

Aus der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie, Septisch-
Rekonstruktive Chirurgie am Bundeswehrkrankenhaus Berlin

Akademisches Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Qualitative und quantitative Bestimmung der bakteriellen
Besiedlung von Vakuumversiegelungsschwämmen und
Effluaten bei akuten und chronischen Knochen- und
Weichteilverletzungen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marcus Stichling

aus Sömmerda

Datum der Promotion: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abstract (Deutsch)	6
Abstract (English)	8
1. Einleitung	10
1.1. <i>Komplexität von Weichteil- und Knocheninfekten</i>	10
1.2. <i>Antiseptische Strategien</i>	11
1.3. <i>Bedeutung der Negative Pressure Wound Therapy (NPWT)</i>	12
1.4. <i>Bakterielle Besiedlung von NPWT Polyurethan – Schwamm und Effluat</i>	15
2. Material und Methoden	17
2.1. <i>Studiendesign und Patientenpopulation</i>	17
2.2. <i>Literaturanalyse</i>	18
2.3. <i>Probenentnahme und Analyse (Ablauf der Probengewinnung)</i>	19
2.4. <i>Technischer Teil der NPWT- und NPWTi-d-Anwendung</i>	20
2.5. <i>Mikrobiologische Analyse</i>	21
2.6. <i>Molekularbiologische Analyse</i>	25
2.7. <i>Statistische Analyse</i>	27
3. Ergebnisse	28
3.1. <i>Demografische Daten und Gruppenmerkmale</i>	28
3.2. <i>Bakterielle Besiedlung des Wundgrundes im Verlauf der Therapie</i>	30
3.3. <i>Der Schwamm als Erregerreservoir</i>	31
3.4. <i>Wachstumsverhalten der Bakterien – planktonisch, Mikrokolonien, Biofilm</i> ...	32
3.5. <i>Wirkung der antiseptischen NPWTi-d auf die bakterielle Wundkontamination</i>	33
3.6. <i>Mehrwert durch alle Untersuchungsmaterialien und diagnostische Verfahren</i>	35
4. Diskussion	44

4.1. Grundlegende Fragen und Hauptaussagen	44
4.2. Interpretation der Ergebnisse	45
4.3. Limitationen der Studie.....	51
4.4. Zusammenfassendes Fazit	53
4.5. Ausblick auf weiterführende Studien	55
5. Literaturverzeichnis	57
Eidesstattliche Versicherung.....	63
Ausführliche Anteilserklärung	64
Auszug aus Journal Summary List	66
Veröffentlichung 1 "Is there a wound re-contamination by eluates with high bacterial load in negative pressure wound therapy with instillation and dwell time (NPWTi-d)?"	68
Lebenslauf	93
Publikationsliste	97
Danksagung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

NPWT	Negative Pressure Wound Therapy
NPWTi-d	Negative Pressure Wound Therapy with instillation and dwell time
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
PCR	Polymerase Chain Reaction
FISHseq	Kombination von FISH mit PCR und Sequenzierung (molekularbiologische Diagnostik)
TP1	Zeitpunkt vor Anlage des NPWT Schwammes
TP2	Zeitpunkt des 1. Schwammwechsels bei der NPWT
MRGN	Multiresistente gramnegative Bakterien
ESBL	Extended Spectrum Beta-Laktamase
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
TDM	Therapeutisches Drug-Monitoring
NaCl	Natriumchlorid

MiBi	Mikrobiologie
HOCl	Hypochlorsäure
CO₂	Kohlenstoffdioxid
MHK	Minimale Hemmkonzentration
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
VAC	Vacuum Assisted Closure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol = Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA
d	Tage
KBE	Koloniebildende Einheit
SOD	Superoxidiertes Wasser

Abstract (Deutsch)

Einleitung: Ziel dieser Studie war es, die bakterielle Besiedlung des Effluats nach retrograder Spülung des Vakuumversiegelungsschwammes während einer Unterdruck-Wundtherapie ohne Instillation (NPWT) und mit Instillation (NPWTi-d) zu untersuchen. Die Frage ist, ob die Anwendung einer NPWTi-d zu einer Rekontamination der Wunde mit Erregern aus dem Effluat führt. In dieser Studie wird die bakterielle Besiedlung von Vakuumversiegelungsschwämmen, deren Effluat und des Wundbettes, sowohl mit mikrobiologischen als auch mit molekularbiologischen Methoden, wie der Kombination von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sequenzierung (FISHseq), untersucht.

Material und Methoden: Dreißig hospitalisierte Patienten mit akuten oder chronischen Wundinfektionen wurden in die Studie eingeschlossen. Je nach Wundsituation wurde die Behandlung mittels NPWT (n=15) oder NPWTi-d (n=15) durchgeführt. Während eines Zyklus von NPWT und NPWTi-d wurden Gewebeproben des Wundgrundes sowie der einliegende Schwamm und das Effluat mittels Routine-Kulturmethoden und FISHseq untersucht.

Ergebnisse: Wir analysierten 22 akute und 8 chronische Wunden. Vor Beginn der NPWT oder NPWTi-d (Zeitpunkt TP1) wurden bei allen Patienten 58 bakterielle Besiedlungen nachgewiesen (monomikrobiell n=16, bimikrobiell n=7, drei, vier und fünf verschiedene Arten in n=2, n=3 bzw. n=2 Wunden). Nach der Therapie mit NPWT oder NPWTi-d (TP2) wurden 92,3 % (36/39) der im Effluat identifizierbaren Erreger auch im Schwamm und 94,9 % (37/39) im Wundbett nachgewiesen. In jedem Fall enthielten der Schwamm und das Effluat Erreger. Die Anwendung der NPWTi-d führte

zu einer statistisch signifikanten Reduzierung der Anzahl der nachgewiesenen Erregerspezies im Vergleich zur NPWT (NPWTi-d: TP1 versus TP2: $p=0,026$; NPWT: TP1 versus TP2: $p=0,317$ (ns)). Zum Zeitpunkt TP1 identifizierte die mikrobiologische kulturbasierte Nachweismethode nur 74,1 % der Bakterien im Wundbett. Durch den zusätzlichen Einsatz von FISHseq wurden 91,4 % der Bakterien identifiziert. Durch die Analyse aller drei Probenotypen (Gewebe, Schwamm und Effluat) und den Einsatz aller diagnostischen Methoden stieg die Identifizierung der Bakterien zum Zeitpunkt TP2 von 28/52 (53,8%) auf 50/52 (96,2%).

Diskussion: Das bei der NPWT oder NPWTi-d gewonnene Effluat wies eine bakterielle Besiedlung auf und könnte zu einer Rekontamination der Wunde führen. Alle Wunden und Schwämme blieben nach der Therapie kolonisiert. Dennoch konnte die Anzahl der Bakterienarten in der Wunde nach der NPWTi-d im Vergleich zur konventionellen NPWT deutlich reduziert werden. Die Analyse der nicht-planktonischen bakteriellen Lebensformen während der NPWT zeigt, dass auch nach kurzer NPWT-Zeit tendenziell weniger Mikrokolonien und Biofilme im Wundbett und Schwamm nachgewiesen werden können. Der entscheidende Vorteil der FISHseq ist die deutlich höhere Erregeridentifikation und die Möglichkeit zur Differenzierung zwischen planktonischen Bakterien, Mikrokolonien und Biofilmen in Gewebeproben.

Abstract (English)

Introduction: The aim of this study was to investigate the bacterial colonization of the effluent after retrograde irrigation of the vacuum sealing sponge during negative pressure wound therapy without instillation (NPWT) and with instillation (NPWTi-d). The question is whether the use of NPWTi-d results in recontamination of the wound with pathogens from the effluent. In this study, bacterial colonization of vacuum sealing sponges, their effluent and the wound bed, will be investigated using both microbiological and molecular biology methods, such as the combination of fluorescence in situ hybridization (FISH) with polymerase chain reaction (PCR) and sequencing (FISHseq).

Materials and Methods: Thirty hospitalized patients with acute or chronic wound infections were included in the study. Depending on the wound situation, treatment was performed by NPWT (n=15) or NPWTi-d (n=15). During one cycle of NPWT and NPWTi-d, tissue samples of the wound bed as well as the inserted sponge and effluent were examined using routine culture methods and FISHseq.

Results: We analyzed 22 acute and 8 chronic wounds. Before the start of NPWT or NPWTi-d (time TP1), 58 bacterial colonisations were detected in all patients (monomicrobial n=16, bimicrobial n=7, three, four and five different species in n=2, n=3 and n=2 wounds, respectively). After therapy with NPWT or NPWTi-d (TP2), 92.3% (36/39) of the pathogens identifiable in the effluent were also detected in the sponge and 94.9% (37/39) in the wound bed. In each case, the sponge and effluent contained pathogens. Use of NPWTi-d resulted in a statistically significant reduction in the

number of pathogen species detected compared to NPWT (NPWTi-d: TP1 versus TP2: $p=0.026$; NPWT: TP1 versus TP2: $p=0.317$ (ns)). At time TP1, the microbiological culture-based detection method identified only 74.1% of bacteria in the wound bed. The additional use of FISHseq identified 91.4% of the bacteria. By analyzing all three sample types (tissue, sponge, and effluent) and using all diagnostic methods, the identification of bacteria at time TP2 increased from 28/52 (53.8%) to 50/52 (96.2%).

Discussion: Effluent obtained from NPWT or NPWTi-d showed bacterial colonization and could lead to wound recontamination. All wounds and sponges remained colonized after therapy. Nevertheless, the number of bacterial species in the wound was significantly reduced after NPWTi-d compared with conventional NPWT. Analysis of non-planktonic bacterial life forms during NPWT showed that even after a short NPWT period, fewer microcolonies and biofilms tended to be detected in the wound bed and sponge. The key advantage of FISHseq is the significantly higher pathogen identification and the ability to differentiate between planktonic bacteria, microcolonies and biofilms in tissue samples.

1. Einleitung

1.1. Komplexität von Weichteil- und Knocheninfekten

Die Versorgung komplexer akuter und chronischer Wunden spielt im Leistungsspektrum eines Bundeswehrkrankenhauses eine herausragende Rolle. Die Tätigkeit als Chirurg in Einsatzgebieten der Bundeswehr erfordert ein hohes Maß an theoretischen und praktischen Kenntnissen zur Versorgung sowohl traumatischer als auch chronischer Wundverhältnisse. Dabei sollten einerseits aktuelle Studien und Leitlinien berücksichtigt werden. Andererseits tragen selbst gewonnene Erfahrungen zur adäquaten Behandlung verschiedenster komplexer Verletzungsmuster oder chronischer Erkrankungen bei. Regelmäßig werden im Bundeswehrkrankenhaus Berlin Kriegsversehrte aus Syrien, Libyen, dem Irak und insbesondere der Ukraine behandelt. Hierbei handelt es sich zumeist um Patienten mit traumatischen Verletzungsmustern der Extremitäten, welche häufig bereits im Heimatland operativ versorgt wurden. Zumeist werden die Patienten schließlich mit chronischen Wund- oder Knocheninfekten bei persistierenden Instabilitäten oder ausbleibender Knochenheilung zur Weiterversorgung zu uns verlegt. Um eine erfolgreiche Behandlung gewährleisten zu können, ist jedoch die Kenntnis über das genaue Keimspektrum der Wunden und des Knochens von herausragender Bedeutung. Ohne zielgerichtete Therapie nachweisbarer Bakterienspezies wird die knöcherne Rekonstruktion und plastische Deckung bestehender Weichteildefekte keinen dauerhaften Erfolg haben. Vor dem Hintergrund der beobachteten häufigen bakteriellen Multiresistenz der bei uns zu versorgenden Kriegsversehrten haben wir eine retrospektive wissenschaftlich fundierte Analyse des Erregerspektrums der Jahre 2012 bis 2015 vorgenommen. Hierbei wurden sowohl das Hygiene Screening als auch

Gewebeproben primär offener Wunden betrachtet. Im Ergebnis zeigten sich mehr als 40% der eingeschlossenen Patienten mit Erregern kolonisiert. Alle Kolonisationen wurden durch multiresistente Keime verursacht. Annähernd 90% der primär offenen Wunden waren kontaminiert. Etwa die Hälfte dieser kontaminierten Wunden zeigte den Nachweis von Multiresistenz bei einer 3-MRGN-, 4-MRGN-, ESBL- und MRSA-Situation. Dies unterstreicht um so mehr, dass zur Behandlung komplexer Verletzungsmuster mit schwerwiegenden Wund- und Knocheninfekten spezifische zielgerichtete antiseptische Strategien erforderlich sind.

1.2. Antiseptische Strategien

Bei Patienten mit schweren akuten oder chronischen Knochen- und Weichteilinfekten müssen von Beginn an klare Behandlungsstrategien festgelegt werden. Diese reichen von der Qualität des Débridements, über die zeitliche Planung bis zur Technik der Rekonstruktion von Knochen und Weichteilen.

Die immer häufiger auftretenden Kolonisationen und Wundkontaminationen mit multiresistenten Erregern, sowie die Entstehung und Behandlung von Biofilmen, stellen eine besondere Herausforderung in der Therapie dar und bedürfen spezieller antiinfektiöser Strategien.

Das gezielte chirurgische Debridement sollte zum frühestmöglichen Zeitpunkt im orthoplastischen Approach erfolgen. Ziel ist das Stoppen der Kontaminations-Infektions-Sequenz. Entscheidend ist das Verhindern einer Biofilmbildung durch Maßnahmen der Eradikation und Prävention. Antimikrobielle Substanzen sollten frühzeitig im Sinne einer systemischen präemptiven Therapie angewendet werden. Hier empfiehlt sich der Einsatz nach Prinzipien des Antibiotic Stewardship, also eine

im Rahmen streng rationaler Gesichtspunkte folgende, interdisziplinär vereinbarte, Therapiestrategie mit optimierter Dosierung (TDM). Die frühe plastische Defektdeckung wirkt sich positiv auf die Infekt- und Pseudarthrosenrate aus. Daher wird der endgültige Wundverschluss innerhalb einer Woche nach primärem Débridement empfohlen. Falls weitere chirurgische Maßnahmen erforderlich sind oder der Schweregrad der Infektion einen angestrebten Wundverschluss nicht zulässt, bieten die Negative Pressure Wound Therapy (NPWT) oder die Instillationstechnik (NPWTi-d) Möglichkeiten zur Reduktion der Keimlast bzw. zum Aufschub des endgültigen Wundverschlusses (1-3).

Derzeit werden zahlreiche neue Therapieansätze der Infektraten- und Biofilmreduktion erforscht. Dazu zählen unter anderem der Einsatz von Bakteriophagen, antimikrobiellen Peptiden und Enzymen wie z.B. Dispersin B (Störung der Kommunikation (= Quorum sensing) von Bakterien im Biofilm).

1.3. Bedeutung der Negative Pressure Wound Therapy (NPWT)

Die Negative Pressure Wound Therapy (NPWT) hat die Versorgung komplexer akuter und chronischer Wunden mit Weichteil- und Knochendefekten, insbesondere unter kontaminierten und septischen Bedingungen, grundlegend verändert. Seit ihrer Einführung in die klinische Praxis in den frühen 1990er Jahren hat die NPWT daher in allen Bereichen der Chirurgie und Dermatologie breite Anwendung gefunden (4, 5). Vereinfacht ausgedrückt, wird ein Unterdruck (in der Regel -75 bis -125 mmHg) auf den in die Wunde eingebrachten Schwamm ausgeübt. Die sofortige Versiegelung der Wunde mit einer luftdichten Klebefolie verhindert das spätere Eindringen von Luft aus der Umgebung. Die NPWT zieht die Wundränder zusammen, was zu einer Retraktion der Wunde führt. Darüber hinaus beschleunigt die NPWT die Bildung von

Granulationsgewebe in einem optimal feuchten Wundmilieu auf der Grundlage zellulärer Mikrodeformationen und erhöhter Angiogenese, entfernt kleine Gewebetrümmer und Wundexsudat durch Absaugen, reduziert druckbedingte interstitielle Ödeme mit konsekutiver Verbesserung der Mikrozirkulation, Stimulation des Blutflusses und der Oxygenierung (6, 7). Darüber hinaus ermöglicht die NPWT einen hygienischen Wundverschluss und isoliert die Wunde von Infektionen externen Ursprungs.

Ein weiterer wichtiger Pfeiler in der Wundbehandlung ist die Wundspülung, die in der Regel am Ende der Operation erfolgt und dann routinemäßig bei vielen Verbandwechseln durchgeführt wird. In der Regel werden wässrige Lösungen wie Wasser oder normale Kochsalzlösung verwendet, um die Faktoren, die die Wundheilung beeinträchtigen, zu mildern und Ablagerungen, Wundexsudate und schädliche zelluläre Produkte zu entfernen.

Seit 1996 kommt es zur technischen Umsetzung der Kombination dieser beiden Wundbehandlungsoptionen. Hierbei kommt als wichtige Weiterentwicklung des NPWT-Konzepts die retrograde Instillation einer topischen Lösung mit Entfernung durch alternierende Unterdruckzyklen zur Anwendung (8, 9). Die moderne NPWT ermöglicht somit die Instillation von Kochsalzlösung oder antiseptischer Lösungen in eine Wunde mit einer computergestützt exakt kontrollierten Instillationsmenge und lässt die Lösung für einen vom Anwender genau definierten Zeitraum in der Wunde verweilen, bevor die NPWT wieder aufgenommen wird. Dies erleichtert die regelmäßige Wundreinigung und Wundbettvorbereitung, ohne den Patienten oder das Pflegepersonal zu belasten. Mit computergesteuerten, programmierbaren Therapieeinheiten ist es möglich, die Therapie automatisch zu steuern

(Flüssigkeitsmenge, Dauer der Instillation, Verweildauer, Häufigkeit der Therapie usw.) (10).

