

**I. Material und Methoden****1. Erreger**

Als Erreger wurde *Staphylokokkus aureus*, Subspezies aureus Rosenbach, mit der Kennzeichnung CDC 587 verwendet. Dieser Keim wurde von der Firma American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas / USA bezogen und ist dort unter der Nummer ATCC 49230 registriert. Der Stamm ist ein Isolat von einem Patienten mit einer chronischen Osteomyelitis aus Little Rock, Arizona. In Antibiogrammen des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene der Charité zeigte er eine Sensibilität gegenüber gängigen Antibiotikagruppen wie Aminoglycosiden, penicillasefesten Penicillinen / Cephalosporinen, Makroliden, Chinolonen und Glycopeptidantibiotika sowie eine Resistenz gegenüber Penicillin.

Die Lagerung des Keimes erfolgte in einem Mikrobank-System (1) bei - 80° C (2).

**2. Herstellung von Bakteriensuspensionen zu Versuchszwecken**

Die Herstellung von Bakteriensuspensionen mit einer definierten Keimdichte [Kolonie bildenden Einheiten (KBE)/ ml] erfolgte in mehreren Schritten.

Zunächst erfolgte die Anzucht und Vermehrung der Bakterien in einem Nährmedium. Nach Isolierung aus der Nährlösung wurden die Erreger in Phosphatpuffer bis zum Erreichen einer definierten Trübung / Konzentration suspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde Ausgangssuspension I genannt. Aus Gründen der Praktikabilität wurde sie in Portionen zu jeweils 2 ml eingefroren und bei -80° C (2) gelagert.

Zu dem jeweiligen Versuchstag wurde eine Portion der Ausgangssuspension I aufgetaut. Um einen möglichen Abfall der Keimkonzentrationen durch das Einfrieren zu erfassen, wurden die KBE/ml vor und nach dem Auftauen in diesen Suspensionen bestimmt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die aufgetauten Suspensionen als Ausgangssuspension II bezeichnet.

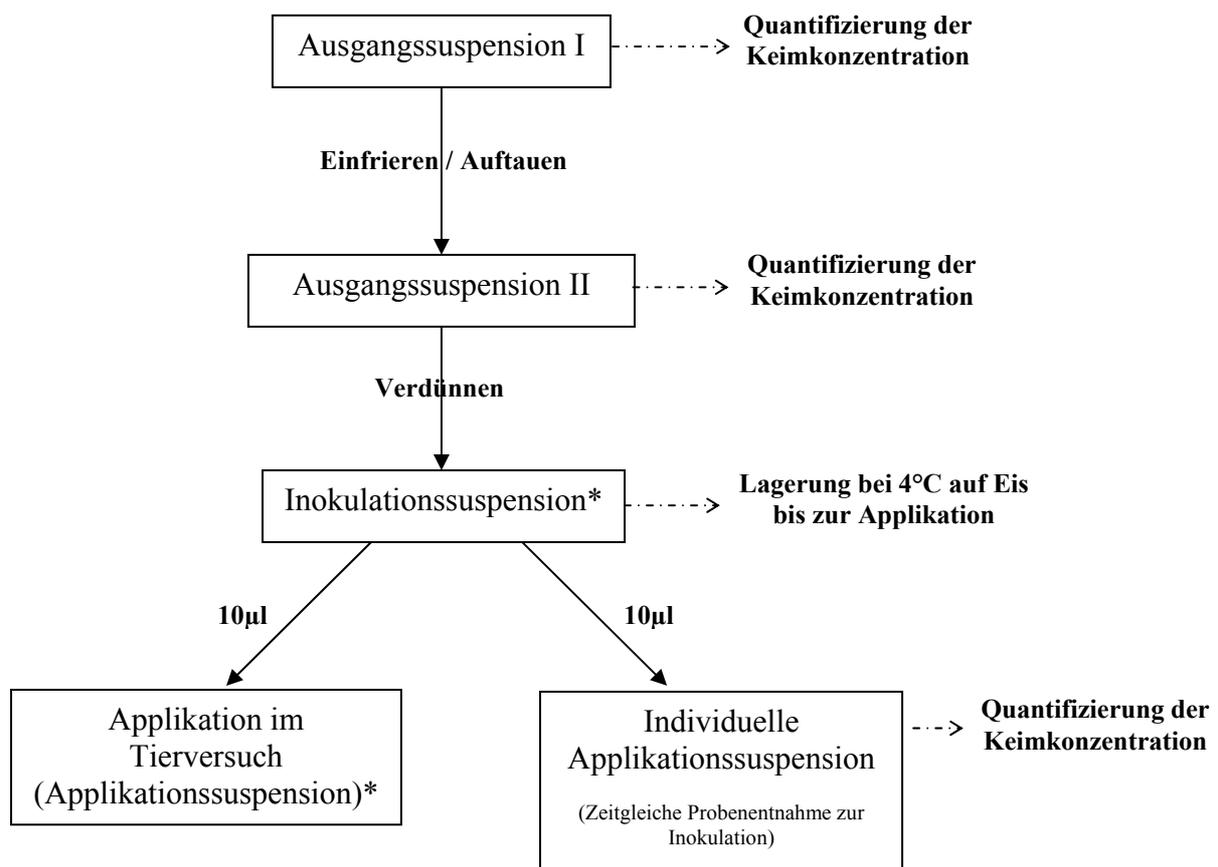
Da in den einzelnen Versuchsgruppen unterschiedliche Keimkonzentrationen appliziert wurden, erfolgte nach dem Auftauen eine entsprechende Verdünnung der Ausgangssuspension II, um die für die jeweilige Inokulation benötigte Keimdichte zu erhalten. Diese entsprechend verdünnte Ausgangssuspension II wird im Weiteren als Inokulationssuspension bezeichnet und über den Versuchstag auf Eis bei 4° C gelagert. Die

Keimmenge, die den Tieren verabreicht wurde, ergibt sich rechnerisch aus der Keimdichte der Inokulationssuspension sowie dem applizierten Volumen von 10 µl.

