Patienten ohne Revision (Gundtoft et al., 2017).

Die 5-Jahres-Inzidenz einer erstmaligen Hüftgelenkprotheseninfektion liegt bei 1,03 % (Gundtoft et al., 2015). Der Anteil der Revisionsoperationen aufgrund von Infektionen ist steigend, möglicherweise aufgrund eines kränkeren Patientengutes, wobei auch die „Wohlstandserkrankung“ Adipositas einen Risikofaktor darstellen mag (Jansen et al., 2010). Im Revisionsfall steigt das Risiko einer PPI weiter an auf 4 %. Zudem dürfte die Erfassung jedoch deutlich zu niedrig greifen, da ein beträchtlicher Teil an Low-Grade-Infekten klinisch nicht septisch evident wird und fälschlicherweise aseptisch diagnostiziert wurde (Winkler et al., 2014). Abhängig von Lokalisation und Art des Kunstgelenks sind Infektionsinzidenzen bis zu 15 % (Mega-/ Tumorendoprothesen) bekannt (Otto-Lambertz et al., 2017).

Das Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen zählte im Jahr 2019 19550 H-TEP-Wechsel bzw. –Komponentenwechsel (IQTIG, 2020). In Anbetracht der älter werdenden Bevölkerung stehen wir vor einer weiteren Erhöhung der Implantationszahlen.

Abgesehen von der höheren Mortalität und der sozioökonomischen Belastung stellen periprotetische Infektionen auch extreme psychische Belastungen für den Patienten dar. Die vier möglichen Therapieoptionen einer PPI umfassen das Debridement mit Erhalt der Prothese, das ersatzlose Entfernen der Prothese sowie den ein- oder zweizeitigen Wechsel (Darouiche, 2004). Letzterer erfordert auch vorübergehend den ersatzlosen Ausbau der infizierten Endoprothese und führt so zu einer Girdlestone-Situation. Bis der Infekt ausgeheilt ist, wird eine neue Prothesenversorgung verzögert um eine erneute Keimbesiedelung zu verhindern. Eine teilweise Belastung des betroffenen Beines ist nur mit äußerst aufwendiger krankengymnastischer Mobilisierung über mehrere Wochen möglich und erfordert intensive Schmerztherapie. Da die Wirkung von Lokalanästhetika im entzündeten, sauren Gewebe herabgesetzt ist, erfordern solche Operationen häufig eine Leitungsbahnanästhesie zur postoperativen Schmerzreduktion. Bestrebungen PPI zu verhindern bestehen deshalb in vielen Richtungen.

Teils aus dem Bewusstsein verdrängt sind die immensen Bemühungen für die Hygiene und Infektionsprävention, die wie selbstverständlich auf mehreren Ebenen unternommen werden: In Deutschland definiert die KRINKO nicht nur baulich-funktionelle Anforderungen an die Operationsabteilungen, sondern auch betrieblich-organisatorische und betont dabei besonders Implantat-abhängige Faktoren für das Infektionsrisiko (KRINKO, 2018). Die Notwendigkeit die Pathogenese der PPI zu verstehen und adäquate präventive Maßnahmen zu ergreifen um die Infektrate weiter zu senken, kann nicht oft genug betont werden.

3.2 Infektmodelle

Über die In-Vivo-Testung antiinfektiver Beschichtungen, ggf. auch mit Antibiotika hinaus, gibt es bereits heute zahlreiche Tiermodelle, um die Implantat-assoziierten Infektionen besser zu verstehen und zu verhindern. Durch die Vereinheitlichung auf ein Modell lassen sich viele Einflussfaktoren standardisiert und reproduzierbar untersuchen. Vielen Tier-Modellen ist jedoch eine Inokulationsmenge gemein, die über die klinisch typische Keimmenge einer zur Osteomyelitis führenden Verunreinigung hinausgeht ($\geq 10^3$ koloniebildende Einheiten (KBE)) (Arens et al., 1999; Haenle et al., 2013; Lucke et al., 2003a; Lucke et al., 2003b; Monzon et al., 2001; Soe et al., 2013; Svensson et al., 2013).

Geipel postulierte die „Mikrobiologische Trias“ einer PPI bedingenden Faktoren:

- „Ein niedriges bakterielles Inokulum ist ausreichend zur Verursachung einer Infektion,
- charakteristisch ist ein atypisches Erregerspektrum, das im Wesentlichen aus niedrig virulenten Keimen der normalen Hautflora besteht,
- in vielen Fällen kann die Infektion ohne vollständige Entfernung des Fremdmaterials nicht geheilt werden.“ (Geipel & Herrmann, 2004)

Diese Arbeit soll unter anderem ein Tier-Modell etablieren, das die ersten beiden Punkte erfüllt, um die klinischen Umstände realitätsnah zu imitieren. Insbesondere gilt es zu untersuchen, ob mit der klinisch relevanten Keimmenge zuverlässig eine Osteomyelitis an der Ratten-Tibia ausgelöst werden kann. Dazu wird als unabhängiger Parameter eine Inokulationsmenge von 10^2 zu 10^3 KBE verglichen.

Kirschner-Drähte, Platten und Gelenkprothesen wie in vielen Modellen verwendet erlauben nur schwerlich die Osseointegration zu quantifizieren (Akiyama et al., 2013; Lucke et al., 2005). Mit den hier verwendeten Schrauben ist die Quantifizierung der Osseointegration möglich (Svensson et al., 2013). Dazu wurde ein neuer semiquantitativer Score entworfen.

Jegliches Bemühen muss darauf gerichtet sein, die Realitätsnähe des Modells sicherzustellen. Für die Chirurgie der Gelenkprothesen ist die vielfach verwendete diaphysale Implantatposition unrealistisch (Gosheger et al., 2004; Lucke et al., 2005; Svensson et al., 2013). Das hier geprüfte metaphysale Modell erlaubt orthopädische Implantate realitätsnäher zu testen.

Geipel definiert im zweiten Punkt seiner Mikrobiologischen Trias niedrigvirulente Keime der normalen Hautflora als wesentliches Erregerspektrum. Weiter differenziert handelt es sich hier besonders häufig um Staphylokokken (Siehe dazu auch Tabelle 1).

Tabelle 1: Erregerspektrum bei Gelenkinfektionen (Geipel & Herrmann, 2004)

Anteil verschiedener Infektionserreger bei Gelenkprotheseninfektionen	
Pathogen	Häufigkeit [%]
Staphylokokken , davon	50 – 60
• Koagulasenegative Staphylokokken	25 – 30
• <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Gramnegative, aerobe Stäbchenbakterien (u. a. <i>Enterobacteriaceae</i> , wie <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Morganella morganii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella enterica</i> sowie nicht fermentierende Erreger wie <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Alcaligenes</i> spp.)	20
Streptokokken (<i>S. agalactiae</i> , sog. „Viridans-Streptokokken“, seltener andere)	10 – 15
Polymikrobiell	10 – 15
Anaerobier (u. a. <i>Propionibacterium</i> spp., Peptostreptokokken, <i>Bacteroides</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Veillonella parvula</i>)	7 – 10
Andere Erreger ^a	2
Ohne Erregernachweis	10
^a Periprothetische Infektionen können neben o. g. Erregern durch eine Vielzahl von weiteren Mikroorganismen verursacht werden. Berichtet wurde u. a. über Implantatinfektionen durch <i>Haemophilus</i> spp., <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> , <i>Mycobacterium chelonae</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Tropheryma whipplei</i> , <i>Actinomyces</i> spp., <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Candida</i> spp.	

Bei dem hier verwendeten Keim *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 (ATCC 25923, Stammbezeichnung Seattle 1945) handelt es sich um einen Standard-Labor-Testkeim, der sensitiv auf viele Antibiotika u.a. auch Methicillin ist (Treangen et al., 2014).

Im dritten Punkt der Mikrobiologischen Trias beschreibt Geipel, dass in vielen Fällen eine vollständige Implantatentfernung notwendig ist. Bei einer PPI bildet sich auf der (häufig kompletten) Oberfläche des Fremdkörpers ein Biofilm, der für systemisch applizierte Antibiotika kaum zugänglich ist (Del Pozo, 2018; Snyder et al., 2017; Stewart & Costerton, 2001): Es droht der vorübergehende Ausbau (Zimmerli & Ochsner, 2003). Deshalb ist heute schon die Beschichtung der Implantatoberfläche eine übliche Strategie zur Infektophylaxe (Harrasser et al., 2015; Poelstra et al., 2000). Dazu werden häufig Antibiotikabeschichtungen verwendet (Hetrick & Schoenfisch, 2006). Durch die zunehmende Resistenzentwicklung verlieren diese jedoch an Wirkung (Jansen et al., 2010; Schmidmaier et al., 2006). Eine alternative Strategie stellt die Silberdotierung der Prothesen dar (Gosheger et al., 2004; Harges et al., 2007; Harrasser et al., 2015). Deren zytotoxische Wirkung schränkt allerdings auch die Osseointegration ein (Smeets et al., 2017). Im Umfeld der Zahnmedizin besteht für Calciumhydroxid $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bereits ein reicher Erfahrungsschatz: Es ist ein weit verbreitetes Medikament für die Zahnwurzeldeinfektion (Lee et al., 2014).

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ bildet in Verbindung mit Wasser eine stark basische Lauge, die ätzend wirkt. In der lokalen Applikation kann das basische Milieu somit bakterizid und antiinfektiv genutzt werden (Siqueira & Lopes, 1999). Systemische Nebenwirkungen bestehen durch die rasche Neutralisation nicht. Die Weichteilgewebeheilung wird durch die lokale Anwendung einer $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Suspension in der Zahnmedizin sogar verbessert (Kasaj et al., 2006). Im Tierversuch konnte auch ein gesteigertes

Knochenwachstum gezeigt werden (Polat et al., 2009). Trotz der guten Erfahrungen in der Zahnmedizin und der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie findet Ca(OH)_2 bisher noch keine Anwendung in der Extremitätenchirurgie.

Somit ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit, durch den Tierversuch die Biokompatibilität der Beschichtungen Hydroxylapatit (HA), silberdotiertes Hydroxylapatit (HA-Ag) und Calciumhydroxid Ca(OH)_2 im direkten Knochenkontakt zu evaluieren.

Es folgt nun die Darstellung von Material und Methoden gegliedert nach den beiden o.g. Zielen dieser Arbeit:

1. Etablieren eines Tiermodells für eine metaphysäre periprothetische Infektion. Hierbei werden vergleichend nur HA- und auch HA-Ag-beschichtete Implantate geprüft.
2. Vergleich der Biokompatibilität von Ca(OH)_2 -, HA-Ag- und HA-beschichteten Implantaten an der nicht-infizierten Rattentibia.

4 Material und Methoden

4.1 Metaphysäres PPI-Modell an der Rattentibia

4.1.1 Material

4.1.1.1 Implantat

Als Implantate finden hier speziell angefertigte und entsprechend der Versuchsgruppen beschichtete Schrauben Verwendung. Jeweils 24 Schrauben sind beschichtet mit Hydroxylapatit (HA) oder Hydroxylapatit und Silber (HA-Ag).