Und in der Tat haben mehrere Studien gezeigt, dass es bei der Anwendung der NPWTi-d in Kombination mit der Instillation von Kochsalzlösung oder antiseptischen Lösungen im Vergleich zur konventionellen NPWT durchweg bessere klinische Ergebnisse zu erwarten gibt. Dies ist zurückzuführen auf eine verstärkte Bildung von Granulationsgewebe, die Reduktion der erforderlichen operativen Eingriffe, die kürzere Zeit bis zum endgültigen chirurgischen Eingriff mit Wundverschluss, die kürzere Verweildauer im Krankenhaus und den höheren Prozentsatz der vor der Entlassung geschlossener Wunden (11-15).

Mittlerweile wird die NPWT-i als Erstlinientherapie bei einer größeren Gruppe komplexer Wunden eingesetzt, da die computergestützte Applikation antiseptischer Lösungen einen hohen Nutzen und Komfort aufweist (16). Sowohl in vorangegangenen Studien als auch in der hier vorliegenden konnte gezeigt werden, dass die NPWTi-d sowohl frei lebende (planktonische) Bakterien als auch Biofilm-assoziierte (nicht-planktonische) Bakterien signifikant reduziert, während Wunden, die mit konventioneller NPWT oder mit offenen Wundverbänden behandelt wurden, diesen eindeutigen Effekt nicht zeigten (12, 17). Biofilm-assoziierte Bakterien können bei mikrobiologischen Routinemethoden übersehen werden und werden als Grund für das Versagen der Antibiotikatherapie diskutiert (18). So erscheint es verständlich, dass die jüngste internationale Leitlinie die Anwendung der NPWTi-d unter Verwendung von Kochsalzlösung oder antiseptischer Lösung als Instillationsflüssigkeit bei Wunden mit starker Keimbelastung und bei akut und chronisch infizierten Wunden mit hoher Wahrscheinlichkeit des Vorliegens eines Biofilms empfiehlt (16, 19).

1.4. Bakterielle Besiedlung von NPWT Polyurethan – Schwamm und Effluat

Die soeben beschriebenen Vorteile der NPWTi-d und Empfehlungen haben sich jedoch noch nicht ausreichend mit dem Fakt beschäftigt, dass der bei der NPWT und NPWT-i einliegende Schwamm dauerhaft von den in den Wunden vorhandenen Bakterien umspült und damit mit großer Wahrscheinlichkeit besiedelt ist (20-22).

Da der Schwamm bei der Anwendung der NPWTi-d mehrmals täglich retrograd gespült wird, muss davon ausgegangen werden, dass der der Schwamm ebenso ein Erregerreservoir für Bakterien darstellt. Von großem Interesse ist somit das Ausmaß und der Schweregrad der möglichen bakteriellen Rekontamination, welcher vom Schwamm und dessen Effluat ausgehen könnte. Bislang gibt es keine publizierten Studien, die die Effluat - Keimbelastung auswerten, um somit die bakterielle Rekontamination durch die repetitive retrograde Spülung des Schwammes nachzuweisen. Außerdem beschränkten sich frühere Untersuchungen der bakteriellen Schwammbesiedlung auf konventionelle mikrobiologische Methoden zum Nachweis von routinemäßig kultivierbaren Bakterien (22) .

Vor diesem Hintergrund haben wir in unserer Klinik im Rahmen eines Sonderforschungsprojektes das Ausmaß der Kontamination der NPWT- Schwämme bzw. das der möglichen bakteriellen Rekontamination der behandelten tiefen Wunden im Rahmen der NPWT bzw. NPWTi-d untersucht.

Ziel dieser prospektiv angelegten Studie und damit der Dissertation war die Beantwortung der folgenden Fragen:

- Kommt es im Polyurethanschwamm im Rahmen der NPWT von akuten und chronischen kontaminierten und infizierten Wunden zu einem Erregerreservoir?

- Sind die im NPWT-Schwamm nachgewiesenen Erreger identisch mit denen des Wundgrundes?
- Kann die ggf. vorliegende Erregermenge im Rahmen einer antiseptischen bakteriziden Spülung durch die Instillationstherapie (NPWTi-d) reduziert werden?
- Besteht eine Evidenz für eine Rekontamination der Wunde durch die Instillationstherapie (NPWTi-d)?
- Besteht ein Hinweis darauf, dass durch die NPWT das Wachstum neuer, initial nicht die Wunde kontaminierende, Keime hervorgerufen werden kann?

Als ein wichtiger pathophysiologischer Faktor in der Umsetzung antiinfektiöser Strategien und bei der erfolgreichen Behandlung akuter und chronischer Wunden ist es, das Vorhandensein von Biofilmen zu berücksichtigen (23). Die Entwicklung derartiger Biofilme wird unsererseits auch an den Polyurethanschwämmen im Rahmen der NPWT und NPWTi-d erwartet. Da Biofilme nicht durch die routinemikrobiologischen Untersuchungstechniken nachweisbar sind (23), wurden im Rahmen dieses Projektes neben den routinemikrobiologischen Methoden auch molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Bakterien im möglichen Biofilm zum Einsatz gebracht.

Zu dieser Studie wurde eine Publikation angefertigt und in einem *peer-reviewed TOP-Journal* eingereicht. Unsere Arbeit wurde am 08.02.2022 im Journal „*Plastic and Reconstructive Surgery*“ zur Veröffentlichung akzeptiert. Aktuell wird unsere Arbeit zum Druck in einer der nächsten Ausgaben vorbereitet. Diese Dissertationsschrift beleuchtet ausführlich deren Ergebnisse, ordnet diese in den Gesamtkontext ein und zeigt Empfehlungen für den krankenhausinternen Versorgungsalltag auf.

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign und Patientenpopulation

Unsere hier dargestellte prospektive Kohortenstudie wurde im Bundeswehrkrankenhaus Berlin in der Abteilung für Unfallchirurgie, Orthopädie und septisch-rekonstruktive Chirurgie, einem spezialisierten Zentrum für septische Defektwunden, durchgeführt. Wir schlossen 30 konsekutive Patienten mit akuten oder chronischen Weichteil- und Knocheninfektionen ein, die mit NPWT (n=15) oder NPWTi-d (n=15) behandelt wurden. Patienten, die jünger als 18 Jahre waren, wurden von der Studie ausgeschlossen. Die in Frage kommenden Patienten wurden vom Erstautor in die Studie eingeschlossen. Dabei wurden durch ihn in Abhängigkeit der klinischen Wundkonstellation die Indikation für NPWT oder NPWTi-d gestellt und die Zeitspanne bis zum ersten Wechsel des verwendeten Schwammes festgelegt (Tabelle 1). Die Studie wurde von der Ethikkommission Berlin genehmigt (EA1/055/15). Alle Patienten gaben nach ausführlicher Aufklärung durch den Erstautor über die Studie, die Studienziele, Datenerhebung und Verwendung der Daten ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie. Der erste zur Auswertung einbezogene Patient wurde am 02.06.2015 in die Studie eingeschlossen. Zum Zeitpunkt des 29.03.2018 war die Patientenakquise abgeschlossen. Mit der Auswertung aller gesammelten Daten wurde am 30.03.2018 begonnen.

Charakteristikum	NPWT n = 15	NPWTi-d n = 15
Lokalisation der Wunde		
Untere Extremität	13 (87%)	8 (53%)
Obere Extremität	2 (13%)	4 (27%)
Gesäß	0	2 (13%)
Stamm	0	1 (7%)
Wundart		
Akute Wunde	10 (67%)	12 (80%)
Chronische Wunde	5 (33%)	3 (20%)
Zeit von Schwammanlage bis 1. VAC Wechsel in Tagen (Median)	1 – 5 (3)	1 – 5 (2)

Tabelle 1: Wundcharakteristika der Gruppe 1 (NPWT) und Gruppe 2 (NPWTi-d)

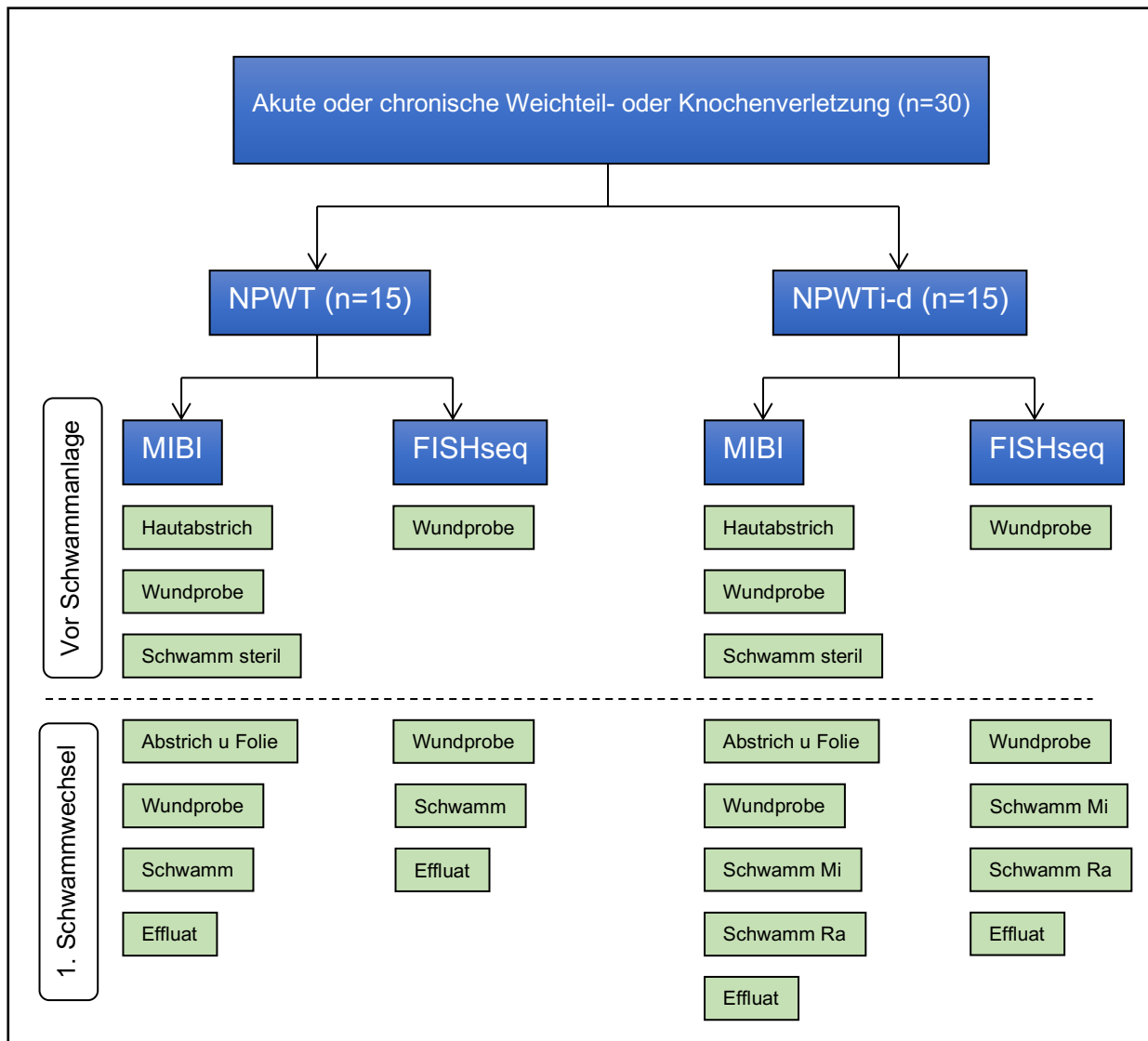
2.2. Literaturanalyse

Eine durch uns durchgeführte Literaturanalyse (Medline-Recherche, Stand 30.06.2018) zeigte einen Wissens-Pool von 3887 *peer-reviewed articles* mit Untersuchungen zur Erregermenge in den Schwämmen, die im Rahmen der Vakuumversiegelungstechnik eingesetzt werden. In der gesamten Literatur zur modifizierten Anwendung der NPWT in Kombination mit der Instillation (entweder NaCl oder antiseptische Flüssigkeiten = NPWTi-d) ergibt sich bisher kein Hinweis auf eine mikrobiologische Analyse des Effluates (Medline-Recherche, n=108 Artikel zu NPWTi-d, Stand 30.06.2018)

2.3. Probenentnahme und Analyse (Ablauf der Probengewinnung)

Bei allen Patienten wurde unmittelbar vor Beginn der Operation im Operationssaal eine Hautdesinfektion durchgeführt (Skinsept G, Ecolab, Monheim am Rhein, Deutschland, 3-minütige Einwirkung). Bei offenen Wunden wurden vor dem Kontakt mit einem Desinfektionsmittel Gewebeproben aus dem Wundbett entnommen, bei primär geschlossenen Infektionssituationen nach Inzision und Exploration des Infektionsbereichs (Zeitpunkt 1, TP1). Nach einem radikalen Wunddébridement zur Dekontamination der Wunde und zur Schaffung eines klinisch sauberen Wundbetts wurde die Wunde ausgiebig mit antiseptischen Lösungen (hypochlorige Säure/Natriumhypochlorit) gespült und anschließend in Abhängigkeit der Gruppenzuordnung mit NPWT oder NPWTi-d versiegelt. Als Referenz wurde eine sterile NPWT-Schwammprobe zur mikrobiologischen Diagnostik entnommen, bevor der Schwamm in die Wunde eingebracht wurde. Nach Entfernung des NPWT-Verbandes im Rahmen der 2. Operation (Zeitpunkt 2, TP2) wurden Schwamm- und Wundbettproben (aus dem zentralen Bereich der Wunde und vom Rand) entnommen. Darüber hinaus wurde in beiden Gruppen, bei NPWT und NPWTi-d, der Schwamm aus der Wunde entfernt und retrograd mit 20 ml NaCl unter sterilen Bedingungen gespült. Auf diese Weise wurde die computergesteuerte Instillationsphase der NPWTi d zur retrograden Spülung der gesamten Wunde simuliert. Die Flüssigkeit wurde durch den Verbindungsschlauch des NPWTi-d-Systems zurückgepumpt und das gewonnene Effluat wurde in sterilen Spritzen aufgefangen. Alle Proben wurden für die mikrobiologische und molekularbiologische Diagnostik verwendet. Zur genauen Beurteilung und Einordnung der gewonnenen Gewebeproben wurden zusätzlich zum Zeitpunkt TP1 ein Hautabstrich der Wundumgebung und zum Zeitpunkt TP2 ein

Hautabstrich unterhalb der Inzisionsfolie gewonnen und zur mikrobiologischen Diagnostik vorbereitet (Abbildung 1).



Schwamm Ra: Schwamm Rand // Schwamm Mi: Schwamm Mitte

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Probengewinnung

2.4. Technischer Teil der NPWT- und NPWTi-d-Anwendung

Die in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden durch den Erstautor oder durch ihn angeleitete ärztliche Kollegen im Operationssaal unmittelbar nach dem

ausgiebigen chirurgischen Débridement entweder mit einer NPWT (3M™ V.A.C.® Granufoam™ Dressing, St. Paul/Minnesota, USA) oder einer NPWTi-d (3M™ V.A.C.® Veraflo™ Dressing, St. Paul/Minnesota, USA) mit antiseptischer Instillationslösung (Natriumhypochlorit/hypochlorige Säure; HOCl; Granudacyn®, Wound Irrigation Solution NPWT, Mölnlycke®, Göteborg, Schweden) und einer Kontaktzeit der antiseptischen Lösung von 20 Minuten alle 6 Stunden versorgt. Je nach Ermessen des jeweiligen Chirurgen wurde ein kontinuierlicher Unterdruck von - 100 mmHg bis - 125 mmHg eingestellt.

2.5. Mikrobiologische Analyse

Im Mikrobiologischen Labor des Zentralen Instituts des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel, Außenstelle Berlin Abteilung I Medizin erfolgte unter der Leitung von Herrn Dr. med. Müller und Frau Dr. med. Gatzer die mikrobiologische Verarbeitung und Auswertung der intraoperativ gewonnenen Proben des Vakuumversiegelungsschwammes, der Gewebeproben, des Effluates, der Wundabstriche und der Hautabstriche.

Die Proben der Vakuumversiegelungsschwämme wurden in sterilen Gefäßen mit Schraubverschluss und die Gewebeproben in flüssigem Amies-Medium des eSwab™ Transportsystems (Fa. Copan Liquid Amies Elution Swab, eSwab™-Transportsystem, Brescia, Italien) innerhalb von 24 Stunden ins mikrobiologische Labor transportiert. Der Transport der Effluates erfolgte in einer Spritze, die mit einem Konus versehen wurde. Für die Wund- und Hautabstriche, entnommen mittels eines Nylon-Flockfaser-Abstrichtupfers, wurde ebenfalls das flüssige Amies-Medium des eSwab™-Transportsystems verwendet.

Die Anlage erfolgte unter der Sicherheitswerkbank (Herasafe® KSP12, Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA). Mit sterilem Skalpell wurden die Proben des Vakuumversiegelungsschwammes in einer sterilen Keramikschale zerteilt. Für die Kultivierung wurden Flüssigmedien verwendet, die mit je einem Schwammstück beschickt wurden: eine Brain-Heart-Infusion-Bouillon (Fa. BectonDickinson, Franklin Lakes/New Jersey, USA) zur Anreicherung aerober Erreger und eine Thioglykolat-Bouillon mit Vitamin K, Hämin und Agar (Fa. BectonDickinson, Franklin Lakes/New Jersey, USA) zur Anreicherung anaerober Erreger. Die Festmedien wurden im oberen Drittel mit dem Schwammstück unter leichtem Druck beimpft. Anschließend erfolgte ein fraktionierter Drei-Ösen-Ausstrich mit sterilen Einmalösen. Beimpft wurde in folgender Reihenfolge: Schädler-Agar (Fa. bioMérieux), Columbia-Kochblut-Agar (Fa. Oxoid), Columbia-Schafblut-Agar (Fa. Oxoid), MacConkey-Agar (Fa. Merck, Nährmedienherstellung Abteilung II des Zentralen Instituts des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel, Außenstelle Berlin) und chromogener Candida-Select-Agar (Fa. Mast, Nährmedienherstellung Abteilung II des Zentralen Instituts des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel, Außenstelle Berlin).