Um die tatsächliche inokulierte Keimmenge für jedes Tier kontrollieren zu können, wurde bei jeder Operation zeitgleich zur Inokulation eine 10 µl Probe asserviert und die KBE/10 µl bestimmt. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die verwendeten Suspensionen.

Für die unterschiedlichen Gruppen wurde jeweils eine Ausgangssuspension I verwendet und die Tiere einer Gruppe wurden an drei Tagen innerhalb einer Woche operiert. Hiermit wurde eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb der Gruppen gewährleistet. Die Keimkonzentration der einzelnen Suspensionen unterlag einer permanenten Kontrolle.

**Abb. 1** Übersicht über die verwendeten Keimsuspensionen  
\* Berechnung der Keimdichten aus den für die Ausgangssuspension II quantifizierten Konzentrationen



## 2.1 Anzüchten und Vermehrung des Erregers

Ein mit *Staphylokokkus aureus* beimpfter Chip der Mikrobank (1) wurde in ein Reagenzglas mit 9 ml steriler Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Lösung (3) (CSL-Nährlösung) überführt. Zusätzlich wurden 20 weitere sterile Reagenzgläser (4) mit jeweils 3 ml CSL-Nährlösung gefüllt. Die 3 ml Reagenzgläser und der Chip in der 9 ml CSL-Nährlösung wurden für 24

Stunden in einem Brutschrank (5) bei 37° C bebrütet. Zeigte sich am nächsten Tag in einem der 3 ml Reagenzgläser eine Trübung, wurde es als kontaminiert betrachtet und verworfen (Trübung nach 24 h Bebrütung = Kontamination).

Aus der mit dem Mikrochip bebrüteten 9 ml CSL-Nährlösung wurden jeweils 100 µl in die restlichen 3 ml CSL-Reagenzgläser überführt. Die so beimpften Lösungen wurden für weitere drei Stunden inkubiert. Während dieser Zeit erreichten die Bakterien die logarithmische Wachstumsphase. Der Rest der 9 ml CSL-Nährlösung wurde verworfen.

## **2.2 Isolierung der Bakterien aus dem Nährmedium**

Um nach der logarithmischen Wachstumsphase eine weitere Vermehrung der Erreger zu verhindern, wurden den Bakterien die Nährstoffe entzogen. Die Isolierung der Keime aus der CSL-Nährlösung erfolgte durch Waschvorgänge. Hierzu wurden die Reagenzgläser für 10 min. bei 3000 rpm zentrifugiert (6) und anschließend die überstehende Nährlösung verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 3 ml Phosphatpuffer (7) resuspendiert, 10 sec. durch Vortex (8) aufgeschüttelt und anschließend erneut für 10 min. bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschgängen erhielt man ein von CSL-Nährlösung gereinigtes Bakteriensediment.

## **2.3 Herstellung einer Bakteriensuspension mit definierter Konzentration (Ausgangssuspension I)**

Die Bakteriensedimente wurden mit einer Pipette durchmischt und in ein Mc-Farland Standardröhrchen (9) pipetiert, das zuvor mit Phosphatpuffer (7) aufgefüllt wurde. Dieser Schritt erfolgte unter Kontrolle eines Trübungsmessgerätes (10), bis ein Mc-Farland Standard von 6 erreicht war (Maß für die Trübung einer Bakteriensuspension). Mit dieser Methode wurden Suspensionen einer standardisierten Trübung und zugleich definierten Bakteriendichte (KBE/ml) hergestellt. Ein Mc Farland Standard von 6 wurde gewählt, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass sich hiermit eine für die Versuchsdurchführung ausreichende Keimkonzentration von  $10^8$  KBE/ml erreichen ließ. Nach der Quantifizierung der Keimdichte (KBE/ml) in den Ausgangssuspensionen (siehe unten) wurden diese in Portionen zu 2 ml in sterilen Tubes (11) bei -80° C (2) tiefgefroren. Insgesamt wurden 16 Ausgangssuspensionen für das Versuchsvorhaben hergestellt.

## **2.2 Herstellung der Bakteriensuspension mit definierter Konzentration zur Inokulation (Ausgangssuspension II / Inokulationssuspension)**

Die Herstellung der Ausgangssuspension II sowie der Inokulationssuspension erfolgte am jeweiligen Versuchstag. Hierfür wurde die Ausgangssuspension I langsam bei Raumtemperatur aufgetaut (Ausgangssuspension II) und auf die benötigte Konzentration verdünnt (Inokulationssuspension). Um die gewünschte Bakteriendosis pro 10 µl zu erhalten (es wurden immer nur 10 µl der Inokulationssuspension appliziert), musste die Konzentration (KBE/ml) in der Inokulationssuspension dementsprechend höher sein als in der Applikationssuspension. Eine permanente Kühlung der Suspensionen sollte eine Veränderung der Bakteriendichte verhindern.

## **3. Quantifizierung und Kontrolle der Keimkonzentrationen in den einzelnen Suspensionen**

### **3.1 Kontrolle der Suspensionen**

Um zu gewährleisten, dass sich in den verwendeten Suspensionen die gewünschten Keimdichten befanden, wurden die Keimkonzentration untersucht. Folgende Kontrollen wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten durchgeführt:

1. Ausgangssuspension I → direkt nach der Herstellung / vor dem Einfrieren
2. Ausgangssuspension II → nach dem Auftauen am jeweiligen Versuchstag
3. individuelle Applikationssuspension → intraoperativ