Die ursprüngliche Schraube selbst besteht aus einer Titanlegierung mit Aluminium und Vanadium (Ti6Al4V). Eine Schraube ist 5mm lang und hat an der breitesten Stelle einen Durchmesser von 3,5mm. Der 2mm lange Schraubenkopf besitzt kein Kinn und ist mit Nuten versehen um einen rotationsstabilen Verschluss mit dem Aufnehmer zu ermöglichen. Für den Kontakt mit dem Aufnehmer besitzt die Schraube ein Innengewinde. Die Beschichtung der HA- und HA-Ag-Implantate erfolgte mittels Vacuum Plasma Spray (VPS) durch Atesos Medical AG/Medicoat AG, Bern, Schweiz. Die hierbei hergestellten Beschichtungen weisen eine Schichtdicke von circa 100 µm auf. Die HA-Ag-Implantate enthalten 45 ppb Silber, was einer verhältnismäßig geringen Dosierung entspricht.

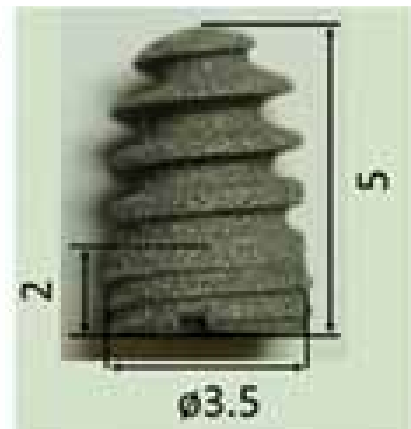


Abbildung 1: Schraubenimplantat

4.1.1.2 Instrumentarium

Für die Implantatschrauben wurde ein eigenes Instrumentarium angefertigt. Dieses umfasst einen Bohrer, einen Gewindebohrer und einen Gewindeformer zur Anfertigung der Bohrlöcher mit Gewinde. Auf diese Instrumente passt eine universelle Handhalterung.

Ein Aufnehmer für die Implantate sichert diese über das Innengewinde der Schrauben. Durch die entsprechenden Nuten im Implantat kann der Aufnehmer durch Rotation des oberen Teils des Fingergriffs gegenüber dem Teil mit größtem Umfang vom Implantat gelöst werden, ohne die Schraube nach Implantation zu rotieren.

Zum Pipettieren findet eine gewöhnliche 25 µl-Kolbenhubpipette (Hamilton, Reno, NV) Verwendung.



Abbildung 2: Autoklavierbares Mehrweg-Instrumentarium (v.l.n.r.): Gewindeschneider, Schraubenaufnehmer mit Schraube, Bohrer, Gewindeformer, Aufnehmer, Tiefenmessgerät, Aufnehmer

Für die Weichteilnaht wurde resorbierbarer, polyfiler Faden (Vicryl rapid, Ethicon Inc., Cincinnati, USA; Größe 6-0), für die kontinuierliche intrakutane Naht resorbierbarer, monofiler Faden (4-0 Monocryl, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) und für die Einzelknopfnähte nicht resorbierbarer, monofiler Faden (4-0 Prolene, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verwendet.

4.1.1.3 Bakterienstamm

Für die Versuche wird *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ATCC25923, LGC Standards GmbH, Wesel, Germany) verwendet. *S. aureus* wird häufig bei periprothetischen Infekten nachgewiesen (Geipel & Herrmann, 2004). Der Stamm wird durch wöchentliche Kulturerhaltung auf MH-Platten erhalten. Dazu wird der Stamm nach Übertragung auf eine neue MH-Platte für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend im Kühlschrank bei 5 °C für sechs Tage gelagert. Zudem wird er in MHBII als Flüssigmedium rekultiviert. Präoperativ wird der Stamm auf eine neue MH-Platte übertragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert, damit bei der Messung der Optischen Dichte zur Bestimmung der Zellzahl hauptsächlich lebende Bakterien erfasst werden.

4.1.1.4 Versuchstiere

Für diese Versuche finden männliche Wistar Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) in einem Alter von fünf Monaten und mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 378,4 g (zwischen 353 g und 401 g) Verwendung. Die Tiere werden zur Akklimation mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn in der Einrichtung gehalten. Die Ratten werden dabei in Gruppen von zwei bis fünf Tieren pro Käfig untergebracht. Lediglich für acht Tage postoperativ werden sie einzeln gehalten. Die

Tiere bekommen Futter und Wasser ad libitum. Die speziellen Tierhaltungsräume sind klimatisiert und verfügen über einen Hell-Dunkel-Rhythmus mit Dämmerungsphase.

Entsprechend der Empfehlungen des Ethik-Komitees die Anzahl der Versuchstiere zu minimieren, wird die Zahl auf 12 Tiere pro Beschichtungs-Gruppe beschränkt.

Tabelle 2: Einteilung nach Beschichtung und Bakterienkonzentration in Subgruppen zu je sechs Tieren

	HA	HA-Ag
10^2 KBE	Subgruppe I A	Subgruppe II A
10^3 KBE	Subgruppe I B	Subgruppe II B

Der Tierversuch wurde nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes bei der Regierung von Oberbayern beantragt und von dieser genehmigt (Reg.-Nr. 146-14). Die Durchführung erfolgte entsprechend der OECD-Grundsätze zur Guten Laborpraxis.

4.1.1.5 Sterile Medien

- Destilliertes Wasser
- PBS Pufferlösung Phosphat Buffered Saline (Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- 0,9%-NaCl-Lösung (B. BRAUN SE, Melsungen, Deutschland)

4.1.1.6 Photometer

Die optische Dichte (OD600) wird mit einem Eppendorf BioPhotometer 6131 in Küvetten auf 10mm Schichtdicke bei 8,5 mm Lichtstrahlhöhe bestimmt.

4.1.1.7 Ultraschallbad

Bei dem hier verwendeten Bandelin Sonorex RK255H handelt es sich um ein Hochleistungs-Ultraschallreiniger mit einer Ultraschall-Spitzenleistung von 640 W und per Drehgriffbedienung einstellbarer Reinigungsdauer und Badtemperatur.

4.1.2 Methoden

4.1.2.1 Beimpfungsvolumen

In einem Vorversuch an Rattentibiae wird mit Tinte die Inokulation simuliert. Ziel ist auch das maximale Volumen zu finden, welches auch nach Einbringen des Implantats nicht aus der Inokulationshöhle austritt. 10 µl werden als optimales Beimpfungsvolumen ermittelt.

4.1.2.2 Herstellung der Bakteriensuspension

Um die Bakterien im lebenden und wachsenden Zustand zu halten wird ein Einfrieren des Stammes präoperativ strikt vermieden. Von der über Nacht inkubierten MH-Platte werden Bakterien in MHBII in Suspension gebracht und im Schüttelinkubator (Heidolph Unimax 1010 mit Heidolph Inkubator 1000) bei 37 °C zum Wachstum angeregt.

Die Lösung wird durch das Verdünnen der Bakteriensuspension mit MHBII auf eine optische Dichte $OD_{600}=0,100$ eingestellt, da die Messungenauigkeit bei dieser Optischen Dichte messtechnisch bedingt am geringsten ist (MacFarland Densimat™, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich). Von dieser bekannten Konzentration aus werden die Zielkonzentrationen erstrebt durch weitere Verdünnungsstufen.

Ein Aliquot jeder Ziellösung wird vor Inokulation in mehreren Verdünnungsstufen (jeweils 10-fach) auf jeweils zwei Columbia-Blutagar-Medien ausplattiert (BD Columbia Agar with 5 % sheep blood, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert, um die inokulierte Bakterienmenge zu quantifizieren.

4.1.2.3 Implantation

Die Implantation der Schrauben erfolgt modifiziert nach einem von Lucke et al. für Implantatnägel beschriebenen Model (Lucke et al., 2003b).

Die Allgemein-Anästhesie der Tiere erfolgt durch einen permanent anwesenden Tierarzt. Medetomidin ($150 \mu\text{g}/\text{kg KG}$), Midazolam ($200 \mu\text{g}/\text{kg KG}$) und Fentanyl ($5 \mu\text{g}/\text{kg KG}$) werden gewichtsadaptiert intramuskulär injiziert. Durch Punktion der Schwanzvene erfolgt die präoperative Blutentnahme.

Bereits intraoperativ wird als nichtopioides Analgetikum Metamizol ($110 \text{ mg}/\text{kg KG}$) s.c. zu OP-Beginn appliziert. Zur Narkoseausleitung, also kurz vor der Hautnaht wird als hochpotentes Opioid Buprenorphin ($0,05 \text{ mg}/\text{kg KG}$) s.c. appliziert.

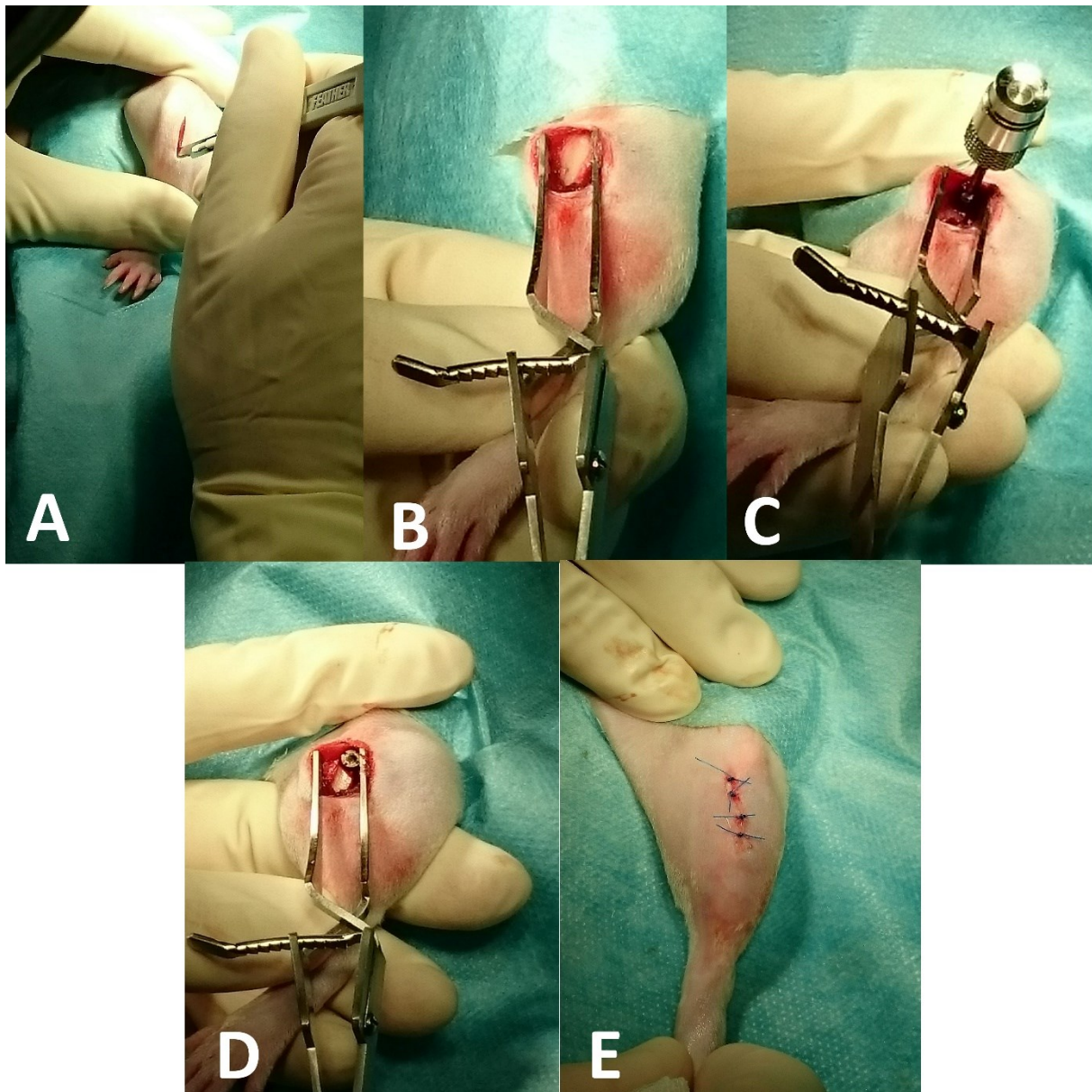


Abbildung 3: Operatives Vorgehen (linke Tibia): (A) Hautschnitt an der anterolateralen Tibia, (B) Durch Spreizer sichtbarer Knochen der proximalen Tibia, (C) Bohrer in Tibia-Metaphyse, (D) eingeschraubtes Implantat, (E) mit 4-0 Prolene versorgte Hautnaht