Die Gewebeproben wurden in ein Einwegmischgefäß mit Kochsalz und Edelstahlkügelchen (ProbeAX, Axonlab) gegeben und auf dem Dispergiergerät (IKA Ultra-TurrAX® Tube drive) aufgeschlossen. Mit einer sterilen Einmalpipette erfolgte die Beimpfung der Flüssig- und Festmedien mit je 2 Tropfen und anschließend eine Fraktionierung des Materials auf den Festmedien. Es wurden die gleichen Medien wie beim Vakuumversiegelungsschwamm verwendet.

Auch für die Anlage des Effluates mit einer sterilen Einmalpipette wurden die oben beschriebenen Flüssig- und Festmedien eingesetzt.

Die Abstrichtupfer im eSwab™-Transportsystem wurden zunächst auf dem Kreisschüttler (Vortex IKA® MS 3) durchmischt und anschließend wie eine Flüssigprobe mit einer sterilen Einmalpipette die Flüssig- und Festmedien beimpft.

Lediglich bei den Hautabstrichen wurden keine Flüssigmedien, kein Schädler-Agar und kein Columbia-Kochblut-Agar verwendet.

Die Inkubation der Schädler-Agar-Platte erfolgte in anaerober Atmosphäre bei 36±1°C für 5 Tage, Columbia-Kochblut-Agar wurde bei 36±1°C in 5% CO₂-Atmosphäre für 5 Tage und Columbia-Schafblut-Agar ebenfalls bei 36±1°C in 5% CO₂-Atmosphäre für 2 Tage bebrütet. Die Inkubation der übrigen Medien erfolgte bei 36±1°C in aerober Atmosphäre, die Flüssigmedien für 7 Tage, MacConkey-Agar für 2 Tage und Candida-Select-Agar für 3 Tage.

Die aerob bebrüteten Agarplatten wurden nach 18-24-stündiger und nach 2-tägiger Bebrütung beurteilt und die Menge jedes Erregers semiquantitativ bestimmt (reichlich, mäßig, vereinzelt, ganz vereinzelt). Candida-Select-Agar wurde abschließend erneut an Tag 3 begutachtet. Die Ablesung des anaerob bebrüteten Schädler-Agars erfolgte nach 5 Tagen parallel mit der bis Tag 5 weiter in 5% CO₂ inkubierten Columbia-Kochblut-Platte. Die Flüssigmedien wurden täglich auf Wachstumszeichen kontrolliert und bei Trübung Brain-Heart-Infusion-Bouillon auf Columbia-Colistin-Nalidixinsäure-Agar (Fa. BectonDickinson) zum selektiven Nachweis grampositiver Erreger und MacConkey-Agar zum selektiven Nachweis gramnegativer Erreger angelegt und erneut nach 24- und 48-stündiger Inkubation begutachtet. Bei Wachstumszeichen ab dem 3. Tag in der Thioglykolat-Bouillon wurden Schädler-Agar und Schädler-Kanamycin-Vancomycin-Agar (Fa. bioMérieux) zum selektiven Nachweis gramnegativer anaerober Erreger angelegt und anaerob bebrütet. Parallel wurde eine Columbia-Kochblut-Platte angelegt, die in 5% CO₂ inkubiert wurde. Die erneute

Begutachtung erfolgte nach 48 -72 Stunden. Die Flüssigmedien wurden abschließend nach 7 Tagen beurteilt. Bei der Beurteilung der Agarplatten wurden Reinkulturen direkt weiterverarbeitet. Bei unterschiedlichen Koloniemorphologien auf den Agarplatten erfolgte eine Subkultivierung, damit nach erneuter 24- bzw. 48stündiger Bebrütung von einer Reinheitskultur weitergearbeitet werden konnte. Für die Subkultur wurde das gleiche Medium, auf dem das Wachstum beobachtet wurde, verwendet.

Zur Identifizierung kam das kommerzielle automatisierte VITEK® 2 System (Fa. bioMérieux) zum Einsatz. Es handelt sich um eine Identifizierung mittels Überprüfung erregerspezifischer biochemischer und enzymatischer Leistungen. Im Labor wurden ergänzend manuelle Teste durchgeführt, der Nachweis von Cytochromoxidase (Bactident®, Fa. Merck), Clumpingfaktor (Staphaurex Plus*, Fa. Remel), Latex-Agglutinationstest für Streptokokken (Thermo Scientific™ PathoDextra™ Strep Grouping Kit, Fa. Thermo Fisher Scientific) und Katalase 3% (Catalase Reagent, Fa. VWR chemicals) durchgeführt.

Eine Empfindlichkeitstestung wurde von allen fakultativ pathogenen Erregern durchgeführt. Die Ermittlung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) erfolgte mittels kommerziellem, automatisiertem VITEK® 2 System oder mittels Agardiffusionstest. Der Auswertung lag die zum Zeitpunkt der Durchführung aktuelle Version der Breakpoint Tables des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) zu Grunde, die von der European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) festgelegt wird.

Die mikrobiologische Diagnostik wurde von den Medizinisch-Technischen Assistenten, die Überprüfung der Ergebnisse von den ärztlichen Mitarbeitern und die abschließende Validierung von einem Facharzt für Mikrobiologie/Labormedizin durchgeführt.

2.6. Molekularbiologische Analyse

Neben der zuvor ausführlich beschriebenen mikrobiologischen Analyse der Proben, wurde erstmals parallel auch eine molekularbiologische Analyse durchgeführt, um somit das Spektrum identifizierbarer Erreger zu erweitern. Hierzu wurden alle entnommenen Proben unmittelbar nach der OP oder nach nächtlicher Kühlung durch den Erstautor für den Transport an das Biofilmzentrum der AG Møter (Institut für Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Immunologie, Charité, Berlin / Deutschland) vorbereitet und anschließend gemäß den Richtlinien für Probentransport der Kategorie B versendet. Im Biofilmzentrum wurden die Proben schließlich durch Frau Prof. Dr. med. Møter und deren Mitarbeiterinnen molekularbiologisch analysiert. Die ausführlichen Ergebnisse wurden uns postalisch anonymisiert zugestellt.

Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

- Kulturunabhängige molekularbiologische Methode
- Sequenzabhängige Bindung von fluoreszenz-markierten Oligonukleotidsonden an die ribosomale rRNA von Bakterien = Hybridisierung
- Nach Bindung der markierten Sonden an RNA ist die Fluoreszenz mikroskopisch darstellbar
- Somit Darstellung und Visualisierung von Biofilm in einer Gewebeprobe möglich. Räumliche 3D Darstellung der Biofilmarchitektur mit Bakterien und EPS-Matrix = Nachweis des Biofilms (24)
- Identifikation des Leitkeims im Biofilm möglich

„Molekulare Analyse mittels FISHseq

FISHseq beschreibt die Kombination der molekularen Darstellung von Mikroorganismen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit 16S rRNA-Gen-PCR und anschließender Sequenzierung, beides aus aufeinanderfolgenden, in Methacrylat eingebetteten Gewebeschnitten.

Probeneinbettung und FISH

Die Gewebeproben wurden in FISHOpt®-Fixierlösung (MoKi Analytics, Berlin, Deutschland) fixiert und unter Verwendung von Kaltpolymerisationsharz (Technovit 8100; Kulzer, Wehrheim, Deutschland) eingebettet und wie zuvor beschrieben geschnitten (25). Die FISH-Analyse wurde gemäß (26) durchgeführt. Kurz gesagt, wurden die Schnitte mit der panbakteriellen Sonde EUB338Cy3 (27) hybridisiert, um die gesamte Bakterienpopulation sichtbar zu machen. Eine Nonsense-Sonde NON EUB338Cy5 (28) wurde verwendet, um unspezifische Sondenbindungen auszuschließen. Zur Visualisierung von Nukleinsäuren in Wirtszellkernen und Bakterien wurde DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-Dihydrochlorid) verwendet. In Fällen, in denen ein positives EUB338Cy3-Signal gefunden wurde, wurden spezifische Sonden, die mit Kultur- oder Sequenzierungsergebnissen in Verbindung standen, zur Bestätigung der mikrobiellen Befunde durch FISH verwendet. Für die Mikroskopie wurde ein Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 und AxioImager Z2; Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit Schmalbandfiltersätzen (AHF Analystechnik, Tübingen, Deutschland) verwendet. Die digitalen Bilder wurden mit der ZEN- und AxioVision-Software von Zeiss, Jena, erstellt.

Nachgewiesene Mikroorganismen wurden empirisch als planktonisch (einzelne Bakterien), Mikrokolonien (Cluster von bis zu 30 Mikroorganismen) oder Biofilme

(Gemeinschaften von mehr als drei Schichten benachbarter Bakterien über eine Länge von mehr als 20 µm) klassifiziert.

DNA-Extraktion, 16S rRNA-Gen-PCR-Amplifikation und Sequenzierung

Die DNA wurde aus aufeinanderfolgenden Abschnitten der eingebetteten Proben extrahiert, und die PCR wurde unter Verwendung der bakterienübergreifenden Primer TPU1 und RTU3 (29) für die Amplifikation des 16S rRNA-Gens durchgeführt (siehe Beschreibung (25). Die anschließende Sequenzierung der Amplikons wurde mit einem kommerziellen Sequenzierungsdienst (LGC Genomics, Berlin, Deutschland) durchgeführt und mit der kommerziellen Analysepipeline SmartGene (SmartGene, Lausanne, Schweiz) wie zuvor beschrieben analysiert (30).“ (Autoplagiat aus der Veröffentlichung 1, aus dem Englischen übersetzt)

2.7. Statistische Analyse

„Die gewonnenen Daten wurden analysiert und in Tabellen und Diagrammen zusammengestellt (Microsoft Excel 2010, Microsoft Corporation, Redmond/WA, USA; GraphPad Prism 9; GraphPad Software, Inc., San Diego/CA, USA). Statistische Analysen wurden mit SPSS® 25 für Windows® (IBM Corporation, Chicago/IL, U.S.A.) durchgeführt. Daten, die deskriptiv dargestellt werden sollten, wurden als Häufigkeit, Median mit 25. und 75. Parametrische Daten wurden mit dem T-Test, nichtparametrische Daten mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Die Analyse verknüpfter nichtparametrischer Daten wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde definiert als ein p-Wert von $\leq 0,05$.“ (Autoplagiat aus der Veröffentlichung 1, aus dem Englischen übersetzt)

3. Ergebnisse

Hinweis zu Autoplagiaten

In diesem Ergebnisteil werden nachfolgend die Kernresultate des Projektes zusammengefasst dargestellt. Es soll darauf hingewiesen werden, dass alle präsentierten Daten bereits in der im *peer-reviewed TOP- Journal „Plastic and Reconstructive Surgery“* akzeptierten und online veröffentlichten Publikation (Veröffentlichung 1) dargestellt wurden. Zitate sind gesondert gekennzeichnet.

3.1. Demografische Daten und Gruppenmerkmale

Das mittlere Alter der 26 männlichen und 4 weiblichen Patienten betrug 51 Jahre (24-91 Jahre). Bezüglich des Beginns der antibiotischen Therapie können die Patienten in 3 Gruppen eingeteilt werden. Bei 16 Patienten wurde die Antibiotikagabe bereits präoperativ vor der ersten Operation begonnen. [NPWT n=8, Median 2 Tage (1-50 Tage); NPWTi-d n=8, Median 3 Tage (1-16 Tage)]. Bei 3 Patienten erfolgte die intravenöse Antibiose am Tag der Operation bereits vor der Probenentnahme entweder in der Rettungsstelle oder sofort im OP. Ein Aufschub der antibiotischen Therapie hätte die Patienten sonst möglicherweise klinisch gefährdet. Bei 11 Patienten wurde die kalkulierte Antibiotikatherapie nach der Probenentnahme im Operationssaal festgelegt (NPWT n=4, NPWTi-d n=7). Insgesamt wurden 22 Patienten mit akuten und 8 Patienten mit chronischen Wunden in die Studie eingeschlossen. Dabei handelte es sich um 13 ausgedehnte Weichteilabszesse oder Phlegmonen an den Extremitäten und am Rumpf, fünf schwere Weichteil- und Knocheninfektionen, vier chronische Geschwüre aufgrund verminderter nutritiver Perfusion, drei akute implantatassoziierte Infektionen, zwei akute Schusswunden, zwei Bursitiden und ein Gelenkempyem

(Tabelle 1 und 2). „Die WBC- und CRP-Werte bei Patienten mit akuten Wunden betragen 12,0 (Median; 25%/75%-Quartil: 9,55/15,05) bzw. 73,7 (25%/75%-Quartil: 44,93/215,28) und bei Patienten mit chronischen Wunden 8,3 (Median; 25%/75%-Quartil: 7,85/9,63; $p=0,027$ gegenüber WBC bei akuten Wunden) bzw. 12,1 (25%/75%-Quartil: 9,13/49,1; $p=0,097$ (ns) gegenüber CRP bei akuten Wunden). In der NPWT-Gruppe betrug das Intervall bis zum Schwammwechsel 3 Tage (Median, 1-5 Tage) und in der NPWTi-d-Gruppe 2 Tage (Median, 1-5 Tage).“ (Autoplagiat aus der Veröffentlichung 1, aus dem Englischen übersetzt) Betrachtet man das Spektrum von Komorbiditäten oder Immunschwächeerkrankungen zeigt sich folgende Zusammensetzung. Sowohl in der Gruppe mit NPWT als auch NPWTi-d waren drei Patienten an HIV oder Hepatitis C erkrankt oder gaben einen regelmäßigen Drogenkonsum an. Bei der NPWT konnte im Vorfeld bei drei, bei der NPWTi-d bei fünf Patienten ein Diabetes mellitus Typ II oder eine pAVK diagnostiziert werden. Zum Zeitpunkt TP1 wurden 2,8 (Median; Bereich 1-4) und zum Zeitpunkt TP2 2,0 (Median; Bereich 1-4) Wundproben mittels mikrobiologischer Routineuntersuchung analysiert. Zusätzlich wurde eine molekularbiologische Untersuchung zum Zeitpunkt TP1 bei 1,3 (Median, Bereich 1-3) und zum Zeitpunkt TP2 bei 1,0 (Median, Bereich 1-2) Gewebeproben durchgeführt. Insgesamt wurden von allen 30 Patienten 235 Proben mit mikrobiologischen Routineverfahren und 145 Proben mit der FISHseq-Analyse untersucht, Die Proben für die molekularbiologische Untersuchung beinhalteten bis zu zwei Schwammproben (Schwammmitte und -rand), mindestens zwei Wundproben (TP1 und TP2) sowie das Effluat.

3.2. Bakterielle Besiedlung des Wundgrundes im Verlauf der Therapie

Durch den Einsatz von mikrobiologischen und molekularbiologischen Diagnostikverfahren konnten zum Zeitpunkt TP1 in allen 30 Wunden n=58 bakterielle Besiedlungen nachgewiesen werden (monomikrobiell n=16, bimikrobiell n=7, drei, vier und fünf verschiedene Arten in n=2, n=3 bzw. n=2 Wunden). *Staphylococcus aureus* (in n=17 Wunden), Enterobacterales (n=7) und koagulasenegative Staphylokokken (n=4) konnten als die häufigsten Erreger identifiziert werden. „Von den 58 Erregern bei TP1 konnten n=43 Erreger (43/58; 74,1%) mit der routinemäßigen mikrobiologischen kulturbasierten Nachweismethode und mit FISH seq. 53/58 (91,4 %) nachgewiesen werden.“ (Autoplagiat aus der Veröffentlichung 1, aus dem Englischen übersetzt) Die spezifische Bakterienart konnte durch FISHseq in nur 53 Fällen genau identifiziert werden. In den anderen Fällen war eine Differenzierung z.B. durch das Vorliegen nur kurzer DNA Sequenzen oder durch das Vorliegen von Mischsequenzen nicht möglich. „Zum Zeitpunkt TP2 konnte die Identifizierung von Bakterien in den Wundproben durch den zusätzlichen Einsatz der FISHseq von 28/52 (53,8%) auf 36/52 (69,2%) (n=52 Bakterien wurden in TP2 nachgewiesen) gesteigert werden.“ (Abbildung 4) (Autoplagiat aus der Veröffentlichung 1, aus dem Englischen übersetzt)

Zum Zeitpunkt TP2 konnte in keiner der 30 Wunden eine vollständige Dekontamination erzielt werden. Bei einem Patienten war der Erreger während des gesamten Prozesses nicht identifizierbar (Kultur negativ, DAPI teilweise positiv, FISH negativ, PCR keine Spezies nachgewiesen). 63,8 % (37/58) der zum Zeitpunkt TP1 am Wundgrund nachgewiesenen Erreger wurden auch zum Zeitpunkt TP2 am Wundgrund nachgewiesen (NPWT-Gruppe: 21/28 (75 %); NPWTi-d-Gruppe:16/30 (53,3 %) (Abbildung 2).