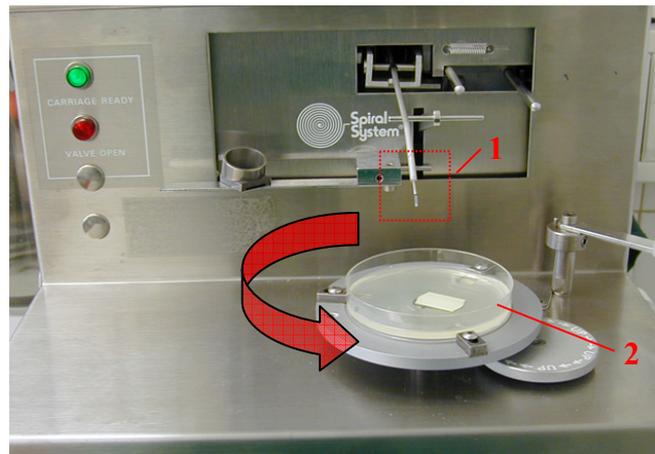
Die Bestimmung der Keimdichte in der Ausgangssuspension II wurde durchgeführt, um einen möglichen Konzentrationsabfall als Folge des Einfrierens zu erfassen. Weiterhin erfolgte die Kontrolle der Keimdichte zum Zeitpunkt der Inokulation (individuelle Applikationssuspension; siehe Abb. 1). Hierfür wurde kurz nach der Inokulation eine 10 µl Probe der Inokulationssuspension in 0,990 ml sterilem Phosphatpuffer suspendiert. Danach wurden die KBE/ml in dieser intraoperativ gewonnenen Suspension bestimmt (siehe unten).

Die Konzentrationen in der Inokulations- und der Applikationssuspension wurden rechnerisch aus der Keimdichte der Ausgangssuspension II ermittelt.

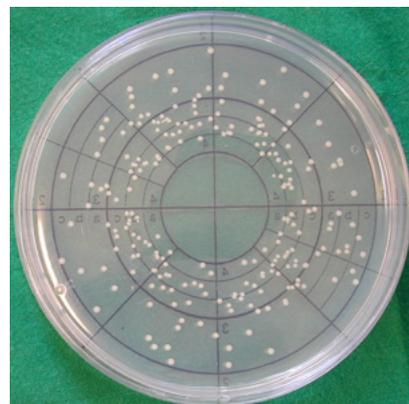
### 3.2 Quantifizierung der Keimkonzentration in den einzelnen Suspensionen

Da die Suspensionen größtenteils sehr hohe Keimkonzentrationen enthielten, mussten sie auf auszählbare Konzentrationen verdünnt werden. Dies wurde durch standardisierte Verdünnungsreihen in Schritten von zehnfachen Verdünnungen erreicht. Mit ausgewählten Verdünnungen erfolgte die Beimpfung mehrerer Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar (CSA)-Platten (12). Hierbei wurden 100 µl der verdünnten Suspension mit dem Spiralometer (13) gleichmäßig auf einer rotierenden CSA-Platte verteilt (Abb.2).

**Abb. 2** 100 µl der zu untersuchenden Suspension wird über die Applikationsvorrichtung (1) gleichmäßig auf einer rotierenden CSA-Platte (2) verteilt. (Der Pfeil gibt die Drehrichtung der Platte an)



**Abb. 3** Mit dem Spiralometer beimpfte CSA-Platte nach 24 h Bebrütung. Darunter sichtbar die in Sektoren unterteilte Schablone zur Auszählung der gebildeten Bakterienkolonien



Nach Bebrütung über Nacht bei 37° C (5) wurden die KBE auf den beimpften CSA-Platten unter Zuhilfenahme der Schablone ausgezählt (Abb.3) und die KBE/ml für die einzelnen Verdünnungen berechnet. Da die Verdünnungsfaktoren der einzelnen Suspensionen bekannt waren, konnten somit die KBE/ml in der unverdünnten Suspension berechnet werden. Alle CSA-Platten wurden zweimal ausgezählt.

## **4. Studiendesign**

### **4.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden weibliche, 5 Monate alte Sprague Dawley Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 250 Gramm verwendet. Diese wurden ausschließlich für Tierversuche gezüchtet. Bezugsquelle ist die Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln.

Die Tiere wurden unter artgerechter Bedingung bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden in der tierexperimentellen Abteilung des Virchow Klinikums der Charité gehalten und von Tierpflegern betreut. Jeweils 3 Tiere teilten sich einen Typ 3 Käfig, wobei freie Wasser- und Futteraufnahme (14) gewährleistet waren.

Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Arbeitsschutz und technische Sicherheit

Alt-Friedrichsfelder Straße 60

Gruppe V-2

10315 Berlin

unter der Registriernummer 0296/99 genehmigt.

### **4.2 Versuchsdurchführung und Gruppenaufteilung**

Nach Durchführung der präoperativen Untersuchungen (siehe 4.3) erhielten die Tiere eine Injektionsnarkose (siehe 4.3.2). Um die Konjunktiven der Tiere vor der Austrocknung zu schützen, wurde eine Augensalbe (15) aufgetragen. Es folgten Rasur (16), Enthaarung (17) und dreimalige Desinfektion (18) des linken Hinterlaufes. Die Tiere wurden in Rückenlage auf einem sterilen Tuch gelagert. Ein darunter befindliches Heizkissen schützte vor Unterkühlung. Die Tiere wurden bis auf den linken Hinterlauf mit einem sterilem Lochtuch (19) abgedeckt. Um einer eventuellen bakteriellen Kontamination während der Operation vorzubeugen, wurde der Hinterlauf zusätzlich mit einer sterilen Inzisionsfolie (20) abgeklebt. Mit einem Skalpell (21) wurden Haut und Faszie medio-proximal über der Tibiametaphyse inzidiert (8 mm). Unter Verwendung eines Handbohrers mit einer Titanbohrspitze ( $\varnothing$  1mm) wurde die Markhöhle im Bereich der proximalen Metaphyse eröffnet, wobei das umgebende Periost erhalten blieb. Der Markraum wurde zuerst mit einem 1 mm Stahl-K-Draht (22), danach mit einem 0,8 mm Stahl-K-Draht behutsam erweitert. Nach Entfernung des Drahtes wurden 10  $\mu$ l der Inokulationssuspension in einer Mikrospritze (23) aufgezogen und in die Markhöhle appliziert.