Nach der Rasur des Hinterbeines entfernen gründliche Reinigung und großzügige Desinfektion mit Povidon-Iod über dem OP-Gebiet etwaige Kontaminationen. Anschließend erfolgt die sterile Abdeckung, welche das Hinterbein ausspart. Ein Schnitt (Abbildung 3 A) über etwa 1-2 cm durch Haut und Faszie über der linken proximalen lateralen Tibia-Metaphyse eröffnet den Aufsetzpunkt (Abbildung 3 B) für den Handbohrer (1,8 mm) (Abbildung 3 C). Die Sicht auf diesen wird durch das Einsetzen eines Spreizers und stumpfe Präparation optimiert. Der Handbohrer bohrt extraartikulär in den metaphysären Markraum im Bereich des lateralen Tibiakopfes ein ca. 8mm tiefes Loch. Ein implantatspezifischer Gewindeschneider schneidet manuell ein Gewinde in den Bohrkanal. Eine sterile Kompresse wird aufgesetzt bis die Blutung sistiert.

Ein unsteriler Helfer vortext das benötigte Eppendorf-Reaktionsgefäß und entnimmt mit einer sterilen Eppendorf-Pipetten-Spitze 10 µl der zu injizierenden Lösung. Das Bohrloch und spätere Implantatlager wird in aufrechter Stellung gelagert, sodass einem Ausfließen des Injektats entgegengewirkt wird. Der unsterile Helfer injiziert unter Berücksichtigung, d.h. ohne Kontakt zum sterilen Operationsgebiet 10 µl der zu injizierenden Lösung. In die linke Tibia wird sterile PBS-Lösung injiziert.

Anschließend wird das entsprechend der Versuchsgruppe beschichtete Implantat eingeschraubt (Abbildung 3 D). Eine Intrakutannaht mit resorbierbarem Faden verschließt die Hautwunde (Abbildung 3 E).

Nun folgt analog die Implantation der Schraube an der rechten Tibia mit Beginn beim Hautschnitt und späterer Einbringung der Bakteriensuspension. In das Implantatlager der rechten Tibia werden 10 µl der Bakteriensuspension injiziert.

Zur vergleichenden Evaluation erfolgt die Aufnahme von Röntgenbildern in zwei Ebenen mit einem Röntgengerät (Mobilett Plus X-ray unit, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) auf Digitalfilm (DLR Cassette, Digiscan 2H/2C, Siemens AG, Erlangen, Deutschland).

Postoperativ wird die Narkose durch eine subkutane Verabreichung von 750 µg/kg KG Atipamezol (Alzane, Pfizer, Berlin, Deutschland), 200 µg/kg KG Flumazenil (Flumazenil-ratiopharm, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) und 120 µg/kg KG Naloxon (Naloxon-Ratiopharm, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) antagonisiert.

Die postoperative Analgesie erfolgt mit Buprenorphin (0,05 mg/kg KG s.c., 2 x tägl.) für zwei Tage. Nicht-opioid ergänzend erhalten die Tiere das NSAR Meloxicam (Metacam) intraoperativ beginnend für weitere drei Tage täglich zu je 1 mg/kg KG s.c. oder wenn möglich p.o.

Die Tiere wurden entsprechend ihrer Implantatgruppen getrennt. Das postoperative Monitoring umfasst die bis zum dritten postoperativen Tag tägliche und später dreimal wöchentliche Inspektion, klinische Untersuchung und Gewichtskontrolle.

4.1.2.4 Euthanasie und Operative Entnahme der Proben

Die bereits beschriebene Blutabnahme in Allgemeinanästhesie am Tag 0 der Implantation wird am Tag 42 vor der Euthanasie wiederholt. Hier werden nun jedoch 3 ml aus dem rechten Herz-Vorhof gewonnen. Die Euthanasie selbst erfolgt anschließend in der gleichen Vollnarkose durch die intrakardiale Injektion einer Pentobarbital-Überdosis (80 mg/kg KG).

Die Entnahme der Tibia erfolgt analog der Inokulation unter sterilen OP-Bedingungen. Zunächst wird die linke Seite entfernt (Kontrollseite). Die Tibia wird von anhaftenden Weichteilen befreit, sodass ein

späteres Ausdrehen der Schraube im Labor möglich ist. Die proximale Tibia wird durch eine Schere abgetrennt und in einem 50 ml-Falcon in das mikrobiologische Labor transportiert.

4.1.2.5 Röntgen

Unmittelbar nach der Implantation und nach der Euthanasie werden mithilfe des mobilen Röntgengeräts in zwei Ebenen Bilder angefertigt. Es werden drei Regions of Interest (ROI) definiert: R1 Epiphyse, R2 Metaphyse mit Implantat, R3 proximale Diaphyse.

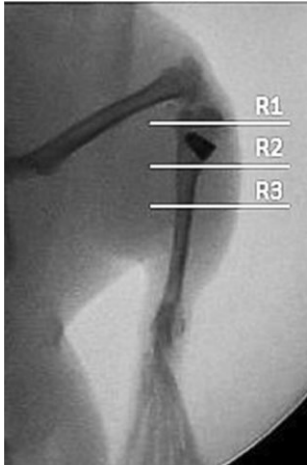


Abbildung 4: Regions of interest im Röntgenbild: R1 Epiphyse, R2 Metaphyse mit Implantat und R3 proximale Diaphyse

Jeder dieser Interessensbereiche wird teils einzeln untersucht in Betracht auf:

1. Periostale Reaktion
2. Osteolyse
3. Weichteilschwellung
4. Sequesterbildung
5. Implantat-Lockerung

Der von Lucke bereits modifizierte Score von An und Friedman wird weiterentwickelt (An & Friedman, 1998; Lucke et al., 2003b):

Die Kriterien 1 bis 4 werden in je drei Grade eingeteilt: nicht nachweisbar (0 Punkte), mild ausgeprägt (1 Punkt) und stark ausgeprägt (2 Punkte). Die erreichten Werte aller ROIs werden addiert. Ist das Kriterium 5 positiv, also die Schraube gelockert, wird die Summe mit zwei multipliziert. Bei drei ROIs auf einem Bild, ist für ein Bein somit ein Maximalpunktwert von 48 möglich (3 ROIs x 4 Kriterien x 2 Punkte x 2 bei Implantatlockerung).

Tabelle 3: Radiologischer Osseointegrations-Score (modifiziert nach An und Friedman)

R1 Epiphyse			
Periostale Reaktion	Nicht nachweisbar: 0	Mild ausgeprägt: 1	Stark ausgeprägt: 2
Osteolyse	Nicht nachweisbar: 0	Mild ausgeprägt: 1	Stark ausgeprägt: 2
Weichteilschwellung	Nicht nachweisbar: 0	Mild ausgeprägt: 1	Stark ausgeprägt: 2
Sequesterbildung	Nicht nachweisbar: 0	Mild ausgeprägt: 1	Stark ausgeprägt: 2
Implantat-Lockerung	Negativ: Faktor x1		Positiv: Faktor x2
R2 Metaphyse			
Periostale Reaktion	Nicht nachweisbar: 0	Mild ausgeprägt: 1	Stark ausgeprägt: 2
Osteolyse	Nicht nachweisbar: 0	Mild ausgeprägt: 1	Stark ausgeprägt: 2
Weichteilschwellung	Nicht nachweisbar: 0	Mild ausgeprägt: 1	Stark ausgeprägt: 2
Sequesterbildung	Nicht nachweisbar: 0	Mild ausgeprägt: 1	Stark ausgeprägt: 2
Implantat-Lockerung	Negativ: Faktor x1		Positiv: Faktor x2
R3 Diaphyse			
Periostale Reaktion	Nicht nachweisbar: 0	Mild ausgeprägt: 1	Stark ausgeprägt: 2
Osteolyse	Nicht nachweisbar: 0	Mild ausgeprägt: 1	Stark ausgeprägt: 2
Weichteilschwellung	Nicht nachweisbar: 0	Mild ausgeprägt: 1	Stark ausgeprägt: 2
Sequesterbildung	Nicht nachweisbar: 0	Mild ausgeprägt: 1	Stark ausgeprägt: 2
Implantat-Lockerung	Negativ: Faktor x1		Positiv: Faktor x2

Weitere radiologische Bildgebungen zwischen Implantation und Euthanasie wurden bewusst unterlassen, da keine wesentliche wissenschaftliche Erkenntnis zu erwarten ist und eine zusätzliche Allgemeinanästhesie damit nicht begründet wäre. Untersuchungen zeigen, dass in der Akutphase die meisten radiologischen Zeichen einer Osteomyelitis im konventionellen Röntgenbild nicht nachweisbar sind (Kaiser et al., 1998).

4.1.2.6 Semi-quantitative Beurteilung des Drehmoments

Das Ausdrehen der Schraube erfolgt mit dem ebenso zur Implantation verwendeten sterilen Material. Beim Ausdrehen mit dem passend angefertigten Aufnehmer wird semi-quantitativ das nötige Drehmoment beurteilt. Bei der anschließenden makroskopischen Inspektion wird ein besonderes Augenmerk auf noch anhaftende Knochenstücke gelegt. Die semi-quantitative Einteilung des Drehmoments zum Entfernen der Schraube aus dem Knochen erfolgt entsprechend folgendem selbst entwickeltem Score:

Tabelle 4: Widerstand zum Ausdrehen

1	Schraube gelockert, Entnahme mit Pinzette möglich
2	Schraubendreher notwendig, Widerstand sehr gering (Pinzettengriff ausreichend)
3	Moderater Widerstand beim Ausdrehen mit Schraubendreher
4	Deutlicher Widerstand beim Ausdrehen mit Schraubendreher
5	Ausdrehen führt zu Knochenfraktur

Das Vorhandensein von noch anhaftenden Knochenstücken wird mithilfe eines weiteren ebenfalls fünfstufigen Scores quantifiziert:

Tabelle 5: Anhaftende Knochenstücke

1	Keine sichtbaren Knochenrückstände auf der Schraube
2	Spurenhafte Rückstände auf der Schraube (< 10 % der Oberfläche)
3	Vereinzelte Rückstände auf der Schraube (10 % – 25 % der Oberfläche)
4	Ausgedehnte Rückstände auf der Schraube (25 % – 50 % der Oberfläche)
5	Größtenteils rückstandsbedeckte Schraube (>50 % der Oberfläche)



Abbildung 5: Scoring der anhaftenden Knochenstücke anhand der prozentualen Oberflächenabdeckung (rot schraffiert)

Die beiden Scores einer Schraube werden addiert und zum Osseointegrations-Score zusammengefasst.