3.3. Der Schwamm als Erregerreservoir

„Von den bei TP2 am Wundgrund identifizierten Bakterien waren 84,4% (38/45) auch im Schwamm nachweisbar (NPWT-Gruppe: 76,9%; NPWTi-d-Gruppe: 94,7%; Abbildung 2). Umgekehrt konnten 90,7% (39/43) der im Schwamm identifizierbaren Erreger auch am Wundgrund nachgewiesen werden. In keinem Fall war der Schwamm frei von Erregern. Fünf Erreger, die in der Wundprobe (TP2) nicht nachweisbar waren (NPWT: n=1 (Clostridium perfringens), NPWTi-d: n=4 (Staphylococcus warneri, Pseudomonas sp., Proteus mirabilis, Acinetobacter sp.) konnten bei der Untersuchung des Schwammes neu nachgewiesen werden. Von diesen "neu" aufgetauchten Erregern war jedoch ein Erreger (Proteus mirabilis) bereits bei TP1 nachweisbar. Unabhängig von der Art der NPWT (mit oder ohne antiseptische Spülung) war ebenso kein Effluat frei von Bakterien. Von den im Schwamm identifizierbaren Erregern konnten 83,7 % (in beiden Gruppen 36/43) auch im Effluat nachgewiesen werden.

	NPWT n = 15 Patienten				NPWT i-d n = 15 Patienten			
	TP1	TP2			TP1	TP2		
	Wundgrund	Wundgrund	Schwamm	Effluat	Wundgrund	Wundgrund	Schwamm	Effluat
Anzahl der Wunden	n = 15				n = 15			
Anzahl der Bakterienarten	28	26	21	22	30	19	22	17
Mittelwert / Wunde	1.9	1.7	1.4	1.5	2.0	1.3	1.5	1.1
absolut versus TP1	. - .	26/28	21/28	22/28	. - .	19/30	22/30	17/30
relativ versus TP1 (%)	100%	92.9%	75.0%	78.6%	100%	63.3%	73.3%	56.7%
WG 2 (WG 1) - identisch	21/28 (75.0%)				16/30 (53.3%)			
- neu detektierte Erreger	5				3			
- nicht mehr nachweisbar	7				14			
Schwamm (WG 2) - identisch	20/26 (76.9%)				18/19 (94.7%)			
- neu detektierte Erreger	1				4			
- nicht mehr nachweisbar	6				1			
Effluat (Schwamm) - identisch	19/21 (90.5%)				17/22 (77.3%)			
- neu detektierte Erreger	3				0			
- nicht mehr nachweisbar	2				5			

Abbildung 2: Anzahl der Bakterienarten, die mit allen diagnostischen Methoden in beiden Gruppen (NPWT und NPWTi-d) nachgewiesen wurden. Dargestellt ist die Anzahl vergleichend in verschiedenen Proben (Wundgrund zum Zeitpunkt 1 (WG1), Wundgrund zum Zeitpunkt 2 (WG2), Schwamm und Effluat). (Quelle: In Anlehnung an Stichling et al., 2022, Veröffentlichung 1, Figure 2)

Umgekehrt konnten 92,3 % (36/39) der im Effluat identifizierbaren Erreger auch im Schwamm und 94,9 % (37/39) am Wundgrund nachgewiesen werden.“ (Autoplagiat aus der Veröffentlichung 1, aus dem Englischen übersetzt)

3.4. Wachstumsverhalten der Bakterien – planktonisch, Mikrokolonien, Biofilm

Mit Hilfe von FISHseq war es möglich, zwischen dem Vorhandensein von planktonischen Bakterien, Mikrokolonien und Biofilm in Gewebeproben (TP1 und TP2) und NPWT-Schwamm zu unterscheiden (Tabelle 2). Nachgewiesene Mikroorganismen wurden empirisch als planktonisch (einzelne Bakterien), Mikrokolonien (Cluster von bis zu 30 Mikroorganismen) oder Biofilme (Gemeinschaften von mehr als drei Schichten benachbarter Bakterien über eine Länge von mehr als 20 µm) klassifiziert. Biofilme wurde bei den Wundproben in drei der 22 akuten Wunden und in drei der acht chronischen Wunden nachgewiesen, Mikrokolonien in sechs der akuten und in zwei der chronischen Wunden. In den vier Fällen (akute Wunden), in denen Implantat-assoziierte Infektionen vorlagen, wurden in n=3 Fällen planktonische Bakterien und in einem Fall ein Biofilm nachgewiesen. Bei allen 30 Patienten wurde das Wachstumsverhalten der Bakterien in der Wunde und im

Schwamm untersucht. „So konnten zu TP1 in 16 Wunden planktonische Bakterien (NPWT: 9; NPWTi-d: 7), in 8 Wunden Mikrokolonien (NPWT: 2; NPWTi-d: 6) und in 6 Wunden Biofilm (NPWT: 4; NPWTi-d: 2) nachgewiesen werden.“ (Tabelle 2) (Autoplagiat aus der Veröffentlichung 1, aus dem Englischen übersetzt)

Zum Zeitpunkt TP2 (Wundgrund) wurden Mikrokolonien von 12 Bakterienarten und das Vorhandensein von planktonischen Bakterien für 21 Bakterienarten gefunden. Bei der Beobachtung des Wachstumsverhaltens der bakteriellen Besiedlung konnte gezeigt werden, dass von den acht Bakterienarten mit anfänglichem Vorhandensein eines Biofilms (bei 6 Patienten an TP1) nach der NPWT (TP2) in vier Fällen planktonische Bakterien, in zwei Fällen Mikrokolonien und in zwei Fällen weiterhin ein Biofilm nachgewiesen werden konnte. „Die Analyse des Schwammes (TP2) bei allen 30 Patienten ergab das Vorhandensein einer planktonischen Wachstumsform für 29 Bakterienarten bei 24 Patienten (NPWT: 14/15; NPWTi-d: 10/15), Mikrokolonien bei vier Patienten (NPWT: 0/15; NPWTi-d: 4/15) und Biofilm bei zwei Patienten (NPWT: 1/15; NPWTi-d: 1/15).“ (Tabelle 2) (Autoplagiat aus der Publikation, aus dem Englischen übersetzt) In diesen beiden Biofilm-Fällen konnten die Bakterienarten auch im Effluat durch mikrobiologische Routinekulturen nachgewiesen werden (Staphylococcus aureus n=2, Pseudomonas aeruginosa n=1).

3.5. Wirkung der antiseptischen NPWTi-d auf die bakterielle Wundkontamination

„Insgesamt zeigte die mikrobiologische und molekularbiologische Analyse der Gewebeproben beider Therapieformen eine signifikant reduzierte Anzahl von Erregerspezies vom Zeitpunkt TP1 zu TP2 ($p=0,012$). Die Anwendung von NPWTi-d führte zu einer statistisch signifikanten Verringerung der Anzahl der nachgewiesenen

3.6. Mehrwert durch alle Untersuchungsmaterialien und diagnostische Verfahren

Neben der Differenzierung des Wachstumsverhaltens der Bakterien (planktonisch, Mikrokolonien, Biofilm) besteht der zusätzliche Nutzen von FISHseq in der Identifizierung eines Leitpathogens nach Anzahl und Gewebsinvasivität bei Mischinfektionen. Auch die Unterscheidung von Kontamination und Infektion ist möglich, wenn Mikroorganismen nur auf der Außenseite einer Probe und Bakterien tief im Gewebe nachgewiesen werden. Der entscheidende Vorteil der molekularbiologischen Untersuchungstechniken in der vorliegenden Studie war jedoch

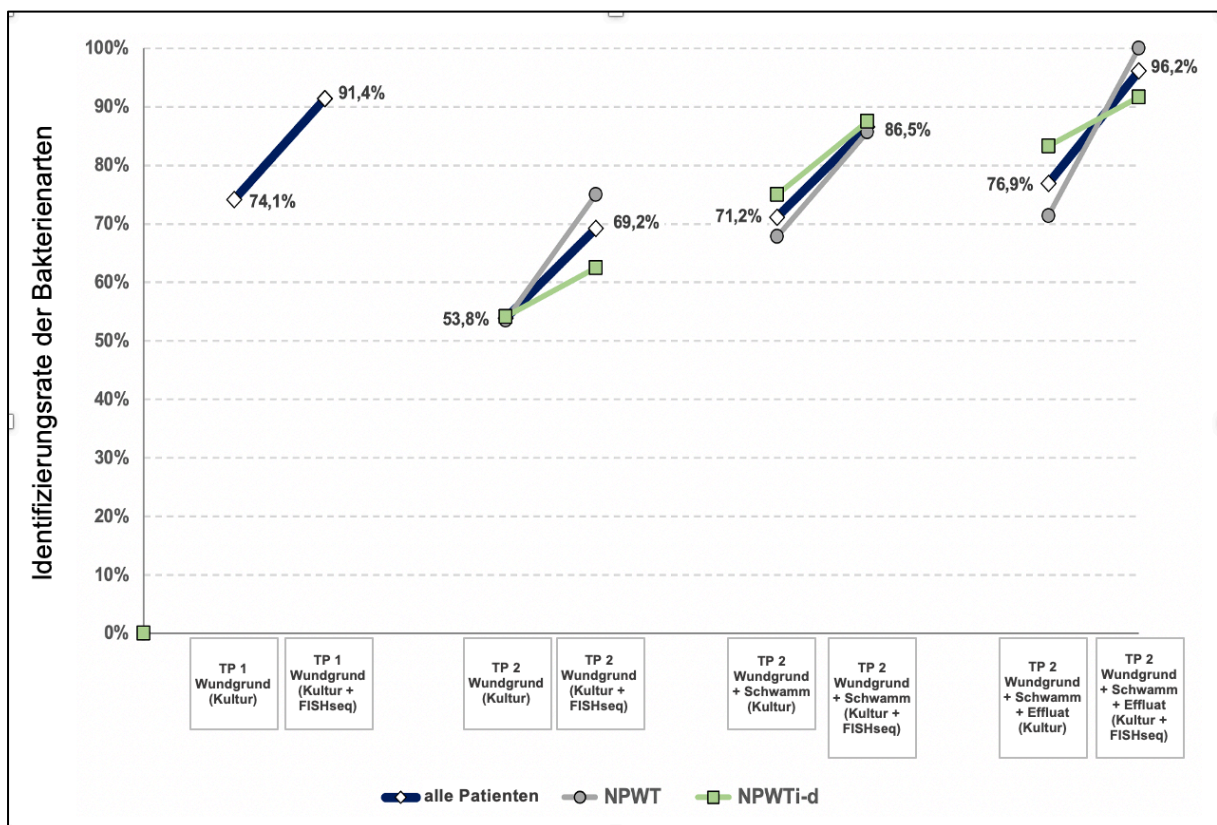


Abbildung 4: Häufigkeit des Nachweises der Bakterienspezies durch die zusätzliche Verwendung aller Wundgrundproben, Schwamm- und Effluatproben sowie die

Verwendung von mikrobiologischen und molekularbiologischen Standardmethoden (FISHseq).

der deutlich höhere Anteil an Erregeridentifikationen. So wurden in TP1 in allen 30 Wundbetten n=58 bakterielle Besiedlungen nachgewiesen (wobei die Bakterienarten nur in 53 Fällen endgültig identifiziert werden konnten). Davon konnten n=43 Erreger (43/58; 74,1%) mit der routinemäßigen mikrobiologischen kulturbasierten Nachweismethode identifiziert werden. Bei TP2 stieg durch die Analyse aller drei Probenotypen (Wundprobe, Schwamm und Effluat) und die Anwendung aller diagnostischen Methoden die Identifizierung von Bakterien von 28/52 (53,8 %) auf 50/52 (96,2 %). (Abbildung 4)

Art der Therapie	Diagnose und Wundverhältnisse	Antibiose	1. VAC Intervall	TP1 Wundgrund (Mibi und FISH)	TP2 Wundgrund (MIBI und FISH)	TP2 Schwamm (MIBI und FISH)	TP2 Effluat (MIBI und FISH)
NPWT	Phlegmone rechter Unterschenkel; Rötung, Schwellung, geschlossen. Akute Wunde.	1 d	2 d	vereinzeit <i>Staphylococcus aureus</i> (l.g.) Mikrokolonien (3 Proben für FISH; Nr. 1 DAPI Mikrokolonien, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Gemella</i> spp., PCR <i>Gemella morbillorum</i> ; Nr. 2 DAPI planktonisch, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Gemella</i> spp., PCR <i>Staphylococcus aureus</i> , Nr. 3 DAPI, FISH und PCR neg.)	vereinzeit <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (DAPI Fraglich planktonisch, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	vereinzeit <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	nach Anreicherung <i>Staphylococcus aureus</i> DAPI fraglich Bakterien, FISH und PCR neg.
NPWT	SSI nach CRIF; Rötung, Überwärmung, putride Sekretion, offen. Akute Wunde.	1 d	4 d	mäßig <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Finnegalia magna</i> (l.g.) planktonisch (2 Proben für FISH; Nr. 1 DAPI planktonisch, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Finnegalia magna</i> , PCR <i>Finnegalia magna</i> ; Nr. 2 DAPI planktonisch, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>Staphylococcus aureus</i> (l.g.), <i>Cloacibacterium normanense</i> planktonisch (2 Proben für FISH; Nr. 1 DAPI und FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Cloacibacterium normanense</i> ; Nr. 2 DAPI planktonisch, FISH und PCR neg.)	<i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	vereinzeit <i>Staphylococcus aureus</i> DAPI bacteria, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>
NPWT	Eitrige Burstitis olecrani; Rötung, Schwellung, Überwärmung, geschlossen. Akute Wunde.	prooperativ (Zeitspanne unklar)	2 d	vereinzeit <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> , PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	<i>Staphylococcus aureus</i> Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	nach Anreicherung <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch * (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR neg.)	vereinzeit <i>Staphylococcus aureus</i> DAPI Bakterien, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> , PCR neg.)
NPWT	Ventraler Unterschenkelabszess; Rötung, Überwärmung, putride Sekretion, offen. Akute Wunde.	per-operativ (single shot nach Probengewinnung)	2 d	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> (l.g.) Biofilm (2 Proben für FISH; Nr. 1 DAPI Biofilm, FISH <i>Fusobacterium nucleatum</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> , PCR <i>Fusobacterium nucleatum</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> ; Nr. 2 DAPI Biofilm, FISH <i>Fusobacterium nucleatum</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> , PCR <i>Fusobacterium nucleatum</i> und <i>Staphylococcus aureus</i>)	nach Anreicherung <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch * (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR neg.) Amalbins: Fusobacterium nucleatum	<i>Fusobacterium nucleatum</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR Mischsequenz mit Nachweis von <i>Fusobacterium nucleatum</i>)	<i>Fusobacterium nucleatum</i> DAPI Bakterien, FISH neg., PCR <i>Fusobacterium nucleatum</i>
NPW	DFS; Nekroseplatte, taucher initiiertes Rand offen. Chronische Wunde.	per-operativ (single shot vor Probengewinnung)	3 d	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	vereinzeit <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	vereinzeit <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	mäßig <i>Staphylococcus aureus</i> DAPI Bakterien, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> , PCR kurze Fragmente- Differenzierung nicht möglich)

Art der Therapie	Diagnose und Wundverhältnisse	Antibiose	1. VAC Intervall	TP1 Wundgrund (Mibi und FISH)	TP2 Wundgrund (Mibi und FISH)	TP2 Schwamm (Mibi und FISH)	TP2 Effluat (Mibi und FISH)
NPWT	Sepsis bei initiiertem Ulcus Unterschenkel links; überliegend, feucht, nekrotisch, Einschürnungen durch den Strumpf bis zum Knochen, offen. Chronische Wunde.	präoperativ in der NFA vor OP	3 d	vereinzelte <i>Proteus</i> spp., vereinzelte <i>Streptococcus gallolyticus</i> (I.g.), vereinzelte <i>Streptococcus constellatus</i> (I.g.), vereinzelte <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. Biofilm (DAPI Biofilm, FISH <i>Staphylococcus</i> spp. und <i>Streptococcus</i> spp., keine PCR aufgrund einer polymikrobiellen Infektion-Differenzierung nicht möglich)	reichlich <i>Streptococcus constellatus</i> , mäßig <i>Klebsiella oxytoca</i> , vereinzelte <i>Proteus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. Biofilm (DAPI Biofilm, FISH <i>Staphylococcus</i> spp. und <i>Streptococcus</i> spp., PCR Mischsequenz-Differenzierung nicht möglich)	reichlich <i>Klebsiella oxytoca</i> planktonisch ** (DAPI planktonisch, FISH panbakterielle Sonde pos., PCR Mischsequenz-Differenzierung nicht möglich) Anabahn: <i>Proteus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus constellatus</i>	reichlich <i>Klebsiella oxytoca</i> , mäßig <i>Streptococcus constellatus</i> , vereinzelte <i>Proteus</i> spp. DAPI Bakterien, FISH panbakterielle Sonde pos., PCR <i>Streptococcus constellatus</i> Anabahn: <i>Staphylococcus</i> spp.
NPWT	Weichteilinfektion nach proximaler Fibulfraktur, konservative Therapie, Rötung, Schwellung, Überwärmung, offen. Chronische Wunde.	50 d	5 d	planktonisch * (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR kurzes Fragment-Differenzierung nicht möglich) Anabahn: <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> planktonisch (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR <i>Enterobacteriaceae</i> spp.)	planktonisch * (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR neg.) Anabahn: <i>Enterobacteriaceae</i>	DAPI und FISH neg., PCR kurze Fragmente von DNA-Differenzierung nicht möglich Anabahn: <i>Enterobacteriaceae</i>
NPWT	Infizierte Wundrandnekrose Haut. Kniegelenk rechts mit Osteomyelitis; 7 x 5 cm messende serös sezernierende Wunde. Fibrinfäden, Nähmaterial eingeschlossen, offen. Akute Wunde.	postoperativ (TP 2; 5 Tage nach 1. OP)	5 d	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> (I.g.), reichlich <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (I.g.) Mikrokolonien (2 Proben für FISH; Nr. 1 DAPI Mikrokolonien, FISH neg., PCR neg.; Nr. 2 DAPI Mikrokolonien, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Pseudomonas</i> spp., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	mäßig <i>Staphylococcus aureus</i> (I.g.), mäßig <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (I.g.) Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH <i>Staphylococcus</i> spp. und <i>Pseudomonas</i> spp.)	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> (I.g.), reichlich <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (I.g.) Biofilm (DAPI Biofilm, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Pseudomonas</i> spp., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> (I.g.), reichlich <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (I.g.), vereinzelte <i>Finigoldia magna</i> DAPI Bakterien, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas</i> spp. und <i>Finigoldia magna</i>
NPWT	Ulcus cruris Unterschenkel links; bedeckt/offen. Chronische Wunde.	3 d	2 d	vereinzelte <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	vereinzelte <i>Staphylococcus epidermidis</i> planktonisch * (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR neg.) Anabahn: <i>Staphylococcus epidermidis</i>	vereinzelte <i>Staphylococcus epidermidis</i> planktonisch * (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR neg.)	vereinzelte <i>Staphylococcus epidermidis</i> DAPI Bakterien, FISH panbakterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus epidermidis</i>
NPWT	Spritzenabszess Unterschenkel rechts; 2 Abszesse 6 x 3 und 5 x 3 cm, puridre sezernierender Porus, offen. Akute Wunde	1 d	3 d	reichlich <i>Ekmanella corrodens</i> , reichlich <i>Prevotella</i> spp., reichlich vergnürende <i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> Biofilm (3 Proben für FISH; Nr. 1 DAPI Mikrokolonien; Nr. 2 DAPI Biofilm; Nr. 3 DAPI Mikrokolonien; Nr. 1-3 FISH <i>Prevotella</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. und <i>Ekmanella corrodens</i> , PCR Mischsequenz-keine Differenzierung möglich)	mäßig <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , mäßig <i>Ekmanella corrodens</i> , vereinzelte <i>Parvimonas nitra</i> , vereinzelte <i>Prevotella</i> spp. (I.g.), vereinzelte <i>Streptococcus constellatus</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH <i>Streptococcus</i> spp. und <i>Prevotella</i> spp., PCR <i>Prevotella</i> spp.)	nach Anreicherung <i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Prevotella</i> spp. (I.g.) planktonisch (DAPI planktonisch, FISH <i>Streptococcus</i> spp., PCR <i>Prevotella</i> spp.)	vereinzelte <i>Streptococcus constellatus</i> , vereinzelte <i>Ekmanella corrodens</i> planktonisch ** DAPI Bakterien, FISH panbakterielle Sonde pos., PCR Mischsequenz-Differenzierung nicht möglich