Es folgte die Insertion eines Titan-K-Drahtes (22) ( $\varnothing$  0,8 mm), dessen Spitze knapp oberhalb der distalen Metaphyse zu liegen kam. Der überstehende Draht wurde mit einem Seitenschneider auf dem Niveau des Knochens abgetrennt. Nach Spülung des Wundgebietes mit Braunol (24) erfolgte die Naht von Faszie und Haut in Einzelknopftechnik (25). Nach Aufbringen eines Sprühverbandes (26) schloss sich eine postoperative Röntgenuntersuchung an.

Folgende Gruppen wurden untersucht:

Tab. 1 Gruppeneinteilung der Tiere und inokulierte Keimdosis

Gruppe	Inokulierte Suspension	Anzahl
I	10 $\mu$ l Phosphatpuffer (PBS)	10
II	10 <sup>6</sup> KBE/10 $\mu$ l	10
III	10 <sup>3</sup> KBE/10 $\mu$ l	10
IV	10 <sup>2</sup> KBE/10 $\mu$ l	10

### 4.3 Untersuchungen der Tiere über den Versuchszeitraum

Die Tiere wurden präoperativ, nach drei Tagen und dann wöchentlich bis zum Tötungstermin (nach 4 Wochen) untersucht. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die zu den einzelnen Zeitpunkten durchgeführten Untersuchungen der Tiere. Alle Untersuchungen wurden unter inhalativer Allgemeinnarkose durchgeführt (siehe 4.3.1).

Tab. 2 Untersuchungsprotokoll zu den einzelnen Terminen

Zeitpunkte	Untersuchungen				
OP-Tag	Gewicht	Temperatur	Inspektion	Blutentnahme	Röntgen <sup>a</sup>
Tag 3	Gewicht	Temperatur	Inspektion	Blutentnahme	
Tag 7 <sup>b</sup>	Gewicht	Temperatur	Inspektion	Blutentnahme	
Tag 14	Gewicht	Temperatur	Inspektion	Blutentnahme	Röntgen
Tag 21	Gewicht	Temperatur	Inspektion	Blutentnahme	
Tag 28 <sup>c</sup>	Gewicht	Temperatur	Inspektion	Blutentnahme	Röntgen

<sup>a</sup> post operativ

<sup>b</sup> Entfernung des Nahtmaterials

<sup>c</sup> Tötung der Tiere

### **4.3.1 Durchführung der Inhalations- und Injektionsnarkosen**

Die Inhalationsnarkosen wurden mit einem modifizierten Anästhesiegerät (27) der tierexperimentellen Abteilung des Virchow Klinikums der Charité durchgeführt. Hierzu wurde ein Gemisch aus Isofluran (28), O<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>O in ein luftdichtes Kunststoffgefäß geleitet, in dem das zu narkotisierende Tier eingeschlossen war.

Folgende Dosierungen der Narkosegase wurden verwendet:

Isofluran:	3-5 Vol. %
O <sub>2</sub> :	0,8 l/min
N <sub>2</sub> O:	0,8 l/min

Als Injektionsnarkose wurde eine gewichtsadaptierte Dosis Xylazin (30) (12 mg/kg Körpergewicht) und Ketavet (31) (80 mg/kg Körpergewicht) mit einer Feindosierspritze (29) intraperitoneal appliziert.

### **4.3.2 Gewinnung der Blutproben**

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit einer heparinisierten Hämatokrit-Kapillare (32). Es wurden 200 µl EDTA-Blut entnommen (33). Aus der Probe wurde im Institut für klinische Chemie der Charité ein kleines Blutbild erstellt.

### **4.3.3 Röntgenuntersuchungen**

Nach Fixierung des Hinterlaufes auf einer digitalen Röntgenplatte (34) mittels einer Schiene wurden Aufnahmen im posterioren / anterioren und nach Umlagerung im lateralen Strahlengang mit einem mobilen Röntgengerät (35) angefertigt. Der Film – Focus - Abstand betrug 60 cm, die Spannung 52 kV und die Belichtungszeit 1,8 mAs. Die Entwicklung erfolgte unter standardisierten Bedingungen im Institut für Radiologie und Strahlentherapie der Charité.

### **4.3.4 Bestimmung von Körpertemperatur und -gewicht**

Die Temperaturmessung erfolgte rektal mit einem handelsüblichen digitalen Thermometer (36), und die Tiere wurden auf einer Feinwaage gewogen (37).

#### 4.3.5 Inspektion und klinische Untersuchung der Tiere

Bei jeder Untersuchung wurde das Tier inspiziert und klinisch untersucht. Auftretende Anzeichen einer lokalen Infektion (Subkutane Abszesse, Fistelungen, Gelenkerguss im Knie / Sprunggelenk, Schwellung an der Nageleintrittsstelle, Rötung, Überwärmung) und die Wundverhältnisse wurden protokolliert (Wundheilungsstörung: ja/nein).

### 5. Tötung der Tiere und Probengewinnung

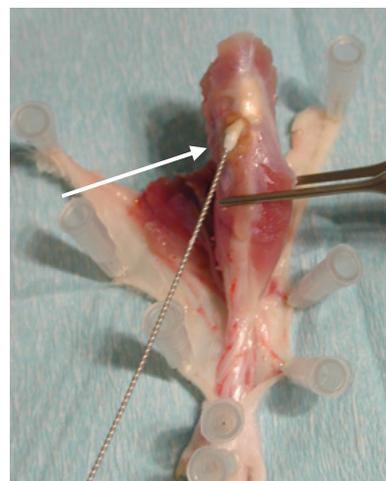
Nach Abschluss der Untersuchungen gemäß Tabelle 3 erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektionsnarkose (4.3.2). Es folgten Rasur (16), Enthaarung (17) und dreimalige Sprühdesinfektion (18) von linkem Hinterlauf und Thorax.