Jeweils ein Implantat der sterilen Seite der HA- und HA-Ag-Gruppe wurde nicht ausgedreht, sondern außerhalb dieser Arbeit histologisch hinsichtlich der Osseointegration untersucht (de Wild et al., 2013).

4.1.2.7 Mikrobiologische Untersuchung der Proben

4.1.2.7.1 Untersuchung der Wundabstriche

Zum bakteriologischen Keimnachweis wurden allen Tieren Wundabstriche aus dem Subkutangewebe und der Implantationsstelle vor Ausdrehen des Implantats jeweils beider Tibiae entnommen.

Die Auswertung erfolgte durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München: Die Tupfer wurden mit einem Tropfen (20 µl) steriler PBS-Lösung angefeuchtet. Anschließend wurden davon auf Columbia-Blut-Agar- und Schaedler-Agar-Platten Ausstriche angefertigt. Der Tupfer wurde danach in Thioglycolat-Nährbouillon eingetaucht. Alle drei Medien wurden für 48 Stunden unter folgenden Bedingungen inkubiert:

- Columbia-Blut-Agar (BD): 37 °C
- Schaedler-Agar (BD): 37 °C unter anaeroben Bedingungen
- Thioglycollate-Nährbouillon (hauseigene Herstellung): 37 °C

Nach der Kultivierung erfolgte die Keimidentifizierung nach gängigen Labortstandards. Die *S. aureus*-Isolate wurden mit Katalase- und Koagulase-Tests bestimmt. Wo diese nicht eindeutig waren, wurde MALDI-TOF-Massenspektrometrie verwendet (MALDITOF, Bruker Corporation, Billerica, U.S).

4.1.2.7.2 Ermittlung der Lebendkeimzahl mit Keimablösung vom Implantat

Nach dem Ausdrehen wird das Implantat kurz in PBS gewaschen und anschließend zu 1 ml 0,25 %-iger Trypsinlösung in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Dieses wird 10 Sekunden gevortext und anschließend bei maximaler Energie und 35 °C Wassertemperatur für 5 Minuten im Ultraschallbad (Sonorex RK255H, Bandelin, Berlin, Deutschland) untergetaucht. Nach erneutem 10-sekündigen Vortexen werden jeweils 100 µl der Lösung in zehn Verdünnungsstufen jeweils in Doubletten auf Columbia Blutagarplatten mit 5 % Schafsblut ausplattiert und anschließend für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Pro Implantat werden also $2 \times 10 = 20$ Proben angefertigt. Durch das Auszählen und Rückrechnen der Verdünnung wird die Anzahl der lebenden Bakterien auf dem Implantat bestimmt. Das Zählen der Kolonien auf den Blutagarplatten erfolgte mit Hilfe von ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

4.1.2.7.3 Ermittlung der Lebendkeimzahl mit Keimablösung vom Schraubenlager

Der Knochen wird kurz in PBS gewaschen und zu 10 ml 0,25 %-iger Trypsinlösung in ein 50 ml Falcon gegeben. Die weitere Untersuchung mit Vortexen, Sonikation, Vortexen, doppeltem Ausplattieren in zehn Verdünnungsstufen, Inkubation, Auszählen und Rückrechnung erfolgt analog zu den Implantaten. Pro Tibia werden also ebenso 20 Proben angefertigt und untersucht.

4.1.2.7.4 Zelluläre Blutuntersuchung

Präoperativ am Tag 1 und postmortal am Tag 42, dem Tag der Euthanasie wurde den Tieren venöses Blut zur Untersuchung der Zellzahlen von Erythrozyten, Leukozyten und Blutplättchen entnommen.

4.1.2.7.5 Statistik

Die statistischen Tests wurden durchgeführt mit SPSS (IBM SPSS Statistics 20.0, Chicago, Illinois). Bei einem p-Wert < 0,05 wurde statistische Signifikanz angenommen. Zur Berechnung wurden folgende parameterfreie statistische Tests nach Abschlusstestprinzip verwendet: Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test und Wilcoxon-Test.

Alle Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD).

4.2 Biokompatibilität von Ca(OH)_2 - und Silber-dotiert beschichteten Implantaten an der Rattentibia

4.2.1 Material

4.2.1.1 Implantat

Als Implantate finden auch hier speziell angefertigte und entsprechend der Versuchsgruppen beschichtete Schrauben Verwendung. Jeweils 12 Schrauben sind beschichtet mit Hydroxylapatit (HA), Hydroxylapatit und Silber (HA-Ag) oder Hydroxylapatit und Calciumhydroxid (HA-Ca(OH)_2). Es werden also gesamt 36 Implantate untersucht.

Die Beschaffenheit der Schrauben ist wie im Vorversuch.

Die HA-Ca(OH)_2 -Beschichtung der Implantate erfolgte durch Galvanisieren. Die hierbei im Calcium-Ionen enthaltenden Bad elektrochemisch abgeschiedene Schicht erreichte eine Schichtdicke von etwa 20 μm .

4.2.1.2 Instrumentarium

Das Instrumentarium entspricht dem des Vorversuchs.

4.2.1.3 Versuchstiere

Für diese Versuche finden männliche Wistar Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) in einem Alter von fünf Monaten und mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 388,4 g (zwischen 343 g und 411 g) Verwendung. Um Wechselwirkungen der verschiedenen Beschichtungen innerhalb eines Tieres zu vermeiden und systemische Infektparameter adressierbar zu machen für einen Beschichtungstyp, werden unterschiedlich beschichtete Implantate nur in unterschiedliche Tiere eingebracht. Dazu wird jeweils die linke Tibia betrachtet.

Tabelle 6: Gruppeneinteilung mit Anzahl

	HA	HA-Ag	HA- Ca(OH)_2
Anzahl der Tiere	12	12	12

Die sonstigen Bedingungen entsprechen denen des Vorversuchs.

4.2.1.4 Sterile Medien

Es werden die gleichen sterilen Flüssigkeiten wie im Vorversuch verwendet.

4.2.1.5 Photometer und Ultraschallbad

Die Geräte sind die gleichen wie im Vorversuch: Eppendorf BioPhotometer 6131 und Bandelin Sonorex RK255H.

4.2.2 Methoden

4.2.2.1 Beimpfungsvolumen

Das Beimpfungsvolumen entspricht mit 10 μl dem des Vorversuchs.

4.2.2.2 Implantation

Die Implantation der Schrauben erfolgt entsprechend des Vorversuchs. Es erfolgt die sterile Injektion von 10 μl steriler PBS-Lösung in der linken Tibia und der Verschluss durch das Implantat.

4.2.2.3 Euthanasie und Operative Entnahme der Proben

Die Entnahme der Tibia erfolgt analog der Inokulation unter sterilen OP-Bedingungen wie im Vorversuch.

4.2.2.4 Röntgen

Wie im Vorversuch werden Röntgenbilder in zwei Ebenen angefertigt und in Hinblick auf die drei vorbeschriebenen *regions of interest* der radiologische Osseointegrationsscore erfasst.

4.2.2.5 Semi-quantitative Beurteilung des Drehmoments

Das Ausdrehen der Schraube erfolgt ebenso mit dem zur Implantation verwendeten Material unter Erfassung des Drehmoments mit dem im Vorversuch evaluierten Score.

4.2.2.6 Mikrobiologische Untersuchung der Proben

Noch vor Ausdrehen der Implantate werden wie im Vorversuche Abstrich von Subkutangewebe und Implantationsstelle genommen. Die Ermittlung der Lebendkeimzahl mit Keimablösung von Implantat und Schraubenlager erfolgt analog zum Vorversuch. Hierbei ist strikt auf sterile Bedingungen zu achten um etwaige Kontaminationen zu vermeiden.

4.2.2.7 Zelluläre Blutuntersuchung

Die labortechnische Blutuntersuchung an Tag 1 unmittelbar präoperativ und Tag 42 entspricht der des Vorversuchs.

5 Ergebnisse

5.1 Metaphysäres PPI-Modell an der Rattentibia

5.1.1 Klinische Beurteilung

Präoperativ zeigten sich alle Tiere gesund und beschwerdefrei. Auch postoperativ erholten sich die Tiere schnell. Es zeigten sich nach keiner Operation lokale Wundinfektionen. Alle Wunden heilten schnell ab und zeigten sich trocken und reizlos. Im Laufe der sechs Wochen verzeichneten alle Gruppen einen durchschnittlichen Gewichtszuwachs. Hinsichtlich der Gewichtszunahme besteht keine statistische Signifikanz zwischen den beiden Gruppen verschiedener Inokulationskonzentration: 10²-KBE-Gruppe: 30 ± 11 g; 10³-KBE-Gruppe: 23 ± 17 g

5.1.2 Labortechnische Blutuntersuchung

Die Konzentration der Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC) und Blutplättchen (PLT) zeigte postmortal gegenüber den präoperativen Werten keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8). Auch zwischen den Gruppen (I HA und II HA-Ag) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Veränderung der Erythrozyten-Konzentration.

Tabelle 7: Konzentrationen von Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) im Blut am OP-Tag (Tag 0) und Explantations-Tag (Tag 42) dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung in der Gruppe I (HA)

Parameter	Gruppe IA (10 ² KBE)		Gruppe IB (10 ³ KBE)	
	Tag 0	Tag 42	Tag 0	Tag 42
WBC [*10 ³ /l]	9,23±1,98	7,53±1,97	9,33±3,71	6,05±1,80
RBC [*10 ⁶ /l]	8,27±0,76	8,64±0,95	7,13±2,40	8,55±1,08
PLT [*10 ³ /l]	834,5±189,25	628,33±237,56	717,83±406,97	599,83±528,47

Tabelle 8: Konzentrationen von Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) im Blut am OP-Tag (Tag 0) und Explantations-Tag (Tag 42) dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung in der Gruppe II (HA-Ag)

Parameter	Gruppe IIA (10 ² KBE)		Gruppe IIB (10 ³ KBE)	
	Tag 0	Tag 42	Tag 0	Tag 42
WBC [*10 ³ /l]	9,07±1,98	7,87±3,22	9,62±2,62	8,57±3,59
RBC [*10 ⁶ /l]	8,21±1,41	8,38±0,67	8,19±1,29	6,34±5,66
PLT [*10 ³ /l]	912,17±135,77	649,00±321,04	763,33±290,16	751,50±343,20

5.1.3 Mikrobiologische Untersuchungen

5.1.3.1 OP-Tag (Tag 0)

Die Auszählung der Ausstriche der Aliquots jeder inokulierten Bakteriensuspension zeigte für die Gruppe A eine Durchschnittskonzentration von $1,43 \cdot 10^2 \pm 16,1$ KBE/ μ l (Ziel 10^2 KBE/ μ l) und für die Gruppe B $0,89 \cdot 10^3 \pm 40,5$ KBE/ μ l (Ziel 10^3 KBE/ μ l). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist statistisch signifikant.

5.1.3.2 Explantations-Tag (Tag 42)

Die Untersuchung der Abstriche aus dem Subkutangewebe der rechten Tibiae ergab in 20 % einen positiven Bakteriennachweis für *S. aureus*. In 50 % aller Abstriche der Implantationsstelle vor Explantation konnte ebenso *S. aureus* nachgewiesen werden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Anzahl *S. aureus* positiver Abstriche subkutan und am Implantat vor der Explantation nach Subgruppen (jeweils n=6)

	Gruppe IA (10^2 KBE, HA)	Gruppe IB (10^3 KBE, HA)	Gruppe IIA (10^2 KBE, HA-Ag)	Gruppe IIB (10^3 KBE, HA-Ag)
Subkutangewebe	1	1	2	1
Implantationsstelle	2	3	3	4

Die mikrobiologische Untersuchung des Schraubenlagers und der Implantate zeigte in 100 % der rechten Tibiae einen positiven Keimnachweis (Tabelle 10). Mithilfe von Koagulase- und Katalase-Tests konnte *S. aureus* als Bakterium identifiziert werden. Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie zeigte, dass es sich um den gleichen Bakterienstamm handelt, der auch inokuliert wurde (ATCC25923).