Art der Therapie	Diagnose und Wundverhältnisse	Anti-biose	1. VAC Intervall	TP1 Wundgrund (Mibi und FISH)	TP2 Wundgrund (Mibi und FISH)	TP2 Schwamm (Mibi und FISH)	TP2 Effluat (Mibi und FISH)
NPWT	Phlegmonöse Bursitis olecrani links; massive Schwellung, Rötung, Überwärmung, geschlossen. Akute Wunde.	peri- operativ (single shot nach Probengewinnung	1 d	reichlich <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , nach Anreicherung <i>kongulsusnegativer Staphylococci</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH pankaraterielle Sonde pos., PCR <i>Streptococcus dysgalactiae</i>)	planktonisch * (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR neg.) Annahme: <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	planktonisch * (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR kurzes Fragment von DNA-Differenzierung nicht möglich) Annahme: <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> DAPI Bakterien, FISH neg., PCR <i>Streptococcus dysgalactiae</i>
NPWT	Infilierte Pseudarthrose des rechten Schienbeins bei einer Schussfraktur; prätibiale geschwollene, gerötete Narbe, hämorrhagische Krusten, geschlossen. Chronische Wunde.	peri- operativ (single shot nach Probengewinnung	4 d	planktonisch * (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR kurzes Fragment- Differenzierung nicht möglich) Annahme: <i>Enterobacteriaceae</i>	planktonisch * (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR neg.) Annahme: <i>Enterobacteriaceae</i>	planktonisch * (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR neg.) Annahme: <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> DAPI fraglich Bakterien, FISH neg., PCR <i>Enterobacteriaceae</i> spp.
NPWT	Schrotschussfraktur Fuß rechts; Schwellung des Vorfußes, nicht entzündete Einschusswunden, geschlossen. Akute Wunde.	4 d	planktonisch * (2 Proben für FISH; Nr. 1 und 2 DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR neg.) Annahme: <i>Corynebacterium</i> spp.	nach Anreicherung <i>Staphylococcus haemolyticus</i> planktonisch * (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR neg.) Annahme: <i>Corynebacterium</i> spp.	planktonisch * (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR neg.) Annahme: <i>Corynebacterium</i> spp.	vereinzelt <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Corynebacterium</i> spp. DAPI Bakterien, FISH pankaraterielle Sonde pos., PCR <i>Corynebacterium</i> spp.	
NPWT	Empyem Sprunggelenk rechts; Rötung, Schwellung, offenes Ulkus mit grünlichem Belag, offen. Akute Wunde.	1 d	<i>Streptococcus pyogenes</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH pankaraterielle Sonde pos., PCR <i>Streptococcus pyogenes</i>)	<i>Streptococcus pyogenes</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR <i>Streptococcus pyogenes</i>)	<i>Streptococcus pyogenes</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR <i>Streptococcus pyogenes</i>)	<i>Streptococcus pyogenes</i> DAPI Bakterien, FISH neg., PCR <i>Streptococcus pyogenes</i>	
NPWT	Abszess rechter Unterschenkel; Rötung, Schwellung, geschlossen. Akute Wunde.	präoperativ in NFA vor OP	3 d	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> Biofilm (DAPI Biofilm, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> , PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> , PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	mäßig <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch * (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR neg.)	mäßig <i>Staphylococcus aureus</i> DAPI Bakterien, FISH pankaraterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>

Art der Therapie	Diagnose und Wundverhältnisse	Antibiose	1. VAC Intervall	TP1 Wundgrund (MIBI und FISH)	TP2 Wundgrund (MIBI und FISH)	TP2 Schwamm (MIBI und FISH)	TP2 Effluat (MIBI und FISH)
NPWT-d	Fistele Osteitis am rechten Ellenbogen; Nekroseplatte, serös sazierende Fistel, offen. Chronische Wunde.	16 d	5 d	mäßig <i>Staphylococcus epidermidis</i> (f.g.), vereinzelt <i>Bacillus cereus</i> , vereinzelt <i>Actinomyces odontolyticus</i> , vereinzelt <i>Streptococcus oralis</i> Mikrokolonien (2 Proben für FISH; Nr. 1 DAPI Mikrokolonien, Nr. 2 DAPI planktonisch; Nr. 1 und 2 FISH <i>Staphylococcus spp.</i> , PCR <i>Staphylococcus epidermidis</i>)	planktonisch* (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR neg.) Anzahlung: <i>Staphylococcus epidermidis</i>	planktonisch (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR Schwamm Mitte <i>Staphylococcus spp.</i> , PCR Schwamm Ecke neg.)	DAPI Bakterien, FISH neg., PCR neg. Anzahlung: <i>Staphylococcus epidermidis</i>
NPWT-d	Chronische Osteomyelitis der Ulna mit Fistel am rechten Unterarm; putride Sekretion, Rötung, Schwellung, offen. Chronische Wunde.	1 d	2 d	mäßig <i>Staphylococcus aureus</i> , nach Anreicherung <i>Staphylococcus epidermidis</i> , vereinzelt <i>Elkanella corrodens</i> , vereinzelt <i>Gemella morbillorum</i> Mikrokolonien* (2 Proben für FISH; Nr. 1 DAPI Mikrokolonien, Nr. 2 DAPI planktonisch, Nr. 1 und 2 FISH neg. und PCR neg.)	vereinzelt <i>Gemella morbillorum</i> , nach Anreicherung <i>Streptococcus gordonii</i> Mikrokolonien** (DAPI Mikrokolonien, FISH pankbakterielle Sonde pos., PCR kurze Fragmente-Differenzierung nicht möglich) Anzahlung: <i>Staphylococcus epidermidis</i>	vereinzelt <i>Streptococcus gordonii</i> , vereinzelt <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH <i>Staphylococcus spp.</i> und <i>Streptococcus spp.</i> , PCR Mischsequenz, kurze Fragmente-Differenzierung nicht möglich)	vereinzelt <i>Staphylococcus epidermidis</i>
NPWT-d	Unterschenkiegelmone rechts; Rötung, Schwellung, Überwärmung, geschlossen. Akute Wunde.	4 d	2 d	nach Anreicherung <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus spp.</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH pankbakterielle Sonde pos., PCR <i>Streptococcus spp.</i>)	planktonisch* (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR Mischsequenz-Differenzierung nicht möglich) Anzahlung: <i>Streptococcus spp.</i>	planktonisch* (Schwamm Mitte: DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR kurze Fragments-Differenzierung nicht möglich; Schwamm Rand: DAPI planktonisch, FISH neg., PCR neg.) Anzahlung: <i>Streptococcus spp.</i>	DAPI fraglich Bakterien, FISH neg., PCR neg. Anzahlung: <i>Streptococcus spp.</i>
NPWT-d	Abszess im Gesäßbereich rechts; Rötung, Schwellung, Überwärmung, eitrige Sekretion, offen. Akute Wunde.	2 d	2 d	reichlich <i>Escherichia coli</i> , reichlich <i>Klebsiella pneumoniae</i> , reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> (f.g.), <i>Lactobacillus spp.</i> Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Lactobacillus spp.</i> , PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	vereinzelt <i>Staphylococcus aureus</i> (f.g.), <i>Lactobacillus spp.</i> Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Lactobacillus spp.</i> , PCR <i>Lactobacillus spp.</i>)	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> Biofilm (Schwamm Mitte und Rand DAPI Biofilm, FISH pankbakterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> DAPI Bakterien, FISH pankbakterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>
NPWT-d	Infiziertes Ulcus mit Erysipel am osteomyelitischen Fußstumpf links; Rötung, Schmerzen, geschlossen. Akute Wunde.	4 d	4 d	<i>Anaerococcus spp.</i> planktonisch (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR <i>Anaerococcus spp.</i>)	vereinzelt <i>Corynebacterium spp.</i> planktonisch* (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR neg.)	reichlich <i>Corynebacterium tuberculoostearum</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> planktonisch (Schwamm Mitte: DAPI planktonisch, FISH neg., PCR Mischsequenz-Differenzierung nicht möglich; Schwamm Rand: DAPI planktonisch, FISH <i>Pseudomonas spp.</i> , PCR <i>Corynebacterium tuberculoostearum</i>)	reichlich <i>Corynebacterium tuberculoostearum</i> DAPI fraglich Bakterien, FISH neg., PCR <i>Corynebacterium tuberculoostearum</i>

Art der Therapie	Diagnose und Wundverhältnisse	Antibiose	1. VAC Intervall	TP1 Wundgrund (Mibi und FISH)	TP2 Wundgrund (Mibi und FISH)	TP2 Schwamm (Mibi und FISH)	TP2 Effluat (Mibi und FISH)
NPWT-d	Chronische Wundheilungsstörung nach Unterschenkelamputation mit pAVK; feuchte Nekroseplatte, offen. Chronische Wunde.	postoperativ (erster postoperativer Tag)	2 d	reichlich <i>Proteus mirabilis</i> , reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Anaerococcus spp.</i> Biofilm (DAPI Biofilm, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> , PCR <i>Anaerococcus spp.</i>)	mäßig <i>Staphylococcus aureus</i> Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> , PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	mäßig <i>Staphylococcus aureus</i> , mäßig <i>Proteus mirabilis</i> , mäßig <i>Acinetobacter spp.</i> Mikrokolonien (Schwamm Mitte: DAPI planktonisch, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i> ; Schwamm Rand: DAPI planktonisch, FISH parbakterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	mäßig <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Ug.</i>), mäßig <i>Proteus mirabilis</i> DAPI Bakterien, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> , PCR <i>Proteus mirabilis</i>
NPWT-d	Knochenmarkphlegmone Radius rechts bei Abszess, Rötung, Schwellung, Überwärmung, eitrige Sekretion, offen. Akute Wunde.	1 d	2 d	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> , PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	vereinzelte <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH parbakterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	vereinzelte <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (Schwamm Mitte: DAPI planktonisch, FISH parbakterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus aureus</i> ; Schwamm Rand: DAPI planktonisch, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	vereinzelte <i>Staphylococcus aureus</i> DAPI Bakterien, FISH parbakterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>
NPWT-d	Abszess linker Fuß; Rötung, Schwellung, Überwärmung, eitrige Sekretion, offen. Akute Wunde.	perioperativ (single shot nach Probengewinnung)	2 d	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch * (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR neg.)	vereinzelte <i>Staphylococcus aureus</i> Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH parbakterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	vereinzelte <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (Schwamm Mitte und Rand: DAPI planktonisch, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	mäßig <i>Staphylococcus aureus</i> DAPI Bakterien, FISH parbakterielle Sonde pos., PCR neg.
NPWT-d	Schussfraktur Humerus links; Schusskanal offen, keine Entzündung. Akute Wunde.	perioperativ (single shot nach Probengewinnung)	3 d	planktonisch * (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR neg.)	planktonisch * (DAPI planktonisch, FISH neg., PCR neg.)	planktonisch * (Schwamm Mitte: DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR neg.; Schwamm Rand: DAPI planktonisch, FISH neg., PCR kurzes Fragment-Differenzierung nicht möglich)	DAPI fraglich Bakterien, FISH neg., PCR Mischsequenz-Differenzierung nicht möglich
NPWT-d	Subkutaner Abszess in der Kniekehle beidseits; Rötung, Schwellung, Überwärmung, eitrige Sekretion, offen. Akute Wunde.	perioperativ (single shot nach Probengewinnung)	3 d	vereinzelte <i>Peptoniphilus horei</i> , vereinzelte <i>Atopobium spp.</i> , vereinzelte <i>Citrobacterium acnes</i> planktonisch * (DAPI fraglich planktonisch, FISH neg., PCR kurzes Fragment-Differenzierung nicht möglich)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH parbakterielle Sonde pos., PCR Mischsequenz-Differenzierung nicht möglich)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> planktonisch (Schwamm Mitte: DAPI planktonisch, FISH neg., PCR <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; Schwamm Rand: DAPI planktonisch, FISH parbakterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus epidermidis</i>)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> DAPI Bakterien, FISH parbakterielle Sonde pos., PCR neg.
NPWT-d	Postoperativer Hüftgelenkabszess nach periprotetischer Frakturbehandlung; Rötung, Schwellung, Überwärmung, geschlossen. Akute Wunde.	perioperativ (single shot nach Probengewinnung)	1 d	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH parbakterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> planktonisch (DAPI planktonisch, FISH <i>Staphylococcus aureus</i> , PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	reichlich <i>Staphylococcus aureus</i> Mikrokolonien (Schwamm Mitte und Rand: DAPI Mikrokolonien, FISH parbakterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>)	mäßig <i>Staphylococcus aureus</i> DAPI Bakterien, FISH parbakterielle Sonde pos., PCR <i>Staphylococcus aureus</i>

Art der Therapie	Diagnose und Wundverhältnisse	Antibiose	1. VAC Intervall	TP1 Wundgrund (MIBI und FISH)	TP2 Wundgrund (MIBI und FISH)	TP2 Schwamm (MIBI und FISH)	TP2 Effluat (MIBI und FISH)
NPWTi-d	Phlegmone Oberschenkel rechts. Akute Wunde.	4 d	4 d	<p>Streptococcus pyogenes</p> <p>planktonisch (DAPI planktonisch, FISH Streptococcus spp., PCR Streptococcus pyogenes)</p>	<p>Streptococcus pyogenes</p> <p>planktonisch (DAPI planktonisch, FISH Streptococcus spp., PCR Streptococcus pyogenes)</p>	<p>Streptococcus pyogenes</p> <p>planktonisch (Schwamm Mitte und Rand: DAPI planktonisch, FISH neg., PCR Streptococcus pyogenes)</p>	<p>Streptococcus pyogenes</p> <p>DAPI Bakterien, FISH panbakterielle Sonde pos., PCR Streptococcus pyogenes</p>
NPWTi-d	Postinterventionelle Phlegmone am Gesäß: direkt nach Injektion; Schwellung, geschlossen, Akute Wunde.	2 d	4 d	<p>vereinzelte Staphylococcus aureus</p> <p>Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH panbakterielle Sonde pos., PCR Staphylococcus aureus)</p>	<p>Staphylococcus aureus</p> <p>Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH Staphylococcus aureus, PCR Staphylococcus aureus)</p>	<p>vereinzelte Staphylococcus aureus</p> <p>Mikrokolonien (Schwamm Mitte: DAPI Mikrokolonien, FISH panbakterielle Sonde pos., PCR Staphylococcus aureus; Schwamm Rand: DAPI Mikrokolonien, FISH neg., PCR Staphylococcus aureus)</p>	<p>vereinzelte Staphylococcus aureus</p> <p>DAPI Bakterien, FISH neg., PCR Staphylococcus aureus</p>
NPWTi-d	SSI nach Plattenosteozythese Klavikula; Rötung, Schwellung, Überwärmung, eitrige Sekretion, offen. Akute Wunde.	peroperativ (single shot nach Probengewinnung	3 d	<p>reichlich Staphylococcus aureus</p> <p>Biofilium (DAPI Biofilium, FISH Staphylococcus aureus, PCR Staphylococcus aureus)</p>	<p>vereinzelte Staphylococcus aureus</p> <p>Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH neg., PCR Staphylococcus aureus)</p>	<p>mäßig Staphylococcus aureus</p> <p>planktonisch (Schwamm Mitte und Rand: DAPI planktonisch, FISH neg., PCR Staphylococcus aureus)</p>	<p>mäßig Staphylococcus aureus</p> <p>DAPI Bakterien, FISH panbakterielle Sonde pos., PCR Staphylococcus aureus</p>
NPWTi-d	Unterschenkelabszess rechts, Rötung, Schwellung, feuchte Nekrose, offen. Akute Wunde.	peroperativ (single shot nach Probengewinnung	2 d	<p>reichlich Staphylococcus aureus</p> <p>Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH panbakterielle Sonde pos., PCR Staphylococcus aureus)</p> <p>Abnahme: Enterococcus faecalis</p>	<p>vereinzelte Staphylococcus aureus (i.B.), nach Anreicherung</p> <p>Enterococcus faecalis</p> <p>Mikrokolonien (DAPI Mikrokolonien, FISH panbakterielle Sonde pos., PCR Staphylococcus aureus)</p>	<p>vereinzelte Staphylococcus aureus</p> <p>Mikrokolonien (Schwamm Mitte: DAPI Mikrokolonien, FISH panbakterielle Sonde pos., PCR Staphylococcus aureus; Schwamm Rand: DAPI planktonisch, FISH neg., PCR Staphylococcus aureus)</p> <p>Abnahme: Enterococcus faecalis</p>	<p>vereinzelte Staphylococcus aureus (i.B.), vereinzelte Enterococcus faecalis</p> <p>DAPI Bakterien, FISH panbakterielle Sonde pos., PCR Staphylococcus aureus</p>