Um eine Kontamination der mikrobiologischen Präparate zu verhindern, wurden die folgenden Eingriffe am Tier unter sterilen Bedingungen durchgeführt:

Mit einer Schere wurde der knöcherne Thorax eröffnet. Nach Sprühdesinfektion (18) des Situs wurde der rechte Vorhof punktiert und 3 ml Blut für eine Blutkultur (38) entnommen. Anschließend erfolgte die intrakardiale Injektion von Kalium-Chlorid (39) bis der Herzstillstand eintrat.

Mit einem Skalpell (21) wurde das Gewebe proximal des linken Kniegelenkes zirkulär durchtrennt. Das so freigelegte Femur wurde mit einer kräftigen Schere abgetrennt und der Hinterlauf auf einer sterilen Unterlage mit Kanülen (40) fixiert. Die Haut wurde über die gesamte Länge der Tibia inzidiert. Die hierbei verwendeten Instrumente wurden anschließend verworfen. Mit neuem, sterilem Instrumentarium wurde die Haut subcutan präpariert und mit fixierenden Kanülen aufgespannt (Abb.4), um das tieferliegende Weichteilgewebe nicht mit der Hautoberfläche in Kontakt zu bringen. Ein Abstrich (41) wurde an der Nageleintrittsstelle entnommen und die Weichteile wurden auf Infektzeichen untersucht (Abszesse, Fisteln).

**Abb. 4** Abgesetzter linker Hinterlauf einer Sprague-Dawley Ratte. Die Haut ist abpräpariert und mit Kanülen aufgespannt. Der Pfeil markiert die Entnahme eines Abstriches von der Eintrittsstelle des K-Drahtes



Es erfolgte die Exartikulation in Knie- und oberem Sprunggelenk. Das Weichteilgewebe des Unterschenkels wurde entfernt und die Fibula mit einer Schere von der Tibia abgetrennt. Nach Untersuchung des Knochens auf pathologische, makroskopische Veränderungen (Osteolysen, Auftreibungen, Verfärbung) wurde der Titan-K-Draht explantiert und mit einer Pinzette über einer Blutagarplatte (42) abgerollt. Um auch sehr geringe Mengen adhärenter Bakterien erfassen zu können, wurde der Draht anschließend in ein Reagenzglas mit 9 ml steriler CSL-Nährlösung (3) überführt. Die freipräparierten Tibiae wurden auf einer Präzisionswaage (47) gewogen. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Knochen in einem sterilen Falcon-Tube (43) auf Eis gelagert. Fünf Tibiae jeder Gruppe wurden einer mikrobiologischen und fünf einer histologischen Untersuchung zugeführt.

## **6. Mikrobiologische Auswertung der gewonnenen Proben**

### **6.1 Quantifizierung adhärenter Bakterien an der Implantatoberfläche**

Die unter Punkt 5 angefertigten Abrollplatten und Nährlösungen wurden über 48 h bei 37° C bebrütet (5). Anschließend erfolgte die optische Beurteilung der Nährlösung hinsichtlich ihrer Trübung (trüb: positives Wachstum; klar: kein Wachstum) und die Auszählung der KBE auf den Abrollplatten. Bei bewachsenen Agarplatten wurde zusätzlich eine Keim- und Resistenzbestimmung durchgeführt (siehe 6.3).

### **6.2 Auswertung der Blutkulturen und Abstriche**

Blutkulturen und Abstriche wurden im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité untersucht, wobei die Abstriche wie unter Punkt 6.3. beschrieben weiterverarbeitet wurden. Ein Wachstum in den Blutkulturflaschen wurde mit dem BacT-Alert 3D (44) System automatisch registriert. Bei einem positiven Befund wurde die Spezies ermittelt und ein Antibiogramm erstellt (siehe 6.3).

### 6.3 Keim- und Resistenzbestimmung

#### 6.3.1 Identifizierung der Erreger

Bei positivem Wachstum auf den Abrollplatten, in den Blutkulturen oder den Abstrichen wurden folgende Nährmedien mit dem jeweiligen Material beimpft:

1. Thioglykolat-Nährlösung (anaerobes und aerobes Wachstum )
2. Mc Conkey-Agar: selektiv für gramnegative Stäbchen (Salmonellen, Shigellen, coliforme Bakterien)
3. Sabouraud-Agar: selektiv für Pilze (Nocardia, Actinomyces, Streptomyces)
4. Columbia-Blutagar: nicht selektiv
5. Anaerobier-Platte: Columbia-Blutagar mit Zusatz von Vitamin K und Haemin unter O<sub>2</sub>-Abschluss

Nach 48 h Bebrütung bei 37° C (5) erfolgte die optische Begutachtung. Bei Verdacht auf Staphylokokken wurde der Koagulasenachweis durchgeführt. Hierfür wurde Material auf einem Objektträger mit Anti *Staphylokokkus aureus* Lösung (45) vermischt, die Antikörper gegen Koagulase enthält. Kam es zu einer Ausflockung, so handelte es sich um *Staphylokokkus aureus*.

Wies das Wachstumsmuster auf den Nährmedien auf einen anderen Erreger hin oder fiel die Koagulasereaktion negativ aus, schlossen sich weitere Untersuchungen durch das Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité an.

#### 6.3.2 Resistenzbestimmung

Aus dem zu untersuchenden Isolat wurde zunächst eine Suspension mit einem McFarland-Standard von 0,6 bis 0,72 hergestellt. Danach erfolgte die vollautomatische Resistenzbestimmung mit dem Vitek<sup>®</sup> 2-System (46) durch das Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité.