Tabelle 10: Anzahl *S. aureus* positiver Kulturen nach Explantation an Implantat und Schraubenlager nach Subgruppen (jeweils n=6)

	Gruppe IA (10^2 KBE, HA)	Gruppe IB (10^3 KBE, HA)	Gruppe IIA (10^2 KBE, HA-Ag)	Gruppe IIB (10^3 KBE, HA-Ag)
Implantat	6	6	6	6
Schraubenlager	6	6	6	6

Nach Keimablösung konnte in allen Subgruppen eine signifikant höhere Lebendkeimzahl auf dem Implantat ermittelt werden als im knöchernen Schraubenlager. Zudem war die Bakterienmenge größer als die des Inokulums (Tabelle 11).

Im Schraubenlager zeigte die Gruppe IIB die höchste Bakterienkonzentration, gefolgt von den Gruppen IIA, IA und IB. Die HA-Ag-Gruppen zeigten im Vergleich zu den entsprechenden HA-Gruppen keine einheitlich höhere oder niedrigere Bakterienmenge. Eine Korrelation der Inokulum-Konzentration der Gruppen A und B mit der Bakterienmenge zur Explantation kann nicht hergestellt werden.

Die p-Werte für den Vergleich der Bakterienkonzentrationen von Inokulum zu Implantat sind in allen Subgruppen jedoch $<0,05$. Damit werden die Unterschiede als statistisch signifikant betrachtet. Gleiches gilt für den Vergleich der Keimkonzentration auf dem Implantat mit der im Schraubenlager.

Tabelle 11: Bakterienmenge in KBE als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

	Gruppe IA (10 ² KBE, HA)	Gruppe IB (10 ³ KBE, HA)	Gruppe IIA (10 ² KBE, HA-Ag)	Gruppe IIB (10 ³ KBE, HA-Ag)
Inokulum	1,16×10 ² ± 0,75×10 ²	0,97×10 ³ ± 0,221×10 ³	1,71×10 ² ± 0,52×10 ²	0,83×10 ³ ± 0,278×10 ³
Implantat	116,1×10 ³ ± 112×10 ³	302,2×10 ³ ± 298×10 ³	392,2×10 ³ ± 641×10 ³	119,3×10 ³ ± 161×10 ³
Schraubenlager	21,5×10 ³ ± 29,3×10 ³	8,2×10 ³ ± 3,9×10 ³	30,2×10 ³ ± 38,3×10 ³	60,9×10 ³ ± 55,1×10 ³
p-Wert Inokulum vs. Implantat	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
p-Wert Implantat vs. Schraubenlager	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Hinsichtlich der linken Tibia waren alle Wundabstriche sowohl im Subkutangewebe als auch auf der Implantationsstelle negativ. Auch auf den Implantaten und in den Schraubenlagern der linken Tibiae konnte kein Keim nachgewiesen werden.

5.1.4 Postmortale radiologische Bildgebung

Die Röntgenbilder aller infizierten Tibiae enthielten Zeichen von Knochenschäden. Dieser Nachweis gelang in den ROI 1 (Epiphyse) und 2 (Metaphyse mit Implantat), jedoch nie in ROI 3 (proximale Diaphyse). Osteolysen, Weichteilschwellungen und Implantatlockerung waren die häufigsten Zeichen. Sequesterbildungen und Periostale Reaktionen konnten nie nachgewiesen werden.

Die radiologische Bildgebung der linken Tibiae zeigt hingegen in keinem Fall Osteolysen, Weichteilschwellungen, Sequesterbildungen, Periostanhebungen oder Implantatlockerungen am Tag der Euthanasie. Auf den Röntgenbildern konnte somit kein Hinweis auf eine Osteomyelitis gestellt werden. Alle Implantate der nicht infizierten Seiten behielten ihren festen Sitz in der Tibiametaphyse bei. (Abbildung 6, Tabelle 12)



Abbildung 6: a-p-Röntgen der Tibiae nach Implantation (d=0) und postmortal (d=42). Die weißen Linien trennen die ROIs. A) und B) zeigen die rechte Tibia, die postmortal eine Implantatlockerung aufweist. C) zeigt Osteolysen und D) keine Osteomyelitis-Zeichen.

5.1.5 Semi-quantitative Beurteilung der Osseointegration anhand des Drehmoments

Die Schrauben der linken Tibiae zeigten durchweg sehr gute Osseointegrations-Ergebnisse. Hinsichtlich des Widerstands zum Ausdrehen erreichten alle linken Implantate die höchsten Werte: 4 oder 5 Punkte. Im gesamten Osseointegrationsscore rangieren die linken Implantate zwischen 8 und 10 Punkten

Beim Ausdrehen der Schrauben aus den rechten Tibiae war generell ein geringerer Kraftaufwand erforderlich, sodass die rechten Implantate auf dem Osseointegrations-Score Werte zwischen 4 und 6 einnehmen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen verschiedener Seiten sind statistisch signifikant. (Tabelle 12 und Tabelle 13)

Tabelle 12: Ergebnisse des Radiologischen und Osseointegrations-Scores als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung in der Gruppe I (HA)

	IA (HA)		IB (HA)	
	Links	Rechts	Links	Rechts
KBE	0	10 ²	0	10 ³
Radiologischer Score	0 $\pm$ 0	16,5 $\pm$ 6,4	0 $\pm$ 0	15 $\pm$ 5
Osseointegrations-Score	8,7 $\pm$ 0,5	5 $\pm$ 0,5	9,7 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,5

Tabelle 13: Ergebnisse des Radiologischen und Osseointegrations-Scores als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung in der Gruppe II (HA-Ag)

	IIA (HA-Ag)		IIB (HA-Ag)	
	Links	Rechts	Links	Rechts
KBE	0	10 ²	0	10 ³
Radiologischer Score	0 $\pm$ 0	15,8 $\pm$ 4,8	0 $\pm$ 0	16,5 $\pm$ 3,3
Osseointegrations-Score	9,3 $\pm$ 0,5	5,3 $\pm$ 0,5	9 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,4

5.2 Biokompatibilität von Ca(OH)₂- und Silber-dotiert beschichteten Implantaten an der Rattentibia

5.2.1 Klinische Beurteilung

Präoperativ zeigten sich alle Tiere gesund und beschwerdefrei. Auch postoperativ erholten sich die Tiere schnell. Es zeigte sich nach keiner Operation eine lokale Wundinfektion. Alle Wunden heilten schnell ab und zeigten sich trocken und reizlos. Im Laufe der sechs Wochen verzeichneten alle Gruppen einen durchschnittlichen Gewichtszuwachs: HA-Gruppe 32 $\pm$ 11 g; HA-Ag-Gruppe 29 $\pm$ 17 g; Ca(OH)₂-Gruppe 37 $\pm$ 15 g.

5.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen

Nach Explantation konnte weder im knöchernen Schraubenlager noch an den Implantaten ein bakterieller Keim nachgewiesen werden. Lediglich zwei tibiale Subkutanabstriche ergaben ein bakterielles Wachstum: *Staphylococcus epidermidis* und *Micrococcus luteus*. Beide Erreger sind auf Kontaminationen zurückzuführen.

5.2.3 Postmortale radiologische Bildgebung

Keines der Röntgenbilder zeigt Osteolysen, Periostanhebungen oder Implantatlockerungen am Tag der Euthanasie. Alle Implantate behielten ihren festen Sitz in der Tibiametaphyse bei.

5.2.4 Semi-quantitative Beurteilung der Osseointegration anhand des Drehmoments

Sowohl hinsichtlich des Widerstands zum Ausdrehen der Schrauben als auch hinsichtlich der noch anhaftenden Knochenstücke am Implantat ergab sich zwischen den Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied, sodass auch der Osseointegrations-Score keinen Unterschied zwischen den Beschichtungen hervorbrachte. Die hohen Werte beim Ausdrehwiderstand zeigen, dass beim Entfernen der Implantate in der überwiegenden Anzahl der Knochen frakturierte.

Tabelle 14: Scores zur Beurteilung der Osseointegration als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

	HA-Gruppe	HA-Ag-Gruppe	Ca(OH) ₂ -Gruppe
Radiologischer Score (0 - 48)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Ausdrehwiderstand (1 - 5)	4,6 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,5
Knochenrückstände (1 - 5)	2,7 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 0,9	2,0 $\pm$ 0,9

6 Diskussion

6.1 Metaphysäres PPI-Modell an der Rattentibia

6.1.1 Auswahl des Referenzkeims

Der Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 besitzt als internationaler Referenzkeim gut untersuchte Eigenschaften und ermöglicht aufgrund zahlreicher Verwendung eine gute Vergleichbarkeit (Haenle et al., 2013; Jüssen, 2015; Vetter, 2013).

6.1.2 Bestimmung der Lebendkeimzahl im Schraubenlager

Der Keimzahlbestimmung auf dem Implantat wurde eine höhere Wertigkeit beigemessen. Dennoch wird hier im Gegensatz zu anderen Arbeiten zusätzlich die Anzahl der Bakterien in der Tibia bestimmt, da dies der physiologischen Belastung mehr entspricht.

6.1.3 Modelllokalisierung

Viele Tiermodelle für periprotetische Infektionen weisen wesentliche Limitationen auf:

Zahlreiche Versuche beschränken sich auf Marknägel und diaphysäre Osteosynthese-Platten (Arens et al., 1999), welche in der Unfallchirurgie breite Anwendung finden. Deren Ergebnisse lassen sich jedoch nicht auf die Bedürfnisse der Gelenkprothesen-Orthopädie übertragen. Ein Großteil der Knochenimplantate und Gelenkprothesen wird dort in der Metaphyse befestigt. Die Lokalisation der PPI am metaphysären Knochen stellt also einen wesentlichen Unterschied dar. In Versuchen am Tiermodell Ratte wurde diese Stelle bisher nur selten verwendet (Haenle et al., 2013; Lucke et al., 2003b; Lucke et al., 2005).

6.1.4 Keimkonzentration

Weiterhin unterscheidet sich die Bakterienlast vieler Versuchsmodelle wesentlich von der in der klinischen Umgebung. In Versuchsmodellen wird gerne eine hohe Keimkonzentration gewählt um zuverlässig eine Infektion auszulösen (Arens et al., 1999; Haenle et al., 2013; Lucke et al., 2003a; Lucke et al., 2003b; Monzon et al., 2001; Soe et al., 2013; Svensson et al., 2013). Klinisch wird jedoch eine möglichst sterile Umgebung angestrebt, sodass grenzwertige Belastungen, die die Schwelle zur Infektionsfähigkeit gerade so überschreiten, für Versuchsmodelle besonders interessant sind.

6.1.5 Beurteilung der Osseointegration

Zudem gibt es nur wenige Versuchsmodelle, die eine einfache Untersuchung der Osseointegration erlauben (Stadelmann et al., 2015).