Tabelle 2 Demographische Daten, Wundbedingungen und bakterielle Besiedlung des Wundgrundes (TP1 und TP2), des Schwammes (TP2) und des Effluates (TP2) in beiden Gruppen (NPWT (n=15) und NPWTi-d (n=15))

- *NPWT: Unterdruck-Wundtherapie // NPWTi-d: Unterdruck-Wundtherapie mit Instillation und Verweildauer*
- *Der fettgedruckte schwarze Text bezeichnet die alleinigen Ergebnisse der mikrobiologischen Diagnostik*
- *Die blauen kursiven Angaben zeigen gemeinsame Ergebnisse der mikrobiologischen und molekularbiologischen Diagnostik an*
- *Der fettgedruckte rote Text zeigt an, welche Ergebnisse als zusätzlicher Nutzen von PCR- und FISH-Tests angesehen werden können*
- *Der fettgedruckte grüne Text gibt an, welche zusätzlichen Ergebnisse dem Kontext folgend hochwahrscheinlich sind*
- ** Bei FISH Nachweis von planktonischen Bakterien oder Mikrokolonien ohne Nachweis von Bakterienaktivität*
- *** Bei FISH panbakterielle Sonde positiv, aktive Bakterien, Differenzierung nicht möglich*

4. Diskussion

4.1. Grundlegende Fragen und Hauptaussagen

Ziel dieser Studie war es, die Keimbelastung des Effluats nach retrograder Spülung des NPWT-Schwammes zu untersuchen. Der Grund dafür war die Frage, ob die Verwendung von NPWT und NPWTi-d zu einer Rekontamination mit in der Wunde nachgewiesenen oder neu gebildeten Krankheitserregern führt. „Unseres Wissens ist unsere Studie die erste, die die Keimbelastung und die Bildung von Organismen in NPWT-Schwämmen und deren Effluat sowie am Wundgrund analysiert, und zwar sowohl mit standardmäßigen kulturellen mikrobiologischen als auch mit molekularbiologischen Methoden wie FISHseq.“ (Autoplagiat aus der Publikation, aus dem Englischen übersetzt) Das wichtigste Ergebnis ist, dass alle NPWT-Schwämme und Effluate ausnahmslos mit Bakterien besiedelt waren und die Bakterienbelastung der Effluate weitgehend den in den Schwämmen und Wundbetten nachgewiesenen Bakterienarten entsprach. Daher werden unserer Einschätzung nach bei der NPWT mit Instillation (NPWTi-d), selbst wenn eine antiseptische Spüllösung verwendet wird, die Erreger aus dem Schwamm zurück in die Wunde gespült. Dennoch reduzierte die antiseptische NPWTi-d das Ausmaß des bakteriellen Spektrums des Wundgrundes deutlich. Die Analyse der nicht-planktonischen bakteriellen Lebensformen während der NPWT zeigt, dass auch nach kurzer NPWT-Zeit tendenziell weniger Mikrokolonien und Biofilme im Wundgrund und im Schwamm zu finden sind. Um eine möglichst genaue Aussage über die tatsächliche Wundgrundbesiedlung treffen zu können, war die Kombination aus mikrobiologischer und molekularbiologischer Analyse der Gewebeproben, des Schwammes und des Effluats sinnvoll. Die gleichzeitige Anwendung von mikrobiologischen und molekularbiologischen Routinemethoden zur Analyse der bakteriellen Besiedlung stellte einen Mehrwert dar, indem das gesamte

Infektionsspektrum erfasst wurde. Bei keiner der getesteten NPWT-Bedingungen traten unerwünschte Ereignisse auf.

4.2. Interpretation der Ergebnisse

In dieser Studie konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Effluat von NPWT-Schwämmen eine hohe bakterielle Keimbelastung aufweisen, die in die Wunde zurückgespült wird. Obwohl die Anzahl der verschiedenen Bakterienarten pro Patient in der NPWTi-d-Gruppe signifikant geringer war, konnte die antiseptische Instillationsflüssigkeit weder im Effluat noch im Schwamm oder im Wundgrund einen bakterienfreien Zustand herstellen. Dies galt zumindest für das kurze Therapieintervall von knapp drei Tagen. Letztlich muss sich der Behandler bewusst sein, dass bei der Anwendung der NPWT mit Instillation auf einer infizierten Wunde Bakterienpopulationen bewegt werden, wodurch ein Teil der den Schwamm besiedelten Erreger zurück in die Wunde gespült wird. Dieses Ergebnis war eigentlich zu erwarten, da andere Studien bereits gezeigt hatten, dass der Schwamm im Zusammenhang mit der NPWT einer hohen bakteriellen Belastung ausgesetzt ist. Sowohl die Arbeiten von Anagnostakos et al. als auch von Yusuf et al. konnten einen hohen prozentualen Anteil der verwendeten NPWT Schwämme mit bakterieller Besiedlung nachweisen (mono- und polymikrobiell) (20, 22).

Unsere Ergebnisse zeigten, dass alle der zum Einsatz gebrachten Schwämme im Rahmen der NPWT und NPWTi-d kolonisiert waren, davon 70 % monomikrobiell und 30 % polymikrobiell. Somit ergibt sich zu den Ergebnissen der zuvor vorgestellten beiden Studien eine gewisse Diskrepanz in Bezug auf den Bakteriennachweis in den Schwämmen. Aus unserer Sicht kann durch den Einsatz zusätzlicher

molekularbiologischer Diagnosemethoden die bakterielle Besiedlung durch anspruchsvolle oder ruhende Bakterien, die sonst unerkennbar geblieben wären, sensitiver nachgewiesen werden.

In unseren 30 NPWT-Schwämmen konnten in Übereinstimmung mit den Arbeiten anderer Autoren *Staphylococcus aureus* (n=14), *Staphylococcus epidermidis* (n=5) und *Enterobacteriaceae* (n=5), *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus pyogenes* (je n=2) als die häufigsten Erreger identifiziert werden (20, 22).

Obwohl diese Studie auch zeigte, dass eine vollständige Sterilität der Wunden nach einem NPWT-Intervall von ca. 3 Tagen nicht erreicht wurde, zeigte die Vakuumversiegelungstherapie im Allgemeinen dennoch einen signifikanten Rückgang der Anzahl der im Wundgrund identifizierten Bakterienarten bei TP1. Dieser Rückgang, der in der NPWT-Gruppe zu einer Reduktion um etwa ein Viertel führte, war in der Instillationsgruppe mit der antiseptischen Flüssigkeit (NPWTi-d) deutlich höher und betrug etwa die Hälfte. Darüber hinaus wies die NPWT-Gruppe eine höhere Inzidenz neu nachgewiesener Erreger auf. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Fälle mit neu nachgewiesener Kolonisation nach der Behandlung bereits bei TP1 infiziert waren, die Erreger aber unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Generell war auffällig, dass ein Großteil der ursprünglich nachgewiesenen Erreger nach der Therapie (TP2) nicht nur in der Wunde, sondern auch im NPWT-Schwamm und im Effluat nachweisbar war.

Ausgehend von den Ergebnissen einer Studie an Schweinewunden, die mit humanem *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* beimpft wurden, wurde Mitte der 1990er Jahre eine Verringerung der Keimzahlen pro Gramm Gewebe während der NPWT festgestellt (31). Auf der Grundlage dieser Arbeit hatte sich die Annahme durchgesetzt, dass die NPWT die bakterielle Belastung in der Wunde kontrolliert oder

deutlich reduziert. Keine nachfolgende klinische Studie war jedoch in der Lage, diese frühen In-vivo-Ergebnisse von Morykwas et al. zu bestätigen.

„Darüber hinaus hatten Yusuf et al., wie bereits erwähnt, eine hohe Keimzahl im Schwamm nach NPWT nachgewiesen, aber gleichzeitig keine Gewebeproben aus der Wunde entnommen (22). Auf der Grundlage dieser Arbeit hatte sich in der Folge die Wunschvorstellung durchgesetzt, dass sich die Erreger im NPWT-Schwamm wie in einem "Staubsaugerbeutel" sammeln würden, so dass die Wunde "sauber" werden würde.“ (Autoplagiat aus der Veröffentlichung¹, aus dem Englischen übersetzt)

Andere Forschergruppen haben jedoch bereits gezeigt, dass die Erreger im Verlauf der NPWT-Therapie in der Wunde verbleiben. So beobachteten Moues et al. am Ende der NPWT-Therapie (nach ca. 6 Tagen) bei 11 von 26 Wunden (42 %) eine bakterielle Belastung des Wundgrundes mit einer Menge von immer noch mehr als 105 KBE/Gramm Gewebe (32). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch in den Arbeiten von Lalliss et al. und Braakenburg et al. (33, 34). Die Persistenz der Keimbelastung im Wundgrund und im Schwamm widerspricht somit der scheinbaren Hypothese eines Staubsaugereffekts auf dem NPWT-Schwamm. Die Ergebnisse unserer Studie bestätigen nun nicht nur die Persistenz der Erreger in der Wunde und im Schwamm während des Verlaufs der NPWT, sondern auch, dass bei der NPWTi-d die Erreger bei jedem Instillationszyklus hin- und hergespült werden und somit die Wunde wiederholt "rekontaminieren" können.

Unsere eigenen Beobachtungen weisen die Hypothese zurück, dass die NPWT eine Verschiebung der Bakterienspezies hin zu Biofilm-produzierenden Organismen wie *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* induziert, wie einige Autoren berichteten (32, 35, 36). Ebenso konnten im Gegensatz zu einer früheren Studie (37)

keine auffälligen Veränderungen in der Häufigkeit von grampositiven und gramnegativen Bakterien nach NPWT festgestellt werden.

Nach der neueren Literatur zur Unterdruck-Wundtherapie mit Instillation gibt es einen Trend zu einer reduzierten Keimbelastung bei antiseptischer NPWTi-d im Vergleich zur NPWT mit normaler Kochsalzlösung (38, 39). Unsere Entscheidung für die Instillation von superoxidiertem Wasser (SOD, Natriumhypochlorit/hypochlorige Säure) im Vergleich zu anderen möglichen topischen Lösungen, einschließlich Polyhexanid oder Kochsalzlösung, beruhte in erster Linie auf den Ergebnissen zuvor veröffentlichter Studien, in denen die Instillation einer antimikrobiellen Lösung in bakteriell besiedelte Wunden, die mit NPWTi-d behandelt wurden, beschrieben wurde (40, 41). Es wurde davon ausgegangen, dass SOD ein geeignetes topisches Reinigungsmittel sein würde, da umfangreiche Untersuchungen gezeigt haben, dass SOD eine mikrobiozide Wirkung auf ein breites Spektrum von Bakterien, Hefen und Viren hat und nicht zytotoxisch für Knorpel und Nervenstrukturen ist (42, 43). Die antiseptische Wirkung von NPWTi auf die bakterielle Wundkontamination war in unserer Arbeit jedoch geringer als ursprünglich erwartet. In der NPWTi-d-Gruppe ist es im Vergleich zur NPWT-Gruppe beim ersten Schwammwechsel zu einer signifikanten Verringerung der Bakterienarten im Wundgrund gekommen. Dennoch konnten auch weiterhin Bakterien nachgewiesen werden. Bei keinem Wundbett konnte nach dem ersten Schwammwechsel Bakterienfreiheit detektiert werden. Aber auch frühere Studienergebnisse anderer Arbeiten wiesen nach, dass keine vollständige bakterielle Dekontamination nach NPWTi-d erreicht wird. Die Autorengruppen zeigten in ihren jeweiligen Studienpopulationen prinzipiell ähnliche Ergebnisse, nämlich einen signifikanten Rückgang der Gesamtkeimzahl in Wunden von NPWTi-d-Patienten im Vergleich zu traditionellen NPWT-Patienten beim ersten Verbandwechsel vor dem

Débridement, bestätigten aber auch die immer noch relevante hohe Kolonisation (44, 45).

Vor diesem Hintergrund hat die Tatsache, dass die NPWT mit oder ohne Instillation in der Vergangenheit eine positive Wirkung bei der Behandlung von Weichteil-, Gelenk- und Knocheninfektionen gezeigt hat (46-49), mehrere klinische Implikationen. Erstens stellt sich die Frage, ob die fortgesetzte Kontamination zum Zeitpunkt des Verbandwechsels nicht auf ein ursprüngliches unzureichendes Débridement zurückzuführen ist, welches eine übermäßige bakterielle Besiedlung hinterlassen haben könnte. Diese Frage kann jedoch nur beantwortet werden, wenn Gewebebiopsien aus der Wunde vor und nach dem ersten Débridement sowie direkt beim ersten Schwammwechsel vor einem erneuten Débridement mikrobiologisch untersucht wurden, was weder in unserer Studie noch in den zuvor veröffentlichten Studien zum Verlauf der Keimbelastung erfolgte (32, 34, 50, 51).

Diese Beobachtungen unterstreichen den multifaktoriellen Prozess der Wundheilung, zu dem die nutritive Perfusion des Gewebes, das Vorhandensein von Fremdmaterial und die Immunkompetenz des Patienten sowie die gewählte Antibiotikatherapie als wichtige Schlüsselfaktoren gehören. Folglich sollte die NPWT bei septischen Wunden, auch in Kombination mit der antiseptischen Instillation, nicht nur zur Reduzierung der Kolonisation eingesetzt werden, sondern auch als Mittel zur positiven Beeinflussung der Nährstoffperfusion und Sauerstoffversorgung, der Ödembildung des Wundgewebes und der Zellteilungsaktivität der Wunde (52-55).

„Das bakteriologische Profiling akut und chronisch infizierter Wunden konnte in unserer Studie durch die Ergänzung der Standardkultivierungsmethode mit

molekularbiologischen Diagnosetechniken wie FISHseq deutlich verbessert werden. So konnte die niedrige Nachweisrate bakterieller Erreger der Standardkultivierungsmethode im Wundbett in TP2 durch FISHseq von knapp über 50 % auf fast 70 % gesteigert werden, wobei die Infektion auch durch Visualisierung der Mikroorganismen im Gewebe bestätigt wurde.“ (Autoplagiat aus der Veröffentlichung 1, aus dem Englischen übersetzt)

Durch die zusätzliche Analyse des Schwamms und schließlich die des Effluats konnte die Identifizierung der vorhandenen Erreger in ca. 87 % bzw. 96 % erreicht werden. Unsere Daten stehen damit im Gegensatz zu den Ergebnissen von Scherrer et al., die keinen zusätzlichen Nutzen der Analyse von NPWT-Schwammproben nachweisen konnten, da sie nur eine geringe Übereinstimmung zwischen ihrem Analyseergebnis und dem der Gewebebiopsie fanden (21). Allerdings hatten Ciliberti et al. auch gezeigt, dass insbesondere bei einem negativen Ergebnis der Wundbiopsie eine zusätzliche Probe aus dem mittleren Bereich der Wundfüllung eine geeignete diagnostische Ergänzung darstellt (56). Diese Art der diagnostischen Erweiterung ist insbesondere dann sinnvoll, wenn der Patient zum Zeitpunkt der Probenahme bereits ausreichend mit Antibiotika abgedeckt ist und eine Biofilmbildung zu erwarten ist. „Es ist bekannt, dass Bakterien, die in Biofilmen eingebettet sind, schwer zu erkennen und zu kultivieren sind (22, 57), eine Tatsache, die auch zur "Unterschätzung" der Keimbelastung an sich beitragen kann.“ (Autoplagiat aus der Veröffentlichung 1, aus dem Englischen übersetzt)

Unsere eigenen Daten zeigen jedoch, dass ein großer Teil aller nicht planktonisch wachsenden Bakterien (Mikrokolonien oder Biofilme) sehr wohl mit Hilfe einer Standardkultur nachgewiesen werden konnte. Die insgesamt dennoch niedrige

Nachweisrate spricht für die Notwendigkeit erweiterter diagnostischer Strategien. Bei negativen Kulturergebnissen in klinisch kritischen Situationen und infektiösen Verdachtsfällen, in denen eine genaue Erregeridentifizierung für die Festlegung des Therapiealgorithmus hilfreich ist, erscheint es daher ratsam, nicht nur Proben aus dem Schwamm und dessen Effluat zu gewinnen, sondern die Messtechnik um molekularbiologische Methoden zu erweitern. Da die Prüfung der Antibiotikaempfindlichkeit von Mikroorganismen auf eine Antibiotikabehandlung bisher nur mittels Kultur möglich war, sind kulturelle Routineverfahren unverzichtbar und von entscheidender Bedeutung.