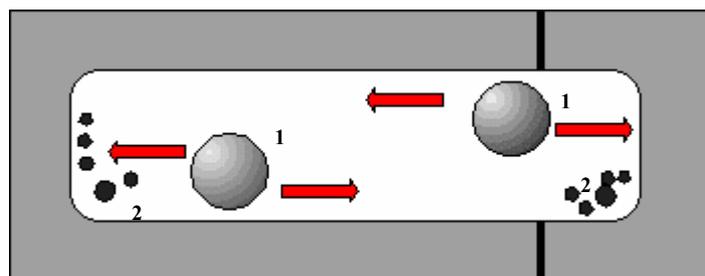
### 6.4 Quantifizierung der Bakterien im Knochen

Bei der Handhabung der Präparate wurde auf strikte Einhaltung der Sterilität geachtet.

Der Knochen wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und manuell grob zermörsert. Die Knochenstückchen wurden zusammen mit zwei Stahlkugeln (Ø 12mm) in einen Mahlbecher gefüllt und mit einer Schwingmühle (48) unter permanenter N<sub>2</sub>-Kühlung 2 min. bei einer

Frequenz von 1485 Schwingungen/min. pulverisiert (durchschnittliche Partikelgröße von 40-60  $\mu\text{m}$ <sup>143</sup>). Die Zerkleinerung des Knochens erfolgte hierbei durch die Schlagwirkung der Kugeln, die durch radiale Schwingungen des horizontal angebrachten Mahlbeckers erzeugt wurde (Abb.6). 150 mg des Knochenpulvers wurden in ein steriles Tube (11) gefüllt und mit 1,5 ml Puffer (7) verdünnt. Das Puffer/Knochenpulvergemisch wurde 2 min. mit einem Vortexgerät (8) gemischt und danach 10 sec. bei 10.000 rpm. abzentrifugiert (49). 1 ml des Überstandes wurde in ein steriles Tube (11) abpipetiert. Nach mehrmaliger 10-facher Verdünnung des Überstandes wurden aus den Verdünnungen  $1/10^2$ ,  $1/10^3$  und  $1/10^4$  jeweils zwei CSA-Platten (12) mit dem Spiralometer (13) beimpft. Nach 24 h Bebrütung der Platten bei 37° C (5) wurde die Bakterienkonzentration in den Verdünnungen bestimmt und auf die Keimdichte in dem 1 ml Überstand hochgerechnet. Die KBE/g Knochen ergaben sich aus der Division der KBE in den 1,5ml und dem Gewicht des Knochenpulvers (0,15 g).

**Abb.5** schematische Darstellung des Mahlbeckers.  
(1) Stahlkugeln mit Bewegungsrichtung (rote Pfeile)  
(2) Mahlgut



## 7. Histologische Auswertung

### 7.1 Herstellung und Färbung histologischer Schnitte

Fünf Tibiae aus jeder Gruppe wurden histologisch untersucht. Die Knochen wurden über eine Woche bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss in einer Formaldehydlösung (50) fixiert. Die Dehydrierung der Knochen erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %) (51), wobei die Präparate für zwei Tage mit der jeweiligen Alkoholkonzentration behandelt wurden. Der letzte Schritt der Entwässerung wurde in 100 % Alkohol über vier Tage durchgeführt. Nach Entfettung der Präparate mit Xylol (52) über 24 h folgte eine zweistündige Präinfiltration und die anschließende Infiltration der Proben über 24 h mit Methylmetacrylat (53). Nach 24 h Aushärten der Präparate unter Eiskühlung erfolgte das Einbetten in Methylmetacrylat (53). Die Herstellung der Präinfiltration-, Infiltration- und Einbettmedien wurde nach den genauen Angaben des Herstellers Heraeus Kulzer ausgeführt. Mit einem 40° angewinkelten Stahlmesser eines Hartschnittmikrotoms (54) wurden longitudinale, 5 µm dicke Schnitte in sagittaler Ebene angefertigt. Die Gewebsschnitte wurden auf Objektträger (55) aufgebracht und mit einem Butoxyethyl-Acetat / Alkohol (70 %) Gemisch im Verhältnis 1/3 geglättet (56). Nach dem Abdecken der Präparate mit Kisolfolie (57) erfolgte die Trocknung in einer Schnittpresse bei 37° C für 24 h. Vor dem Färben der Präparate nach der Methode von Masson-Goldner wurden die Schnitte dreimal für eine halbe Stunde in 2-Methoxyethyl-Acetat (58) entplastiniert.

### 7.2 Histologischer Score

Um die histologischen Präparate der einzelnen Gruppen vergleichen zu können, wurden von jedem Tier Schnitte in der gleichen Ebene ausgewählt. Hierzu musste auf den Präparaten sowohl der Markraum in seiner ganzen Länge als auch die Eintrittsstelle des Implantats sichtbar sein. Die Schnitte wurden mittels eines Motortisches (59) und einer Videokamera (60) digitalisiert. Die somit in einer 20fachen Vergrößerung erzeugten Einzelbilder wurden mit einem Bildanalyseprogramm (61) zu einem Übersichtsbild zusammengesetzt. Nach der Verschlüsselung und Randomisierung der Präparate erfolgte die Beurteilung durch vier unabhängige Begutachter.

Um auch eine Aussage über die räumliche Verteilung der histologischen Veränderungen treffen zu können, wurden die Schnitte in vier Regionen (regions of interest = ROI) eingeteilt:

1. Proximale Epi-/Metaphyse → ROI 1
2. Proximale Diaphyse → ROI 2
3. Distale Diaphyse → ROI 3
4. Distale Epi-/Metaphyse → ROI 4

**Abb.6** Beispiel eines histologischen Präparates und Darstellung der einzelnen *regions of interest*  
ROI 1 (rot) → proximale Epi-/Metaphyse  
ROI 2 (blau) → proximale Diaphyse  
ROI 3 (gelb) → distale Diaphyse  
ROI 4 (grün) → distale Epi-/Metaphyse



Abbildung 6 zeigt schematisch die Unterteilung der Präparate in die vier *regions of interest*. Jede Region eines Schnittes wurde von vier Untersuchern auf folgende pathologische Veränderungen analysiert und mit einem Punktesystem bewertet:

1. Abszessbildung
2. Knochensequestrierung
3. Verbreiterung der Kortikalis
4. Destruktion von kortikalem und spongiösem Knochen
5. subjektiver Gesamteindruck

Parameter 1 bis 4 wurden mit 0 (nicht vorhanden) oder 1 (vorhanden), Parameter 5 mit 0 (unauffällig), über 1 (gering ausgeprägte pathologische Veränderungen) und 2 (deutlich ausgeprägte pathologische Veränderungen) beurteilt. Die maximal erreichbare Punktzahl für ein Präparat betrug somit 24 Punkte (vier *regions of interest* mit maximal 6 Punkte pro ROI).