Gegenstand dieser Arbeit im ersten Teil war somit ein Tiermodell zu etablieren, dass diese Einschränkungen umgeht, klinisch übertragbare Ergebnisse liefert und eine einfache Bewertung der Osseointegration zulässt. Zudem wird der antibakterielle Infekt niedrigdosiert beschichteter Implantate untersucht.

6.1.6 Implantatbeschaffenheit

Die Form des Implantats selbst erfüllt bereits einige wichtige Kriterien: Die konische Form mit einem Durchmesser an der Oberseite größer als der des Bohrlochs lehnt sich an die „Press-Fit“-Einpassung an, die bei zementfreien Implantaten gewöhnlich benutzt wird. Das Gewinde der Schraube erlaubt zudem von Beginn an einen sicheren Sitz. Auf Knochenwachs, Dentalgips, Gewebekleber oder PMMA wie in anderen Modellen zur Abdichtung der Keimhöhle verwendet kann hier somit verzichtet werden

(Haenle et al., 2013; Solberg et al., 1999; Spagnolo et al., 1993). Damit wird auch die Beeinflussung der Versuche durch andere Fremdstoffe umgangen.

Bei Kirschner-Drähten oder hohlen Implantaten ist eine Keimverschleppung durch Blutung aus dem Knochen ein wesentliches Problem. Die eingebrachte Bakterienmenge befindet sich dann in einem nicht genau definierten Raum. Im Gegensatz zu anderen Autoren wird deshalb hier bewusst ein geschlossenes Implantat verwendet (Haenle et al., 2013). Damit wird auch die für das körpereigene Immunsystem schlecht erreichbare innere Oberfläche eliminiert. Zudem ermöglicht das Setting einer Schraube die Evaluation des Drehmoments zum Entfernen der Schraube und macht es so weiteren Untersuchungen der Biomechanik zugänglich.

6.1.7 Zuverlässige Infektprovokation

In den hier durchgeführten Versuchen konnte bei allen Tieren eine Infektion hervorgerufen werden, sowohl bei einer Inokulation von wenig Keimen (10^2 KBE) als auch von 10^3 KBE. Autoren, die größere Bakterienmengen verwenden, sichern sich nicht nur eine hohe Infektionsrate, sondern damit auch einen gleichmäßigeren Verlauf, was den Vergleich zwischen den Gruppen und die statistische Auswertung vereinfacht. Der große Nachteil dabei ist jedoch, dass man hier nicht die üblichen klinischen Umstände imitiert. Selbst bei Revisions-Operationen wird eine sterile Umgebung vorausgesetzt und deshalb zuerst eine Eradikation des zur PPI führenden Keims erfordert.

Der hier entwickelte Ansatz kann auch mit der niedrigen Bakteriendosis zuverlässig eine Infektion auslösen, wofür es mehrere Gründe geben mag:

1. Der Mechanismus der Schraube ermöglicht eine Versiegelung der Keimhöhle, sodass eine definierte Menge von Bakterien in einem definierten Raum bleibt.
2. Der hier verwendete *S. aureus*-Stamm ATCC25923 scheint für Infektmodelle besonders gut geeignet zu sein. Andere Autoren erzielen mit anderen Stämmen geringere Infektraten (Kose et al., 2013; Lucke et al., 2005; Stadelmann et al., 2015; Svensson et al., 2013).
3. Das strikte Vermeiden des präoperativen Einfrierens der Keime erlaubt die Inokulation von möglichst vielen vitalen Bakterien. Befinden sich die Bakterien in der Phase des maximalen Wachstums wird die Infektion zuverlässiger ausgelöst als bei inaktiven Bakterien, die durch das körpereigene Immunsystem schneller bekämpft werden.

Ein weiteres Ergebnis der Versuche ist, dass in allen infizierten Tibiae durchwegs auf Implantat und im Knochenlager Keime nachgewiesen werden konnten. Dabei ist die Keimmenge ausnahmslos mindestens eine Größenordnung höher als das Inokulum, jedoch ohne Korrelation. Ersteres Ergebnis kann von Haenle unterstützt werden: Bei allen Tieren existiert eine ähnliche Nährstoffversorgung und die körpereigene Abwehr der Tiere ist weitgehend ähnlich. Somit entstehen kongruente Infektionsumgebungen. Vergleichbar zu einem Low-Grade-Infekt wird eine lokale Infektion unterhalten, die keine systemischen Krankheitserscheinungen hervorruft, jedoch eine gleichmäßige Bakterienpopulation führt (Haenle et al., 2013). Anscheinend stellt sich das Äquilibrium der konstanten Bakterienpopulation früher auf dem Implantat als im Knochenlager ein. Im Gegensatz dazu fand Lucke eine Korrelation der postmortalen Keimmenge zur Inokulationsmenge (Lucke et al., 2003b).

6.1.8 Radiologische Bildgebung

Die radiologische Bildgebung konnte nur teilweise die mikrobiologischen Befunde untermauern. Gemeinhin ist bekannt, dass Röntgenbilder ungeeignet sind, um zuverlässig Frühstadien von Infektionen oder Low-Grade-Infekte nachzuweisen (Haenle et al., 2013; Kaiser et al., 1998; Widmer,

2001). Bei hohen Bakterienmengen gewinnen Röntgenbilder jedoch wieder an Sensitivität (Akiyama et al., 2013; Lucke et al., 2005). Besonders interessant für Kleintiermodelle ist die Verwendung eines microCT, das über eine hohe Sensitivität für Osteolysen bei PPI verfügt (Stadelmann et al., 2015).

6.1.9 Silber-dotierte HA-Beschichtung

Im gleichen Versuch wurde niedrig dosiertes Silber in der Hydroxylapatit-Beschichtung in vivo als antibakterielles Agens getestet. Schon bei Konzentrationen von 35 ppb soll Silber bakterizid wirksam sein (Tweden et al., 1997). Mit 45 ppb in den für die Versuche angefertigten Implantaten wurde ebenso eine vergleichbar geringe Konzentration gewählt. In ähnlich dosierter Anwendung zeigen in-vivo Versuche über kurze Zeit eine stark bakterizide Wirkung (Braissant et al., 2015). Andererseits scheint die Übertragung der Ergebnisse von in-vitro- auf in-vivo-Versuche nicht so einfach möglich zu sein, sodass es hier teils widersprüchliche Ergebnisse gibt (Cavanaugh et al., 2016). Hochkonzentrierte oder reine Silberbeschichtungen werden aufgrund ihrer Zytotoxizität in-vivo nur selten im direkten Knochenkontakt angewandt (Gosheger et al., 2004; Harrasser et al., 2015). Um eine gute Osseointegration zu gewährleisten wurde Silber niedrigdosiert in die Hydroxylapatit-Beschichtung eingebracht, um sich der Biokompatibilität des HA zu bedienen.

Der bakterizide Effekt von niedrigdosiertem Silber gegenüber einer üblichen HA-Beschichtung konnte in den durchgeführten Versuchen nicht nachgewiesen werden. Die Osseointegration war jedoch hervorragend: Alle Schrauben der sterilen Tibiae aus HA- und HA-Ag-Gruppe waren fest eingewachsen. Im radiologischen Score und dem Osseointegrations-Score wiesen beide Gruppen sehr gute Werte auf (Tabelle 12).

Das Einwachsverhalten beider Gruppen nach sechs Wochen gleicht soweit dem von Titan-Implantaten beschriebenem (Schulte et al., 2011). Die radiologischen Untersuchungen zeigen in beiden Gruppen die gleiche Osseointegration (Tabelle 12). Gestützt wird dieses Ergebnis semi-quantitativ anhand des Drehmoments zum Ausdrehen der Implantate.

6.1.10 Limitationen

Für die Versuche mussten mehrere Einschränkungen hingenommen werden: Es wurde durchweg nur ein Bakterienstamm zum Testen der antimikrobiellen Wirksamkeit verwendet. Obgleich *Staphylococcus aureus* der häufigste Erreger periprotetischer Infektionen ist, lässt sich klinisch in 75 % der Fälle ein anderes Pathogen nachweisen (Tabelle 1). Jedes potentielle Pathogen primär auf jeder Beschichtung zu testen ist jedoch offensichtlich unpraktikabel.

Weiterhin ist der Beobachtungszeitraum bei allen Versuchen gleich gewählt, sodass unklar bleibt, ob sich aus dem scheinbaren Steady-State im Low-Grade-Infekt in langer Hinsicht nicht doch eine Sepsis entwickelt hätte. Jedoch korreliert die Dauer der Versuche gut mit der anderer Autoren zu PPI am Tiermodell, sodass in dieser Hinsicht die beste Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet wird.

Schlussendlich erfolgte die Beurteilung des Drehmoments zum Entfernen der Schraube aus dem Knochen lediglich semi-quantitativ. Weil eine quantitative Messung, bspw. als Implantatsstabilitätsquotient per nicht invasiver Resonanzfrequenzanalyse aufwändig zu bewerkstelligen ist, wurde bei der geringen Fallzahl darauf verzichtet. Ein Rückschluss der biomechanischen Messung auf die Osseointegration ist damit nicht immer zulässig (Rocci et al., 2003; Sul et al., 2002).

Für zukünftige Versuche, die schwerpunktmäßig die Osseointegration untersuchen ist das hier verwendete Implantatmodell jedoch besonders geeignet, da es über eine rotationsstabile Verbindungsmöglichkeit zu einem Drehmoment-Schraubendreher über das Innengewinde und die Nuten verfügt.

6.2 Biokompatibilität von Ca(OH)₂- und Silber-dotiert beschichteten Implantaten an der Rattentibia

Die umfangreiche Auswahlmöglichkeit moderner Implantatbeschichtungen zeigt, dass noch keine ideale Oberfläche für Implantate gefunden wurde, sondern weiterhin eine stetige Gratwanderung zwischen optimaler Osseointegration und antiinfektiver, insbesondere antibakterieller Wirksamkeit beschritten wird. Besonders wichtig wird dieser Konflikt bei der großen Gelenkendoprothetik: Große Wunden erfordern eine Implantat-Oberfläche die ein rasches Einwachsen und optimale Wundheilung zulassen. Andererseits besteht bei den großen Prothesen eine große Oberfläche die gleichzeitig möglicher Ausgangspunkt eines Biofilms sein kann. Daher diene diese Arbeit nicht nur dem Etablieren eines geeigneten Infektmodells, sondern auch einer Methode zur Untersuchung der Osseointegration und unterdessen dem Vergleich einer herkömmlichen, gut bekannten biokompatiblen Oberflächenbeschichtung (Hydroxylapatit) mit antiinfektiven Beschichtungen, die speziell für den direkten Knochenkontakt geschaffen wurden (silberdotiertes Hydroxylapatit und Calciumhydroxid).

6.2.1 Kontaminationsfreies Modell

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Modell geeignet ist, alle Implantate einzubringen ohne ein Implantat zu kontaminieren. Dadurch ist sichergestellt, dass der Osseointegrationsscore nicht durch etwaige bakterielle Kontaminationen verfälscht wird, sondern die tatsächliche Implantat-Knochen-Integration und damit die Schnittstelle zwischen Oberflächenbeschichtung und Knochenlager beurteilt.

Bemerkenswert ist die Abwesenheit von Infektionszeichen und bakterieller Besiedelung insbesondere in der Ca(OH)₂-Gruppe. Die antiinfektive Wirksamkeit (Kasaj et al., 2006) beruht hier auf der Bildung eines alkalischen Milieus (Kohal et al., 1997), die jedoch von vergleichsweise kurzer Dauer ist. So wird Ca(OH)₂ im Umfeld der Zahnmedizin üblicherweise in flüssiger Form im Rahmen von Zahnkanalsanierungen eingesetzt (Siqueira & Lopes, 1999). Die Verwendung in der Gelenkendoprothetik ist bisher nicht regelhaft. Eine Unterlegenheit der Beschichtung gegenüber HA und HA-Ag konnte hier jedoch nicht gezeigt werden.