4.3. Limitationen der Studie

Diese Studienergebnisse werden durch mehrere Faktoren eingeschränkt, darunter die Art und Weise, wie die Patienten den beiden Gruppen (NPWT, NPWTi-d) zugewiesen wurden. Es gab kein Randomisierungsverfahren, und die Zuteilung lag im Ermessen des jeweiligen Chirurgen, der anhand des klinischen Bildes des Patienten, des Wundzustandes und der laborchemischen Infektsituation die Art der NPWT festlegen musste. Darüber hinaus verringerten die große Variabilität der Wundzustände der Patienten und die relativ kleine Population in beiden Gruppen die Möglichkeit, weitere statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festzustellen. Somit kann ein Selektionsbias nicht ausgeschlossen werden, allerdings konnte die ausgiebige Analyse der Charakteristika der eingeschlossenen Patienten und der Wunden keine relevanten Unterschiede in beiden Gruppen aufweisen. Obwohl chronische Infektionen möglicherweise unterrepräsentiert waren und mehrere Chirurgen beteiligt waren, wurden alle Patienten wegen Infektionen behandelt, und die festgelegten standardisierten Arbeitsanweisungen waren für alle Chirurgen

anwendbar, da die Studie in einem militärischen Traumazentrum durchgeführt wurde. „Die Heterogenität bei der Verabreichung von Antibiotika könnte kritisiert werden. Insbesondere die Antibiotikagabe, die in einigen Fällen bereits präoperativ begonnen wurde, beeinflusste sicherlich den Nachweis von Bakterien in intraoperativen mikrobiologischen Proben. So wird allgemein angenommen, dass eine präoperative Antibiotikagabe zu falsch-negativen intraoperativen mikrobiologischen Proben führen kann (58). Andererseits entspricht die Tatsache, dass in unserer Studie die Antibiotikagabe häufig schon vor der Operation begann, eher der Versorgungsrealität, da erfolglos behandelte Fälle oder Fälle mit Komplikationen in der Regel mit bereits laufender Antibiotikatherapie in das Behandlungszentrum für septische Defektwunden verlegt werden.“ (Autoplagiat aus der Veröffentlichung 1, aus dem Englischen übersetzt)

Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass die Transportzeit der gewonnenen Proben in die jeweiligen Analysezentren, insbesondere in der Nacht oder am Wochenende, gewissen Schwankungen unterlag. Inwieweit dies Auswirkungen auf die Ergebnisse hat, müsste in weiteren Studien untersucht werden. Der gewählte Beobachtungszeitraum von im Median 2 - 3 Tagen bis zum ersten Schwammwechsel gibt keine Auskunft über den Verlauf der bakteriellen Infektion während der gesamten Therapiedauer. Da sich die Autoren jedoch primär auf die bakterielle Belastung des NPWT-Schwamms und die Möglichkeit des Rückspülens von bakteriell kontaminierter Instillationsflüssigkeit in das Wundbett konzentrierten, war die Dauer des ersten Vakuumzyklus ausreichend.

Zu erwähnen ist auch, dass bei Proben, bei denen im Rahmen der molekularbiologischen Diagnostik lediglich mikroskopisch Bakterien im DAPI nachgewiesen wurden und bei der Sequenzierung keine Identifizierung der Spezies

gelang, die Ergebnisse im Kontext mit anderen Proben des Patienten analysiert und interpretiert wurden. (Tabelle 2) Eine Einschränkung unserer Aussagen zur Kontamination des Effluats bzw. Schwamms und des Wundgrundes sowie zur Konsistenz der Keimbelastung sehen wir durch die aufgeführten Limitationen jedoch nicht.

4.4. Zusammenfassendes Fazit

Bakterielle Besiedlung Polyurathanschwamm und Effluat

Es ließ sich eindeutig nachweisen, dass sowohl bei der NPWT als auch bei der NPWTi-d trotz rezidivierender Spülung mit antiseptischer Lösung eine hohe Rate an bakterieller Kontamination der eingesetzten Polyurethanschwämme und des Effluates vorliegt. Insbesondere das Ergebnis der Kontamination des Effluates wurde erstmals erarbeitet.

Keimspektrum Wundgrund und Schwamm (TP2)

Sowohl bei der Therapie mittels NPWTi-d als auch bei NPWT konnte in einem hohen Prozentsatz nach dem ersten Behandlungszyklus ein identisches Keimspektrum am Wundgrund, im Schwamm und im Effluat (TP2) nachgewiesen werden. In der Mehrzahl der Fälle ließen sich die ursprünglich identifizierten Erreger auch nach der NPWT oder NPWTi-d noch in der Wunde und im Schwamm detektieren.

Reduktion der Erregerspezies

Die mikrobiologische und molekularbiologische Analyse der Gewebeproben beider Therapien zeigte eine signifikant reduzierte Anzahl von Erregerspezies von Zeitpunkt TP1 zu TP2 ($p=0,012$). Die Anwendung der NPWTi-d führte im Vergleich zur NPWT

zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Anzahl der nachgewiesenen Erregerspezies (NPWTi-d: $p=0,026$; NPWT: n.s. $p=0,317$). Allerdings waren alle Wunden und Schwämme auch nach der NPWT weiterhin mit Bakterien besiedelt. Ein "Staubsaugereffekt", d.h. dass alle Erreger durch den Unterdruck aus der Wunde "gesaugt" werden und die Wunde "sauber" wird, aber im Schwamm zu finden sind, konnte daher nicht bestätigt werden.

Ausbildung neuer Keime

Diese Arbeit konnte zeigen, dass es während der Therapie mit Vakuumversiegelungsschwämmen zur Ausbildung neuer, initial am Wundgrund vor Therapie, nicht nachweisbarer Keime kommen kann. Diese lassen sich am Wundgrund, am Schwamm und im Effluat nachweisen. Dabei kann nicht unmittelbar von einer Kontamination ausgegangen werden. Als ein Beleg dafür dient die Erkenntnis, dass die Hautabstriche, die in jedem operativen Schritt entnommen worden, in der Regel andere Erreger ergaben und nicht identisch mit den neu nachgewiesenen Bakterien waren.

Besteht Evidenz für eine Re-Kontamination der Wunde durch Vakuumversiegelung

Die hohe Rate der bakteriellen Kontamination des gewonnenen Effluats im Rahmen des ersten Schwammwechsels sowie des häufig identischen Keimspektrums des Schwammes und des Effluats liefert einen eindeutigen Hinweis darauf, dass im Schwamm angesiedelte Bakterien durch Therapie mittels Vakuumversiegelung zurück in die Wunde gelangen und dadurch zu einer Rekontamination der Wunde führen können.

Zusatzinformationen der molekularbiologischen Untersuchungsmethoden

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (FISHseq) konnte zwischen dem Vorhandensein von planktonisch lebenden Bakterien, Mikrokolonien und Biofilmen in Gewebeproben (TP1 und TP2) und im Schwamm unterschieden werden. Zudem ist es mit Hilfe der Verfahren möglich, den Leitkeim bei einer polymikrobiellen Kontamination/Infektion zu bestimmen und ggf. mögliche Kontaminationen auszuschließen. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass durch den zusätzlichen Einsatz von molekularbiologischen Untersuchungstechniken (FISHseq) ein deutlich höherer Anteil an Bakterienarten identifiziert werden kann. Durch die Analyse von Gewebe-, Schwamm- und Effluatproben und den Einsatz sowohl kultureller als auch molekularbiologischer Nachweismethoden kann die Rate der falsch-negativen Ergebnisse deutlich reduziert werden.

Einsatz der molekularbiologischen Untersuchungsmethoden

Aus unserer Sicht wird empfohlen, dass in komplizierten laborchemischen und klinischen Infektionssituationen, ohne vorherigen Erregernachweis in der mikrobiologischen Standarddiagnostik oder bei hochgradigem Verdacht auf das Vorliegen eines Biofilms, die Diagnostik um die molekularbiologischen Methoden (z.B. FISHseq) ergänzt werden sollte.

4.5. Ausblick auf weiterführende Studien

In der Zukunft sollten die hier gewonnen Erkenntnisse genutzt werden, um den Behandlungsverlauf einer Therapie mittels NPWT oder NPWTi-d bis zum Abschluss der Wundbehandlung, das heißt bis zum Sekundärverschluss der Wunde, zur

plastischen Deckung oder zur Beendigung der Vakuumversiegelungstherapie, zu verfolgen und zu analysieren. Von Bedeutung wäre dabei die Reduktion der Keimbelastung oder sogar die mögliche Dekontamination der Wunde nach mehreren Schwammwechselln und damit regelmäßig wiederholten Débridements und Wundspülungen.

In diesem Zusammenhang könnte auch eine Vergleichsstudie zwischen der NPWT bzw. NPWTi-d und einer offenen Wundbehandlung mit Einlage von Medikamententrägern in die Wunde (z.B. Bauchtücher getränkt mit antiseptischer Lösung oder antibiotisch beschichteten Kompressen) in Bezug auf Entwicklung der Keimbelastung in akuten und chronischen Wunden von größerem Interesse sein.

Zudem wäre es zielführend, weitere klinische Studien durchzuführen, um den Einfluss antiseptischer Schwämme, wie z. B. Silberschwämme, auf die Reduzierung der bakteriellen Belastung bei der Anwendung von NPWT oder NPWTi-d zu untersuchen.

Abschließend lässt sich sagen, dass durch diese aktuelle Studie, der Literatur wichtige neue Erkenntnisse hinzugefügt werden können. Sie bietet daher eine Grundlage für die Erforschung weiterer klinischer Studienoptionen.

5. Literaturverzeichnis

1. Willy C, Stichling M, Muller M, Gatzler R, Kramer A, Back DA, Vogt D. [Acute therapeutic measures for limb salvage Part 2 : Debridement, lavage techniques and anti-infectious strategies]. *Unfallchirurg*. 2016;119(5):388-99.
2. Brem MH, Blanke M, Olk A, Schmidt J, Mueller O, Hennig FF, Gusinde J. [The vacuum-assisted closure (V.A.C.) and instillation dressing: limb salvage after 3 degrees open fracture with massive bone and soft tissue defect and superinfection]. *Unfallchirurg*. 2008;111(2):122-5.
3. Borrero Esteban MP, Begines Begines R, Rodriguez Llamas S, Diaz Campos T. [Managing complications in severe traumatic injury with VAC therapy with instillation]. *Rev Enferm*. 2013;36(11):42-7.
4. Teot L, Boissiere F, Fluieraru S. Novel foam dressing using negative pressure wound therapy with instillation to remove thick exudate. *Int Wound J*. 2017;14(5):842-8.
5. Apelqvist J, Willy C, Fagerdahl AM, Fraccalvieri M, Malmsjo M, Piaggese A, Probst A, Vowden P. EWMA Document: Negative Pressure Wound Therapy. *J Wound Care*. 2017;26(Sup3):S1-S154.
6. Greene AK, Puder M, Roy R, Arsenault D, Kwei S, Moses MA, Orgill DP. Microdeformational wound therapy: effects on angiogenesis and matrix metalloproteinases in chronic wounds of 3 debilitated patients. *Ann Plast Surg*. 2006;56(4):418-22.
7. Borgquist O, Anesater E, Hedstrom E, Lee CK, Ingemansson R, Malmsjo M. Measurements of wound edge microvascular blood flow during negative pressure wound therapy using thermodiffusion and transcutaneous and invasive laser Doppler velocimetry. *Wound Repair Regen*. 2011;19(6):727-33.
8. Moch D, Fleischmann W, Westhauser A. [Instillation vacuum sealing--report of initial experiences]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd*. 1998;115:1197-9.
9. Timmers MS, Graafland N, Bernards AT, Nelissen RG, van Dissel JT, Jukema GN. Negative pressure wound treatment with polyvinyl alcohol foam and polyhexanide antiseptic solution instillation in posttraumatic osteomyelitis. *Wound Repair Regen*. 2009;17(2):278-86.
10. Ludolph I, Fried FW, Kneppel K, Arkudas A, Schmitz M, Horch RE. Negative pressure wound treatment with computer-controlled irrigation/instillation decreases

bacterial load in contaminated wounds and facilitates wound closure. *Int Wound J.* 2018;15(6):978-84.

11. Lessing C, Slack P, Hong KZ, Kilpadi D, McNulty A. Negative Pressure Wound Therapy With Controlled Saline Instillation (NPWTi): Dressing Properties and Granulation Response In Vivo. *Wounds.* 2011;23(10):309-19.
12. Goss SG, Schwartz JA, Facchin F, Avdagic E, Gendics C, Lantis JC, 2nd. Negative Pressure Wound Therapy With Instillation (NPWTi) Better Reduces Post-debridement Bioburden in Chronically Infected Lower Extremity Wounds Than NPWT Alone. *J Am Coll Clin Wound Spec.* 2012;4(4):74-80.
13. Kim PJ, Attinger CE, Steinberg JS, Evans KK, Powers KA, Hung RW, Smith JR, Rocha ZM, Lavery L. The impact of negative-pressure wound therapy with instillation compared with standard negative-pressure wound therapy: a retrospective, historical, cohort, controlled study. *Plast Reconstr Surg.* 2014;133(3):709-16.
14. Omar M, Gathen M, Liodakis E, Suero EM, Krettek C, Zeckey C, Petri M. A comparative study of negative pressure wound therapy with and without instillation of saline on wound healing. *J Wound Care.* 2016;25(8):475-8.
15. Qiu Y, Li Y, Gao B, Li J, Pan L, Ye Z, Lin Y, Lin L. Therapeutic efficacy of vacuum sealing drainage-assisted irrigation in patients with severe multiple-space infections in the oral, maxillofacial, and cervical regions. *J Craniomaxillofac Surg.* 2019;47(5):837-41.
16. Gupta S, Gabriel A, Lantis J, Teot L. Clinical recommendations and practical guide for negative pressure wound therapy with instillation. *Int Wound J.* 2016;13(2):159-74.
17. Yang C, Goss SG, Alcantara S, Schultz G, Lantis li JC. Effect of Negative Pressure Wound Therapy With Instillation on Bioburden in Chronically Infected Wounds. *Wounds.* 2017;29(8):240-6.
18. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Hoiby N, Moser C, Costerton JW, Møter A, Bjarnsholt T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65(2):127-45.
19. Kim PJ, Attinger CE, Constantine T, Crist BD, Faust E, Hirche CR, Lavery LA, Messina VJ, Ohura N, Punch LJ, Wirth GA, Younis I, Teot L. Negative pressure wound therapy with instillation: International consensus guidelines update. *Int Wound J.* 2020;17(1):174-86.

20. Anagnostakos K, Mosser P. Bacteria identification on NPWT foams: clinical relevance or contamination? *J Wound Care*. 2012;21(7):333-4, 6-9.
21. Scherrer AU, Bloemberg G, Zbinden R, Zinkernagel AS, Fuchs C, Frauenfelder S, Rancic Z, Mayer D, Hasse B, Cohort V. Prosthetic Vascular Graft Infections: Bacterial Cultures from Negative-Pressure-Wound-Therapy Foams Do Not Improve Diagnostics. *J Clin Microbiol*. 2016;54(8):2190-3.
22. Yusuf E, Jordan X, Clauss M, Borens O, Mader M, Trampuz A. High bacterial load in negative pressure wound therapy (NPWT) foams used in the treatment of chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 2013;21(5):677-81.
23. Scheuermann-Poley C, Wagner C, Hoffmann J, Moter A, Willy C. [The significance of biofilm for the treatment of infections in orthopedic surgery : 2017 Update]. *Unfallchirurg*. 2017;120(6):461-71.
24. Moter A, Kovacevic D, Mallmann C, Gobel UB. [Sensitive FISH--fluorescence in situ hybridization in microbiological diagnosis]. *Pneumologie*. 2005;59(6):425-7.
25. Moter A, Leist G, Rudolph R, Schrank K, Choi BK, Wagner M, UB GB. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. *Microbiology (Reading)*. 1998;144 (Pt 9):2459-67.
26. Schoenrath F, Kursawe L, Nersesian G, Kikhney J, Schmidt J, Barthel F, Kaufmann F, Knierim J, Knosalla C, Hennig F, Falk V, Potapov E, Moter A. Fluorescence In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction to Detect Infections in Patients With Left Ventricular Assist Devices. *ASAIO J*. 2021;67(5):536-45.
27. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56(6):1919-25.
28. Wallner G, Amann R, Beisker W. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*. 1993;14(2):136-43.
29. Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, Noller HF. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(10):4801-5.
30. Rojas P, Petrich A, Schulze J, Wiessner A, Loddenkemper C, Epple HJ, Sterlacci W, Vieth M, Kikhney J, Moter A. Distribution and phylogeny of *Brachyspira*

spp. in human intestinal spirochetosis revealed by FISH and 16S rRNA-gene analysis. *Anaerobe*. 2017;47:25-32.

31. Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, McGuirt W. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation. *Ann Plast Surg*. 1997;38(6):553-62.
32. Moues CM, Vos MC, van den Bemd GJ, Stijnen T, Hovius SE. Bacterial load in relation to vacuum-assisted closure wound therapy: a prospective randomized trial. *Wound Repair Regen*. 2004;12(1):11-7.
33. Lalliss SJ, Stinner DJ, Waterman SM, Branstetter JG, Masini BD, Wenke JC. Negative pressure wound therapy reduces pseudomonas wound contamination more than Staphylococcus aureus. *J Orthop Trauma*. 2010;24(9):598-602.
34. Braakenburg A, Obdeijn MC, Feitz R, van Rooij IA, van Griethuysen AJ, Klinkenbijn JH. The clinical efficacy and cost effectiveness of the vacuum-assisted closure technique in the management of acute and chronic wounds: a randomized controlled trial. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(2):390-7; discussion 8-400.
35. Moues CM, van den Bemd GJ, Heule F, Hovius SE. Comparing conventional gauze therapy to vacuum-assisted closure wound therapy: a prospective randomised trial. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2007;60(6):672-81.
36. Khashram M, Huggan P, Ikram R, Chambers S, Roake JA, Lewis DR. Effect of TNP on the microbiology of venous leg ulcers: a pilot study. *J Wound Care*. 2009;18(4):164-7.
37. Jentzsch T, Osterhoff G, Zwolak P, Seifert B, Neuhaus V, Simmen HP, Jukema GN. Bacterial reduction and shift with NPWT after surgical debridements: a retrospective cohort study. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2017;137(1):55-62.
38. Diehm YF, Fischer S, Wirth GA, Haug V, Orgill DP, Momeni A, Horch RE, Lehner B, Kneser U, Hirche C. Management of Acute and Traumatic Wounds With Negative-Pressure Wound Therapy With Instillation and Dwell Time. *Plast Reconstr Surg*. 2021;147(1S-1):43S-53S.
39. Kim PJ, Attinger CE, Steinberg JS, Evans KK, Lehner B, Willy C, Lavery L, Wolvos T, Orgill D, Ennis W, Lantis J, Gabriel A, Schultz G. Negative-pressure wound therapy with instillation: international consensus guidelines. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(6):1569-79.