## 8. Radiologische Auswertung

Die im lateralen und im posterior / anterioren Strahlengang aufgenommenen Röntgenbilder aller Tiere zu den Zeitpunkten OP, 14 Tage und 28 Tage wurden mit einer Kamera (62) digitalisiert. Die Gruppenzugehörigkeit wurde verschlüsselt und die Bilder randomisiert.

Die Röntgenbilder wurden in drei Regionen (*regions of interest* = ROI) unterteilt (Abb.7).

Abb. 7 Dargestellt sind die einzelnen *regions of interest* nach denen die Röntgenbilder eingeteilt wurden

- |              |                            |
|--------------|----------------------------|
| ROI 1 (gelb) | → proximale Epi-/Metaphyse |
| ROI 2 (rot)  | → Diaphyse                 |
| ROI 3 (grün) | → distale Epi-/Metaphyse   |



Alle drei Regionen wurden unter Zuhilfenahme beider Ebenen von vier unabhängigen Gutachtern beurteilt. Folgende charakteristische radiologische Veränderungen wurden nach einem modifizierten Score nach An et al. <sup>123</sup> mit einem Punktesystem bewertet:

- |                        |                   |
|------------------------|-------------------|
| 1. periostale Reaktion | 5. Gesamteindruck |
| 2. Osteolysen          | 6. Fraktur        |
| 3. Weichteilschwellung | 7. Sequester      |
| 4. Deformität          |                   |

Parameter 1 – 5 wurden mit 0 Punkten (nicht vorhanden), einem Punkt (gering ausgeprägt), zwei Punkten (mäßig ausgeprägt) bis hin zu drei Punkten (deutlich ausgeprägt) bewertet. Für Parameter 6 und 7 erfolgte keine Einteilung in die drei Regionen und es wurden 0 Punkte für nicht vorhanden und ein Punkt für vorhanden vergeben. Die für ein Röntgenbild maximal erreichbare Punktezahl betrug somit 47 Punkte.

## 9. Definition eines infizierten Tieres

Ein Tier galt als infiziert, wenn folgende Kriterien gleichzeitig erfüllt waren:

1. positives bakterielles Wachstum am explantierten Implantat sowohl in der Abroll- als auch in der Immersionskultur
2. bakterielles Wachstum im post mortem pulverisiertem Knochen bzw. ein Scorewert von  $\geq 5$  Punkten im histologischen Präparat
3. ein Scorewert von  $\geq 7$  Punkten im Röntgenbild 28 Tage post operativ

Die Scorewerte im histologischen / radiologischen Präparat mussten über 5 bzw. über 7 sein, da diese die maximal erreichten Scorewerte der Tiere der Kontrollgruppe waren.

## 10. Berechnung der Sensitivität und Spezifität der einzelnen Methoden

Für die Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurden für die histologischen Präparate ein Scorewert von  $\geq 5$  und für die Röntgenbilder ein Scorewert von  $\geq 7$  als positives Testergebnis angenommen. Ein mikrobiologischer Befund galt als positiv, wenn bakterielles Wachstum sowohl auf der Abroll- als auch in der Immersionskultur nachweisbar war.

Die Berechnung erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Positive Testergebnisse von infizierten Tieren}}{\text{Positive Testergebnisse von infizierten Tieren} + \text{negative Testergebnisse von infizierten Tieren}}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Negative Testergebnisse von **nicht** infizierten Tieren}}{\text{Positive Testergebnisse von **nicht** infizierten Tieren} + \text{negative Testergebnisse von **nicht** infizierten Tieren}}$$

**11. Statistik**

Alle erhobenen Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Statistische Unterschiede wurden mittels des Student's T-Test bei Normalverteilung der Werte oder mit dem Mann-Whitney-U-Test bei nicht - normalverteilten Werten ausgewertet. Bei Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde mit dem Bernoulli-Test / Bonferroni-Holm Test balanciert. Die Ergebnisse des radiologischen und histologischen Scores wurden anhand des  $\text{Chi}^2$  – Test analysiert. Die Auswertung der interindividuellen Variabilität der Scorewerte wurde mittels des Kappa-Koeffizienten durchgeführt.

$p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen. Die statistische Auswertung wurde durch das Institut für Biometrie der Charité betreut.

**12. Liste derverwendeten Verbrauchsmaterialien**

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH  
22331 Hamburg

**(1)** Microbank™  
Pro-Lab Diagnostics

**(12)** Caseinpepton-Sojabohnenmehl-pepton-Agar (CSA-Platten); Becton Dickinson; Meylan; Frankreich

**(2)** Herafreeze -80°C  
Model Nr.: HFU 586STD-V14  
Heraeus Instruments GmbH

**(13)** Typ : CU  
Serien Nr. : 1659  
Mfd. By Spiral System Inc.  
Cincinnati, OH 45244  
U.S. Pat. Nos. 3962040, 3892632, 3799844