6.2.2 Exzellente Osseointegration aller drei Beschichtungen

Darüber hinaus zeigte sich, dass die antiinfektiven Beschichtungen (silberdotiertes Hydroxylapatit und Calciumhydroxid) die gleichen Osseointegrationsscores erreichten wie die herkömmliche HA-Beschichtung, die als künstliche extrazelluläre Matrix den Defektraum stabilisiert und damit speziell die knocheneigene Neogenese stützt.

6.2.3 Substrat der drei Beschichtungen

Das metaphysäre, geschlossene, konische Implantat wie oben beschrieben eignete sich sehr gut für den Vergleich der verschiedenen Beschichtungen und ist auch der Realität in der Gelenkendoprothetik nah angelehnt. Entsprechend dem zunehmenden Wandel von Titan-Prothesen zu Prothesen aus Titan-Legierungen fand auch hier eine Titan-Legierung Anwendung. Diese bieten verbesserte mechanische Eigenschaften (Lavos-Valereto et al., 2001; Lee et al., 2012).

7 Zusammenfassung

Eine Schlüsselstelle zur Prävention periprotetischer Infektionen ist die antiinfektive Implantatbeschichtung. Die Beschichtung soll ein rasches Einwachsen ermöglichen, aber zugleich Pathogene abwehren. Zur in-vivo-Testung der Beschichtungen existiert bislang kein einheitliches, ideales Modell. Diese Arbeit etabliert ein Infektmodell an der Metaphyse der Rattentibia mit einem relevanten methicillinsensiblen *Staphylococcus aureus* Stamm mit Implantaten, die den klinischen Bedingungen besser ähneln. Hierbei wird eine übliche Hydroxylapatit-Beschichtung (HA) mit einer Silber-dotierten HA-Beschichtung (HA-Ag) verglichen.

Außerdem erfolgt im nicht infizierten Modell ein Vergleich der Biokompatibilität von HA, HA-Ag und Calciumhydroxid-Beschichtungen (Ca(OH)₂).

Die Versuche erbrachten im Wesentlichen folgende Ergebnisse:

1. Bereits geringe Bakterienmengen von 10^2 bis 10^3 KBE in eine durch ein schraubenförmiges Implantat verschlossene Knochenbohrung erbrachten zuverlässig eine lokale Infektion. Diese Bakterienmenge entspricht eher dem klinischen Umfeld als Mengen über 10^3 KBE.
2. HA, HA-Ag und Ca(OH)₂-beschichtete Implantate erbrachten ohne Infektion eine gute Osseointegration, was für eine gute Biokompatibilität der Beschichtungen spricht.
3. Durch niedrig dosierte HA-Ag-Beschichtungen konnte im infizierten Modell kein antibakterieller Effekt nachgewiesen werden.
4. Eine Peri-Implant-Infektion schwächt die Osseointegration.

Das hier entwickelte Tiermodell ist geeignet die Pathogenese periprotetischer Infektionen sowie entsprechende präventive und therapeutische Maßnahmen zu untersuchen und es bietet sich insbesondere an antiinfektive Beschichtungen in vivo zu testen.

8 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger von Eisenhart-Rothe, der es mir ermöglichte an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München die vorliegende Forschungsarbeit durchzuführen.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Rainer Burgkart bedanken, der stets mit vollem Einsatz die Geschicke der orthopädischen Forschung leitet, so auch dieses Projekt initiierte und begleitete und die wertvollen Kontakte vermitteln konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Norbert Harrasser, dem Betreuer meiner Promotion, für die unnachgiebige, herzliche, kompetente und engagierte Betreuung und das große Vertrauen mir gegenüber. Es scheint mir weiter wundersam, wie Patientenversorgung, Forschung und Lehre so geschickt in einer so sympathischen Person zusammenfinden. Besonders bedanken möchte ich mich auch für die äußerst raschen Antworten und kurzfristigen Korrekturen.

Sehr herzlich will ich mich bei Dr. rer. biol. hum. Andreas Obermeier, M.Sc. bedanken, der mir als Leiter der Arbeitsgruppe Implantat-assoziierte Infektforschung bei jeglichen Anliegen im Labor geduldig Aufmerksamkeit schenkte und stets behilflich war. Der respektvolle und freundliche Umgang machte die Arbeit in dem Team besonders angenehm.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. med. Susanne Feihl für die mikrobiologische Untersuchung der Abstriche im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. med. Hans Gollwitzer, der mich ursprünglich an die Arbeitsgruppe vermittelte und durch seine Vorerfahrung in dem Projekt häufig rasch weiterhalf.

Mein abschließender Dank gilt meinen Eltern sowie meiner Frau Johanna.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schraubenimplantat	10
Abbildung 2: Autoklavierbares Mehrweg-Instrumentarium (v.l.n.r.): Gewindeschneider, Schraubenaufnehmer mit Schraube, Bohrer, Gewindeformer, Aufnehmer, Tiefenmessgerät, Aufnehmer	11
Abbildung 3: Operatives Vorgehen (linke Tibia): (A) Hautschnitt an der anterolateralen Tibia, (B) Durch Spreizer sichtbarer Knochen der proximalen Tibia, (C) Bohrer in Tibia-Metaphyse, (D) eingeschraubtes Implantat, (E) mit 4-0 Prolene versorgte Hautnaht	14
Abbildung 4: Regions of interest im Röntgenbild: R1 Epiphyse, R2 Metaphyse mit Implantat und R3 proximale Diaphyse	16
Abbildung 5: Scoring der anhaftenden Knochenstücke anhand der prozentualen Oberflächenabdeckung (rot schraffiert)	18
Abbildung 6: a-p-Röntgen der Tibiae nach Implantation (d=0) und postmortal (d=42). Die weißen Linien trennen die ROIs. A) und B) zeigen die rechte Tibia, die postmortal eine Implantatlockerung aufweist. C) zeigt Osteolysen und D) keine Osteomyelitis-Zeichen.....	25

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erregerspektrum bei Gelenkinfektionen (Geipel & Herrmann, 2004)	8
Tabelle 2: Einteilung nach Beschichtung und Bakterienkonzentration in Subgruppen zu je sechs Tieren	12
Tabelle 3: Radiologischer Osseointegrations-Score (modifiziert nach An und Friedman).....	17
Tabelle 4: Widerstand zum Ausdrehen.....	17
Tabelle 5: Anhaftende Knochenstücke	18
Tabelle 6: Gruppeneinteilung mit Anzahl	20
Tabelle 7: Konzentrationen von Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) im Blut am OP-Tag (Tag 0) und Explantations-Tag (Tag 42) dargestellt als Mittelwert +- Standardabweichung in der Gruppe I (HA)	22
Tabelle 8: Konzentrationen von Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) im Blut am OP-Tag (Tag 0) und Explantations-Tag (Tag 42) dargestellt als Mittelwert +- Standardabweichung in der Gruppe II (HA-Ag).....	22
Tabelle 9: Anzahl S. aureus positiver Abstriche subkutan und am Implantat vor der Explantation nach Subgruppen (jeweils n=6)	23
Tabelle 10: Anzahl S. aureus positiver Kulturen nach Explantation an Implantat und Schraubenlager nach Subgruppen (jeweils n=6)	23
Tabelle 11: Bakterienmenge in KBE als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	24
Tabelle 12: Ergebnisse des Radiologischen und Osseointegrations-Scores als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung in der Gruppe I (HA).....	25
Tabelle 13: Ergebnisse des Radiologischen und Osseointegrations-Scores als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung in der Gruppe II (HA-AG)	26
Tabelle 14: Scores zur Beurteilung der Osseointegration als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	26

11 Literaturverzeichnis

- Akiyama, T., Miyamoto, H., Yonekura, Y., Tsukamoto, M., Ando, Y., Noda, I., Sonohata, M., & Mawatari, M. (2013). Silver oxide-containing hydroxyapatite coating has in vivo antibacterial activity in the rat tibia. *J Orthop Res*, 31(8), 1195-1200. <https://doi.org/10.1002/jor.22357>
- An, Y. H., & Friedman, R. J. (1998). Animal models of orthopedic implant infection. *J Invest Surg*, 11(2), 139-146.
- Arens, S., Kraft, C., Schlegel, U., Printzen, G., Perren, S. M., & Hansis, M. (1999). Susceptibility to local infection in biological internal fixation. Experimental study of open vs minimally invasive plate osteosynthesis in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg*, 119(1-2), 82-85.
- Braissant, O., Chavanne, P., de Wild, M., Piles, U., Stevanovic, S., Schumacher, R., Straumann, L., Wirz, D., Gruner, P., & Bachmann, A. (2015). Novel microcalorimetric assay for antibacterial activity of implant coatings: The cases of silver-doped hydroxyapatite and calcium hydroxide. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 103(6), 1161-1167.
- Cavanaugh, D. L., Tan, Z., Norris IV, J. P., Hardee, A., Weinhold, P. S., Dahners, L. E., Orndorff, P. E., & Shirwaiker, R. A. (2016). Evaluation of silver-titanium implants activated by low intensity direct current for orthopedic infection control: An in vitro and in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(5), 1023-1031.
- Darouiche, R. O. (2004). Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med*, 350(14), 1422-1429. <https://doi.org/10.1056/NEJMra035415>
- de Wild, M., Schumacher, R., Mayer, K., Schkommodau, E., Thoma, D., Bredell, M., Kruse Gujer, A., Gratz, K. W., & Weber, F. E. (2013). Bone regeneration by the osteoconductivity of porous titanium implants manufactured by selective laser melting: a histological and micro computed tomography study in the rabbit. *Tissue Eng Part A*, 19(23-24), 2645-2654. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2012.0753>
- Del Pozo, J. L. (2018). Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 16(1), 51-65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>
- Geipel, U., & Herrmann, M. (2004). [The infected implant. Part 1: bacteriology]. *Orthopade*, 33(12), 1411-1426; 1427-1418. <https://doi.org/10.1007/s00132-004-0741-1> (Das infizierte Implantat. Teil 1. Bakteriologie.)
- Gosheger, G., Harges, J., Ahrens, H., Streitburger, A., Buerger, H., Erren, M., Günsel, A., Kemper, F. H., Winkelmann, W., & Von Eiff, C. (2004). Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model-an analysis of the infection rate and toxicological side effects. *Biomaterials*, 25(24), 5547-5556. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.008>
- Gundtoft, P. H., Overgaard, S., Schønheyder, H. C., Møller, J. K., Kjærsgaard-Andersen, P., & Pedersen, A. B. (2015). The "true" incidence of surgically treated deep prosthetic joint infection after 32,896 primary total hip arthroplasties: a prospective cohort study. *Acta Orthop*, 86(3), 326-334. <https://doi.org/10.3109/17453674.2015.1011983>
- Gundtoft, P. H., Pedersen, A. B., Varnum, C., & Overgaard, S. (2017). Increased Mortality After Prosthetic Joint Infection in Primary THA. *Clin Orthop Relat Res*, 475(11), 2623-2631. <https://doi.org/10.1007/s11999-017-5289-6>
- Haenle, M., Zietz, C., Lindner, T., Arndt, K., Vetter, A., Mittelmeier, W., Podbielski, A., & Bader, R. (2013). A model of implant-associated infection in the tibial metaphysis of rats. *ScientificWorldJournal*, 2013, 481975. <https://doi.org/10.1155/2013/481975>
- Harges, J., Ahrens, H., Gebert, C., Streitbuerger, A., Buerger, H., Erren, M., Günsel, A., Wedemeyer, C., Saxler, G., Winkelmann, W., & Gosheger, G. (2007). Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans. *Biomaterials*, 28(18), 2869-2875. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.02.033>
- Harrasser, N., Jussen, S., Banke, I. J., Kmeth, R., von Eisenhart-Rothe, R., Stritzker, B., Gollwitzer, H., & Burgkart, R. (2015). Antibacterial efficacy of ultrahigh molecular weight polyethylene with