40. Kramer A, Dissemond J, Kim S, Willy C, Mayer D, Papke R, Tuchmann F, Assadian O. Consensus on Wound Antisepsis: Update 2018. *Skin Pharmacol Physiol*. 2018;31(1):28-58.
41. Wolvos TA. Negative pressure wound therapy with instillation: the current state of the art. *Surg Technol Int*. 2014;24:53-62.
42. Tata MD, Kwan KC, Abdul-Razak MR, Paramalingam S, Yeen WC. Adjunctive use of superoxidized solution in chest wall necrotizing soft tissue infection. *Ann Thorac Surg*. 2009;87(5):1613-4.
43. Aragon-Sanchez J, Lazaro-Martinez JL, Quintana-Marrero Y, Sanz-Corbalan I, Hernandez-Herrero MJ, Cabrera-Galvan JJ. Super-oxidized solution (Dermacyn Wound Care) as adjuvant treatment in the postoperative management of complicated diabetic foot osteomyelitis: preliminary experience in a specialized department. *Int J Low Extrem Wounds*. 2013;12(2):130-7.
44. Davis K, Bills J, Barker J, Kim P, Lavery L. Simultaneous irrigation and negative pressure wound therapy enhances wound healing and reduces wound bioburden in a porcine model. *Wound Repair Regen*. 2013;21(6):869-75.
45. Kim PJ, Lavery LA, Galiano RD, Salgado CJ, Orgill DP, Kovach SJ, Bernstein BH, Attinger CE. The impact of negative-pressure wound therapy with instillation on wounds requiring operative debridement: Pilot randomised, controlled trial. *Int Wound J*. 2020;17(5):1194-208.
46. Chowdhry SA, Wilhelmi BJ. Comparing Negative Pressure Wound Therapy with Instillation and Conventional Dressings for Sternal Wound Reconstructions. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2019;7(1):e2087.
47. Cole W. Early-stage Management of Complex Lower Extremity Wounds Using Negative Pressure Wound Therapy With Instillation and a Reticulated Open Cell Foam With Through Holes. *Wounds*. 2020;32(6):159-63.
48. Deleyto E, Garcia-Ruano A, Gonzalez-Lopez JR. Negative pressure wound therapy with instillation, a cost-effective treatment for abdominal mesh exposure. *Hernia*. 2018;22(2):311-8.
49. Kim PJ, Attinger CE, Crist BD, Gabriel A, Galiano RD, Gupta S, Lantis li JC, Lavery L, Lipsky BA, Teot L. Negative Pressure Wound Therapy With Instillation: Review of Evidence and Recommendations. *Wounds*. 2015;27(12):S2-S19.

50. Tan Y, Wang X, Li H, Zheng Q, Li J, Feng G, Pan Z. The clinical efficacy of the vacuum-assisted closure therapy in the management of adult osteomyelitis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2011;131(2):255-9.
51. Weed T, Ratliff C, Drake DB. Quantifying bacterial bioburden during negative pressure wound therapy: does the wound VAC enhance bacterial clearance? *Ann Plast Surg.* 2004;52(3):276-9; discussion 9-80.
52. Kamolz LP, Andel H, Haslik W, Winter W, Meissl G, Frey M. Use of subatmospheric pressure therapy to prevent burn wound progression in human: first experiences. *Burns.* 2004;30(3):253-8.
53. Saxena V, Hwang CW, Huang S, Eichbaum Q, Ingber D, Orgill DP. Vacuum-assisted closure: microdeformations of wounds and cell proliferation. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(5):1086-96; discussion 97-8.
54. Wackenfors A, Sjogren J, Algotsson L, Gustafsson R, Ingemansson R, Malmsjo M. The effect of vacuum-assisted closure therapy on the pig femoral artery vasomotor responses. *Wound Repair Regen.* 2004;12(2):244-51.
55. Wackenfors A, Sjogren J, Gustafsson R, Algotsson L, Ingemansson R, Malmsjo M. Effects of vacuum-assisted closure therapy on inguinal wound edge microvascular blood flow. *Wound Repair Regen.* 2004;12(6):600-6.
56. Ciliberti M, De Lara F, Serra G, Tafuro F, Iazzetta FM, Filosa A, Scognamiglio R, Ciliberti G, Veneri MR. The Effect of a Bacteria- and Fungi- binding Mesh Dressing on the Bacterial Load of Pressure Ulcers Treated With Negative Pressure Wound Therapy: A Pilot Study. *Wounds.* 2016;28(11):408-20.
57. Kirketerp-Moller K, Jensen PO, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, Tolker-Nielsen T, Hoiby N, Givskov M, Bjarnsholt T. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2717-22.
58. Al-Mayahi M, Cian A, Lipsky BA, Suva D, Muller C, Landelle C, Miozzari HH, Uckay I. Administration of antibiotic agents before intraoperative sampling in orthopedic infections alters culture results. *J Infect.* 2015;71(5):518-25.
59. Stichling M, Wiessner A, Kikhney J, Gatzler R, Muller M, Scheuermann-Poley C, Moter A, Willy C. Is There a Wound Recontamination by Eluates with High Bacterial Load in Negative-Pressure Wound Therapy with Instillation and Dwell Time? *Plast Reconstr Surg.* 2023;151(1):136e-47e.
<https://doi.org/10.1097/prs.0000000000009770>

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marcus Stichling, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *“Qualitative and quantitative determination of bacterial colonisation of vacuum sealing foams and eluates in acute and chronic bone and soft tissue injuries”* bzw. *“Qualitative und quantitative Bestimmung der bakteriellen Besiedlung von Vakuumversiegelungsschwämmen und Effluaten bei akuten und chronischen Knochen- und Weichteilverletzungen“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum: 22.08.2022

Unterschrift:

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation als Top-Journal im Rahmen des Promotionsverfahrens zum Doctor medicinae (Dr. med.)

Marcus Stichling, geboren in Sömmerda, hat folgenden Anteil an der aufgelisteten Publikation:

Veröffentlichung 1:

Stichling M, Wießner A, Kikhney J, Gatzler R, Müller M, Scheuermann-Poley C, Moter A, Willy C, "Is there a wound re-contamination by eluates with high bacterial load in negative pressure wound therapy with instillation and dwell time (NPWTi-d)?" (59)

Akzeptiert in Plastic and Reconstructive Surgery 08.02.2022, veröffentlicht Januar 2023

Beitrag im Einzelnen:

Die Auswahl und der Einschluss der Probanden für die hier zugrundeliegende klinische Studie, einschließlich der Aufklärung der Probanden gemäß des vorliegenden Ethikvotums, erfolgten durch den Doktoranden. Die Probenentnahme im OP für die mikrobiologische und molekularbiologische wurde durch den Doktoranden aktiv organisiert, mit Unterstützung anderer ärztlicher Kollegen, welche durch den Doktoranden angeleitet wurden, durchgeführt und überwacht. Die Dokumentation und der Transport der Proben zu den Instituten wurden durch den Doktoranden vorgenommen. Durch den Doktoranden wurde in Zusammenarbeit mit dem Referenzautor eine ausführliche Literaturrecherche zum Thema der Publikation durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Unterstützung durch Dr. Daniel Köppen und Dr. Nadine Schäfer. Die Analyse und Interpretation der Daten erfolgten in Zusammenarbeit mit den anderen Co-Autoren. Der Text der Publikation wurde von dem Doktoranden primär erstellt und von den anderen Co-Autoren überarbeitet und angepasst. Alle Abbildungen und Tabellen wurden von dem Doktoranden unter Anleitung durch den erstbetreuenden Hochschullehrer erstellt. Anmerkungen der Co-Autoren wurden von ihm aufgenommen und eingearbeitet.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Auszug aus Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"SURGERY"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 211 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	JAMA Surgery	12,793	14.766	0.037320
2	ANNALS OF SURGERY	64,045	12.969	0.062660
3	JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION	15,107	10.247	0.021660
4	JOURNAL OF NEUROLOGY NEUROSURGERY AND PSYCHIATRY	37,094	10.154	0.026380
5	ENDOSCOPY	14,018	10.093	0.017740
6	AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION	32,841	8.086	0.037980
7	Digestive Endoscopy	4,707	7.559	0.006120
8	Hepatobiliary Surgery and Nutrition	1,292	7.293	0.002280
9	EUROPEAN JOURNAL OF VASCULAR AND ENDOVASCULAR SURGERY	12,166	7.069	0.013270
10	Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	4,958	7.027	0.004550
11	BRITISH JOURNAL OF SURGERY	29,311	6.939	0.024180
12	AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY	26,272	6.394	0.020620
13	JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery	5,965	6.223	0.012380
14	JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF SURGEONS	20,819	6.113	0.023470
15	International Journal of Surgery	16,011	6.071	0.018760
16	Journal of NeuroInterventional Surgery	7,426	5.836	0.016070
17	LIVER TRANSPLANTATION	11,872	5.799	0.011700
18	World Journal of Emergency Surgery	2,562	5.469	0.004460

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
19	ANNALS OF SURGICAL ONCOLOGY	37,490	5.344	0.043690
20	JOURNAL OF BONE AND JOINT SURGERY-AMERICAN VOLUME	53,702	5.284	0.033030
21	JOURNAL OF THORACIC AND CARDIOVASCULAR SURGERY	33,066	5.209	0.026550
22	JOURNAL OF NEUROSURGERY	43,275	5.115	0.027680
23	Burns & Trauma	937	5.099	0.001610
24	Bone & Joint Journal	9,587	5.082	0.020810
25	TRANSPLANTATION	27,214	4.939	0.024800
26	ARTHROSCOPY-THE JOURNAL OF ARTHROSCOPIC AND RELATED SURGERY	20,208	4.772	0.020680
27	Hernia	5,350	4.739	0.005050
28	Surgery for Obesity and Related Diseases	10,541	4.734	0.016650
29	PLASTIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY	45,656	4.730	0.030360
30	NEUROSURGERY	34,635	4.654	0.022250
31	JAMA Facial Plastic Surgery	1,662	4.611	0.003460
32	DISEASES OF THE COLON & RECTUM	16,654	4.585	0.011010
33	SURGICAL ENDOSCOPY AND OTHER INTERVENTIONAL TECHNIQUES	31,681	4.584	0.034550
34	EJSO	12,510	4.424	0.016820
35	KNEE SURGERY SPORTS TRAUMATOLOGY ARTHROSCOPY	21,052	4.342	0.025830
36	ANNALS OF THORACIC SURGERY	41,620	4.330	0.035100

Veröffentlichung 1 "Is there a wound re-contamination by eluates with high bacterial load in negative pressure wound therapy with instillation and dwell time (NPWTi-d)?" (59)

Plast Reconstr Surg. 2023;151(1):136e-47e

<https://doi.org/10.1097/prs.00000000000009770>

Es liegt keine Genehmigung zur Veröffentlichung der Publikation in der elektronischen Version der Dissertation vor.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. Stichling M, Wiessner A, Kikhney J, Gatzler R, Müller M, Scheuermann-Poley C, Moter A, Willy C. Is there a wound re-contamination by eluates with high bacterial load in negative pressure wound therapy with instillation and dwell time (NPWTi-d)?. *Plast Reconstr Surg.* 2023;151(1):136e-47e.

<https://doi.org/10.1097/prs.0000000000009770>

○ *Impact Factor 2022: 4,763*

2. Loessel C, Mai A, Starke M, Vogt D, Stichling M, Willy C. Value of antigranulocyte scintigraphy with Tc-99m-sulesomab in diagnosing combat-related infections of the musculoskeletal system. *BMJ Mil Health.* 2021;167(1):8-17.

○ *Impact Factor 2020: 1,285*

3. Willy C, Scheuermann-Poley C, Stichling M, von Stein T, Kramer A. [Importance of wound irrigation solutions and fluids with antiseptic effects in therapy and prophylaxis : Update 2017]. *Unfallchirurg.* 2017;120(7):549-60.

○ *Impact Factor 2017: 0,671*

4. Willy C, Rieger H, Stichling M. [Prevention of postoperative infections : Risk factors and the current WHO guidelines in musculoskeletal surgery]. *Unfallchirurg.* 2017;120(6):472-85.

○ *Impact Factor 2017: 0,671*

5. Willy C, Stichling M, Muller M, Gatzler R, Kramer A, Back DA, et al. [Acute therapeutic measures for limb salvage Part 2 : Debridement, lavage techniques and anti-infectious strategies]. *Unfallchirurg.* 2016;119(5):388-99.

○ *Impact Factor 2016: 0,467*

6. Willy C, Stichling M, Engelhardt M, Vogt D, Back DA. [Acute therapeutic measures for limb salvage Part 1 : Haemorrhage control, emergency revascularization, compartment syndrome]. *Unfallchirurg.* 2016;119(5):374-87.

○ *Impact Factor 2016: 0,467*

7. Willy C, Engelhardt M, Stichling M, Grauhan O. The impact of surgical site occurrences and the role of closed incision negative pressure therapy. *Int Wound J.* 2016;13 Suppl 3:35-46.

○ *Impact Factor 2016: 2,848*

8. Muller R, Ditzen A, Hille K, Stichling M, Ehrlich R, Illmer T, et al. Detection of herpesvirus and adenovirus co-infections with diagnostic DNA-microarrays. *J Virol Methods.* 2009;155(2):161-6.

○ *Impact Factor 2009: 2,306*

Danksagung

Diese Doktorarbeit ist ein Kooperationsprojekt, das ohne die Mitwirkung und Unterstützung sehr vieler Personen nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Oberstarzt Prof. Dr. Willy, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden, regelmäßig den Stand unserer Arbeit überprüft hat und mit mir gemeinsam in zeitaufwendiger Arbeit dieses innovative Projekt zu einem erfolgreichen Abschluss führen konnte. Insbesondere möchte ich ihm für die Unterstützung bei der Erstellung der Publikation und des Manteltextes, sowie die Beantwortung aller Fragen und das schnelle Lösen von Problemen danken.

Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Moter aus dem Biofilmzentrum der Charité Berlin. Unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Moter haben Frau Dr. Kikhney, Frau Wiessner (Bsc) und Frau Dr. Hoffmann die molekularbiologische Diagnostik (FISHseq) für die entnommenen Proben und insbesondere für die Untersuchung der NPWT Schwämme entwickelt und durchgeführt. Zudem wurden von den Kollegen in mühevoller zeitaufwendiger Arbeit alle Ergebnisse in übersichtlichen Tabellen zusammengestellt und in Zusammenarbeit mit uns interpretiert. Im Rahmen des Erstellens der Publikation und des Manteltextes standen wir in ständigem Austausch. Für diese exzellente Arbeit und die Beantwortung aller aufgetretenen Fragen gebührt Ihnen allen mein Dank.

Ein weiterer großer Dank gilt dem Leiter der mikrobiologischen Abteilung unseres Hauses, Herrn Flottenarzt Dr. Müller und dessen Mitarbeiterin Frau Dr. Gatzer. Alle entnommenen Proben unserer Studie wurden unter der Verantwortung der beiden Kollegen der mikrobiologischen Diagnostik zugeführt. Die Ergebnisse wurden ausgewertet und ausführlich interdisziplinär diskutiert. Zudem standen die beiden Kollegen jederzeit für Fragen bereit, haben uns beim Verfassen der Publikation unfähig unterstützt. Dafür gilt Ihnen mein besonderer Dank.

Bei der statistischen Auswertung all unserer Daten hatten wir tatkräftige Unterstützung von Herrn Dr. Köppen und Frau Dr. Schäfer. Auch kurzfristig konnten wir uns immer auf fachliche Empfehlungen bezüglich statistischer Fragestellungen verlassen und dementsprechend unsere Ergebnisse korrekt in den Kontext der Arbeit einordnen. Hierfür danken wir Ihnen beiden in besonderem Maße.

Die Datenerhebung für diese klinische Studie wäre ohne die ärztlichen Kollegen und das Pflegepersonal unserer Klinik sowie das Personal der OP Gruppe nicht möglich

gewesen. Alle eingeschlossenen Patienten wurden stationär behandelt und dementsprechend durch das Pflegepersonal für die OP vorbereitet und postoperativ betreut. Da die eingeschlossenen Patienten teilweise auch am Wochenende oder nachts versorgt wurden, haben mich die ärztlichen Kollegen unserer Abteilung bei der Durchführung der Operationen und der Probengewinnung zur Datengewinnung regelmäßig und fachlich hoch kompetent unterstützt. Im OP wurden die Utensilien, welche zur korrekten Archivierung und Bezeichnung der operativen Proben erforderlich waren, durch die Mitarbeiter der OP Gruppe organisiert und für den Weitertransport vorbereitet. Allen zuletzt erwähnten Mitarbeitern und Kollegen gilt mein großer Dank. Durch diese professionelle Unterstützung und Zusammenarbeit konnte das Projekt erst möglich gemacht und zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht werden.

Danken möchte ich außerdem meiner Lebensgefährtin, meinem Sohn und meinen liebenden Eltern für die moralische Unterstützung und den immer gut gemeinten Rat.