**(3)** Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Lösung  
Oxoid LTD  
Basingstoke, Hampshire, England

**(14)** V-Alleinfutter für Ratten/Mäuse  
ssniff Spezialdiäten GmbH  
Soest, Deutschland

**(4)** Schott Duran

**(15)** Panthenol (Jenapharm)  
Wirkstoff: Dexpanthenol  
Vertrieb: Alcon Pharma GmbH  
D-79108 Freiburg

**(5)** Heraeus Function Line  
Typ: B6 70°C 1N/PE  
Kendro Laboratory Products  
D-63450 Hanau

**(16)** Favorita II GT 104  
Aesculap®  
D-78532 Tuttlingen

**(6)** Heraeus-Christ GmbH  
Osterode  
Typ: 4100, Nr.: 00097324

**(17)** Pilca Enthaarungscreme  
Schwarzkopf & Henkel Cosmetics  
Düsseldorf, Germany

**(7)** Phosphatpuffer  
Material für 2000 ml Aqua Dest.:  
1. 16,0 g NaCl ( Merck 6404 )  
2. 0,4 g KCl ( Merck 4936 )  
3. 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O ( Merck 6580 )  
4. 0,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( Merck 4873 )  
Zubereitung:  
in 2000 ml Aqua dest. Position 1 bis 4  
lösen; pH auf 7,4 einstellen  
Dampfsterilisation für 30min.

**(18)** Braunoderm®  
B.Braun Melsungen AG  
D-34209 Melsungen

**(8)** Reax Control  
No.: 541.11000.00 0 (0-2400 1/min)  
Heidolph

**(19)** Sterisheet® 77 Plus  
Arjo Wiggings SA  
92442-Issy Les Maulineaux, Cedex

**(9)** bioMérieux sa  
69280 Marcy l'Etoile, France

**(20)** Barrier-Flex™  
Johnson&Johnson Medical Limited  
Gargrave, Skipton, BD 23 3RX.UK

**(10)** Densimat  
Serial No.: IDN 00 2436  
bio Mérieux sa

**(21)** Bard-Parker™ Scalpels No.:15  
Becton Dickinson and Company Hancock  
NY 13783

**(11)** Reaktionsgefäße

- (22) Kirschner-Wire Ø 0,8 mm with Trocar Tip  
length 150 mm; Ref 492.090  
Stratec Medical  
CH-4436 Oberdorf, Switzerland  
Vertrieb: Synthes GmbH & Co. KG  
D-79224 Umkirch
- (23) Microsyringe 50µl  
Hamilton Company  
P.O.Box 10030; Reno, Nevada
- (24) Braunol®  
B.Braun Melsungen AG
- (25) Ethilon® II 4/0; Ethicon  
Johnson&Johnson Medical Limited
- (26) Ankerplast® Wundschnellverband  
Chauvin ankerpharm GmbH  
07407 Rudolstadt
- (27) Anaesthesie-GME 4  
Type: Vet. Narkosegerät ARTEC  
Nr.: 104 95 186  
Stephan  
D-56412 Gackebach
- (28) Forene® Wirkstoff: Isofluran  
Abbott GmbH  
D-65205 Wiesbaden
- (29) Omnifix® -F 1ml solo  
B.Braun Melsungen AG
- (30) Xylazin 2%  
Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid  
medistar®
- (31) Ketavet  
Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid 100mg/ml  
Pharmacia&Upjohn
- (32) Hirschmann® Laborgeräte  
Germany
- (33) Kapillarblutentnahmesystem  
Kabe Labortechnik GmbH  
Jägerhofstr. 17, 51588 Nümbrecht-  
Elsenroth, Germany
- (34) 1x DLR Cassette 18x24 und  
24x30cm  
Digiscan 2H/2C  
Siemens
- (35) Mobilett Plus Röntgengerät  
Modell Nr.: 62 15 300 X037E  
Siemens AG  
D-80333 München
- (36) Maximum-Thermometer Digital  
Classic; Hartmann
- (37) Kilomat Typ 2106  
Sartorius-Werke AG  
Göttingen
- (38) BacT Alert® Aerobic Culture  
Bottle  
Organon Teknika Corp.  
Durham, NC27704 / D-69214 Epp6
- (39) 1 M-Kaliumchloridlösung  
pfrimmer, Baxter Deutschland
- (40) Neolus 20G 0,9mm  
Terumo Europe N.V.  
3001 Leuven Belgium
- (41) Transwab® Transport-Medium  
Lieferant: Mast Diagnostica GmbH  
D-23854 Reinfeld
- (42) BBL® Stacker® Plates mit 5%  
Schafsblut  
Becton Dickinson Microbiology Europe  
38240 Meylan Cedex, France
- (43) Becton Dickinson Labware  
Franklin Labes  
N.J. USA
- (44) BacT Alert 3D  
Organon Teknika GmbH  
Wernher-v.-Braun Str. 18  
D-69214 Eppelheim
- (45) anti. S. aureus Lösung
- (46) Vitek® 2  
bioMérieux sa

- (47) Typ : 2024 MP  
Sartorius
- (48) Typ : MM 2  
Nr. : 68448  
Retsch
- (49) Centrifuge 5414  
Eppendorf Netheler + Hinz GmbH
- (50) Fixierlösung  
Formaldehyd 37% 324 ml  
(J.T.Baker, Holland)  
Ethanol (Herbeta) 100% 550ml  
Barbital-Na-Puffer 130ml  
(0,1molar, pH 7,3)  
D(+) Glucose (Merck) 6g
- (51) Ethanol  
Herbeta-Arzneimittel  
D-12099 Berlin
- (52) Xylol  $C_6H_4(CH_3)_2$   
J.T. Baker  
7400 AA Deventer, Holland
- (53) Technovit 9100  
Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG  
D-61273 Wehrheim
- (54) Leica SM 2500S  
Bensheim, Germany
- (55) Menzel-Gläser®  
Germany
- (56) Merck-Schuchardt  
D-85662 Hohenbrunn
- (57) Medim-Histotechnologie GmbH  
D-35418 Buseck
- (58) Merck-Schuchardt  
D-85662 Hohenbrunn
- (59) MCX-2 eco  
ITK Dr. Kassen GmbH  
D-35633 Lahnu
- (60) 3 CCD Color Video Camera  
Sony
- (61) Bildanalysesystem KS 400  
Carl Zeiss Vision GmbH  
D-85386 München