- silver containing diamond-like surface layers. *AMB Express*, 5(1), 64.
<https://doi.org/10.1186/s13568-015-0148-x>
- Hetrick, E. M., & Schoenfisch, M. H. (2006). Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem Soc Rev*, 35(9), 780-789. <https://doi.org/10.1039/b515219b>
- IQTIG. (2020). Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2019 Hüftendoprothesenversorgung. https://iqtig.org/downloads/auswertung/2019/hep/QSKH_HEP_2019_BUAW_V02_2020-07-14.pdf
- Jamsen, E., Furnes, O., Engesaeter, L. B., Konttinen, Y. T., Odgaard, A., Stefansdottir, A., & Lidgren, L. (2010). Prevention of deep infection in joint replacement surgery. *Acta Orthop*, 81(6), 660-666. <https://doi.org/10.3109/17453674.2010.537805>
- Jüssen, S. H. (2015). *Mikrobiologische Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit silberhaltiger, abriebbarer Oberflächenbeschichtungen aus amorphen Kohlenstoff (Diamond-like Carbon, DLC) auf Titan und Polyethylen für orthopädische Implantate*.
- Kaiser, S., Jorulf, H., & Hirsch, G. (1998). Clinical value of imaging techniques in childhood osteomyelitis. *Acta Radiol*, 39(5), 523-531.
- Kasaj, A., Willershausen, B., Berakdar, M., Tekyatan, H., & Sculean, A. (2006). Effect of an oily calcium hydroxide suspension on early wound healing after nonsurgical periodontal therapy. *Clin Oral Investig*, 10(1), 72-76. <https://doi.org/10.1007/s00784-005-0029-9>
- Kohal, R. J., Hürzeler, M. B., Schneider, S. R., Riede, U. N., & Caffesse, R. G. (1997). The effect of a calcium hydroxide paste on wound healing and osseointegration of dental implants. A pilot study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res*, 8(5), 375-385. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1997.080504.x>
- Kose, N., Otuzbir, A., Pekşen, C., Kiremitçi, A., & Doğan, A. (2013). A silver ion-doped calcium phosphate-based ceramic nanopowder-coated prosthesis increased infection resistance. *Clin Orthop Relat Res*, 471(8), 2532-2539. <https://doi.org/10.1007/s11999-013-2894-x>
- KRINKO. (2018). Prävention postoperativer Wundinfektionen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 2018(61), 448-473. <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2706-2>
- Lavos-Valereto, I. C., König, B., Rossa, C., Jr., Marcantonio, E., Jr., & Zavaglia, A. C. (2001). A study of histological responses from Ti-6Al-7Nb alloy dental implants with and without plasma-sprayed hydroxyapatite coating in dogs. *J Mater Sci Mater Med*, 12(3), 273-276. <https://doi.org/10.1023/a:1008975418453>
- Lee, B. S., Lin, Y. C., Chen, S. F., Chen, S. Y., & Chang, C. C. (2014). Influence of calcium hydroxide dressing and acid etching on the push-out bond strengths of three luting resins to root canal dentin. *Clin Oral Investig*, 18(2), 489-498. <https://doi.org/10.1007/s00784-013-0996-1>
- Lee, J., Hurson, S., Tadros, H., Schüpbach, P., Susin, C., & Wikesjö, U. M. (2012). Crestal remodelling and osseointegration at surface-modified commercially pure titanium and titanium alloy implants in a canine model. *J Clin Periodontol*, 39(8), 781-788. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01905.x>
- Lucke, M., Schmidmaier, G., Sadoni, S., Wildemann, B., Schiller, R., Haas, N. P., & Raschke, M. (2003a). Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone*, 32(5), 521-531. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(03\)00050-4](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(03)00050-4)
- Lucke, M., Schmidmaier, G., Sadoni, S., Wildemann, B., Schiller, R., Stemberger, A., Haas, N. P., & Raschke, M. (2003b). A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 67(1), 593-602. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.10051>
- Lucke, M., Wildemann, B., Sadoni, S., Surke, C., Schiller, R., Stemberger, A., Raschke, M., Haas, N. P., & Schmidmaier, G. (2005). Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone*, 36(5), 770-778. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.01.008>
- Monzon, M., Garcia-Alvarez, F., Lacleriga, A., Gracia, E., Leiva, J., Oteiza, C., & Amorena, B. (2001). A simple infection model using pre-colonized implants to reproduce rat chronic Staphylococcus

- aureus osteomyelitis and study antibiotic treatment. *J Orthop Res*, 19(5), 820-826.
[https://doi.org/10.1016/s0736-0266\(00\)00076-0](https://doi.org/10.1016/s0736-0266(00)00076-0)
- Otto-Lambertz, C., Yagdiran, A., Wallscheid, F., Eysel, P., & Jung, N. (2017). Periprothetische Infektionen beim Gelenkersatz. *Dtsch Arztebl International*, 114(20), 347-353.
<https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0347>
- Poelstra, K. A., Barekzi, N. A., Slunt, J. B., Schuler, T. C., & Grainger, D. W. (2000). Surgical irrigation with pooled human immunoglobulin G to reduce post-operative spinal implant infection. *Tissue Eng*, 6(4), 401-411. <https://doi.org/10.1089/107632700418100>
- Polat, H. B., Yeler, H., Gumus, C., Bulut, H. E., & Kucuk, D. (2009). Effect of oil-based calcium hydroxide (Osteoinductal) on distraction osteogenesis in rabbit mandible. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 107(6), e30-e36.
<https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.02.014>
- Rocci, A., Martignoni, M., Burgos, P. M., Gottlow, J., & Sennerby, L. (2003). Histology of retrieved immediately and early loaded oxidized implants: light microscopic observations after 5 to 9 months of loading in the posterior mandible. *Clinical implant dentistry and related research*, 5, 88-98.
- Schmidmaier, G., Lucke, M., Wildemann, B., Haas, N. P., & Raschke, M. (2006). Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury*, 37 Suppl 2, S105-112. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2006.04.016>
- Schulte, F. A., Lambers, F. M., Webster, D. J., Kuhn, G., & Müller, R. (2011). In vivo validation of a computational bone adaptation model using open-loop control and time-lapsed micro-computed tomography. *Bone*, 49(6), 1166-1172.
- Siqueira, J. F., Jr., & Lopes, H. P. (1999). Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*, 32(5), 361-369.
- Smeets, R., Precht, C., Hahn, M., Jung, O., Hartjen, P., Heiland, M., Grobe, A., Holthaus, M. G., & Hanken, H. (2017). Biocompatibility and Osseointegration of Titanium Implants with a Silver-Doped Polysiloxane Coating: An In Vivo Pig Model. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 32(6), 1338-1345. <https://doi.org/10.11607/jomi.5533>
- Snyder, R. J., Bohn, G., Hanft, J., Harkless, L., Kim, P., Lavery, L., Schultz, G., & Wolcott, R. (2017). Wound Biofilm: Current Perspectives and Strategies on Biofilm Disruption and Treatments. *Wounds*, 29(6), S1-s17.
- Soe, N. H., Jensen, N. V., Nurnberg, B. M., Jensen, A. L., Koch, J., Poulsen, S. S., Pier, G., & Johansen, H. K. (2013). A novel knee prosthesis model of implant-related osteomyelitis in rats. *Acta Orthop*, 84(1), 92-97. <https://doi.org/10.3109/17453674.2013.773121>
- Solberg, B. D., Gutow, A. P., & Baumgaertner, M. R. (1999). Efficacy of gentamycin-impregnated resorbable hydroxyapatite cement in treating osteomyelitis in a rat model. *Journal of orthopaedic trauma*, 13(2), 102-106.
- Spagnolo, N., Greco, F., Rossi, A., Ciolli, L., Teti, A., & Posteraro, P. (1993). Chronic staphylococcal osteomyelitis: a new experimental rat model. *Infect Immun*, 61(12), 5225-5230.
- Stadelmann, V. A., Potapova, I., Camenisch, K., Nehrbass, D., Richards, R. G., & Moriarty, T. F. (2015). In Vivo MicroCT Monitoring of Osteomyelitis in a Rat Model. *Biomed Res Int*, 2015, 587857. <https://doi.org/10.1155/2015/587857>
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276), 135-138.
- Sul, Y.-T., Johansson, C. B., & Albrektsson, T. (2002). Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17(5).
- Svensson, S., Suska, F., Emanuelsson, L., Palmquist, A., Norlindh, B., Trobos, M., Backros, H., Persson, L., Rydja, G., Ohrlander, M., Lyven, B., Lausmaa, J., & Thomsen, P. (2013). Osseointegration of titanium with an antimicrobial nanostructured noble metal coating. *Nanomedicine*, 9(7), 1048-1056. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.04.009>

- Treangen, T. J., Maybank, R. A., Enke, S., Friss, M. B., Diviak, L. F., Karaolis, D. K., Koren, S., Ondov, B., Phillippy, A. M., Bergman, N. H., & Rosovitz, M. J. (2014). Complete Genome Sequence of the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. *Genome Announc*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01110-14>
- Tweden, K., Cameron, J., Razzouk, A., Holmberg, W., & Kelly, S. (1997). Biocompatibility of silver-modified polyester for antimicrobial protection of prosthetic valves. *The Journal of heart valve disease*, 6(5), 553-561.
- Vetter, A. (2013). *Optimierung eines ossären Infektmodells zur tierexperimentellen Untersuchung antimikrobieller Oberflächen in der Prophylaxe Implantat-assoziiierter Infektionen*. http://rosdok.uni-rostock.de/metadata/rosdok_disshab_0000001016
- Wetters, N. G., Murray, T. G., Moric, M., Sporer, S. M., Paprosky, W. G., & Della Valle, C. J. (2013). Risk factors for dislocation after revision total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*, 471(2), 410-416. <https://doi.org/10.1007/s11999-012-2561-7>
- Widmer, A. F. (2001). New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. In: The University of Chicago Press.
- Winkler, T., Trampuz, A., Hardt, S., Janz, V., Kleber, C., & Perka, C. (2014). [Periprosthetic infection after hip arthroplasty]. *Orthopade*, 43(1), 70-78. <https://doi.org/10.1007/s00132-013-2132-y> (Periprosthetische Infektion nach Huftendoprothetik.)
- Zimmerli, W., & Ochsner, P. E. (2003). Management of infection associated with prosthetic joints. *Infection*, 31(2), 99-108. <https://doi.org/10.1007/s15010-002-3079-9>
- Zmistowski, B., Karam, J. A., Durinka, J. B., Casper, D. S., & Parvizi, J. (2013). Periprosthetic joint infection increases the risk of one-year mortality. *J Bone Joint Surg Am*, 95(24), 2177-2184. <https://doi.org/10.2106/jbjs.L.00789>