Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Ulm
Direktor: Prof. Dr. R. Marre

Wirksamkeitsprüfung und Freisetzung von Octenidin aus Polymethylmethacrylat-Knochenzement und Adhäsionsprüfung von Testkeimen an Polymethylmethacrylat-Knochenzement

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Sebastian Weckbach
aus München
2006

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	PD Dr. med. Heike von Baum
2. Berichterstatter:	PD. Dr med. Mark Bischoff
Tag der Promotion:	22.11.2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 5

1. Einleitung 6

1.1 Historie der Erfindung und Anwendung der PMMA-Kunststoffe 6

1.2 Anwendung der PMMA-Kunststoffe in der Medizin 7

1.3 Epidemiologie nosokomialer Infektionen in der Endoprothetik 8

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit 9

2. Material und Methoden 10

2.1 Material 10

2.1.1 Mikrobiologische Versuche 10

2.1.2 Adhäsionsversuch an PMMA-Knochenzement 12

2.2 Methode 15

2.2.1 Mikrobiologische Versuche 15

2.2.1.1 Herstellung der Zementplättchen 15

2.2.1.2 Herstellung der Bakteriensuspension 17

2.2.1.3 Nachweis der Elution von Octenidin aus Knochenzementplättchen 19

2.2.2 Adhäsionsversuche an PMMA-Knochenzement 22

2.2.3 Statistik 24

3. Ergebnisse 25

3.1 Mikrobiologische Versuche 25

3.1.1 Herstellung von Zementplättchen für die Versuche 25

3.1.2 Wachstumsverhalten von Staphylococcus aureus unter dem Einfluss unterschiedlicher Octenidinkonzentrationen 26

3.1.3 Wachstum von Pseudomonas aeruginosa unter dem Einfluss unterschiedlicher Octenidinkonzentrationen 30

3.1.4 Elutions-Phosphatpufferversuche 34

3.2 Adhäsionsversuch an PMMA-Knochenzement 38

3.2.1 Ermittlung der geeigneten Inkubationszeit der Zementplättchen 38

3.2.2 Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an PMMA-Knochenzement 41

3.2.2.1 Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an PMMA-Knochenzement ohne Zugabe von Octenidin 41
3.2.2.2 Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an PMMA-Knochenzement mit 8% Octenidin 42
3.2.3 Adhäsionsversuch von Pseudomonas aeruginosa an PMMA-Knochenzement 44
3.2.3.1 Adhäsion von Pseudomonas aeruginosa an PMMA-Knochenzement ohne Octenidin 44
3.2.3.2 Adhäsion von Pseudomonas aeruginosa an PMMA-Knochenzement bei 8% Octenidin 45
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse 48
3.3.1 Mikrobiologische Versuche 48
3.3.2 Adhäsionsversuche an PMMA-Knochenzement 51
4. Diskussion 52
4.1 Präventionsstrategien von nosokomialen Infektionen in der Endoprothetik 52
4.2 Werkstoffe mit Antibiotika / Antiseptika 53
4.3 Interpretation von Material und Methode 57
4.4 Interpretation der Ergebnisse 60
4.4.1 Mikrobiologische Versuche 60
4.4.2 Adhäsionsversuche an PMMA-Knochenzement 61
5. Ausblick 64
6. Zusammenfassung 65
7. Literatur 67
8. Anhang 73
9. Danksagungen 82

Abkürzungsverzeichnis

d	aus lat. Dies = Tag
E. Coli	Escherichia Coli
h	aus engl. Hour = Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KBE	Kolonie bildende Einheit
KISS	Krankenhausinfektions Surveillance Systems
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
MRSE	Methicillin resistenter Staphylococcus epidermidis
NaCl-Lösung	Natriumchloridlösung
OP	Operation
P. aeruginosa	Pseudomonas Aeruginosa
PMMA	Polymethylmethacrylat
ppm	Parts per million
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. epidermidis	Staphylococcus epidermidis

1. Einleitung

1.1 Historie der Erfindung und Anwendung der PMMA-Kunststoffe

Die Geschichte der Entwicklung und Anwendung von Knochenzementen reicht über 70 Jahre zurück. Intensive Forschung durch Otto Röhm führte 1934 zur Herstellung von Polymethylmethacrylaten (PMMA), die das Grundgerüst der Knochenzemente darstellen. 1935 wurden erstmals Zahnprothesen unter Verwendung von Polymethylmethacrylat gefertigt und dieses Verfahren patentrechtlich geschützt. Nachdem die Möglichkeiten zur großtechnischen Gewinnung dieses Kunststoffes gegeben waren, wurden neue Gebiete zur Anwendung dieser Werkstoffe erschlossen. Ein erster klinischer Anwendungsversuch der PMMA-Kunststoffe erfolgte 1938 zur Deckung von Schädeldachdefekten bei Affen. Nachdem diese ersten Versuche zur vollen Zufriedenheit verlaufen sind, war man bestrebt, dieses Material auch in der plastischen Chirurgie am Menschen einzusetzen. In Analogie zu den Affenversuchen wurden ebenfalls Schädellücken des Menschen mit vorher hergestellten und ausgehärteten PMMA-Kunststoffen verschlossen. 1943 entdeckte man, dass die Polymerisation von Methylmethacrylaten bei Raumtemperatur unter Zuhilfenahme eines Co-Initiators selbständig ablaufen kann. Daraufhin konnte von den Firmen Degussa und Kulzer unter Einsatz von tertiären aromatischen Aminen die Basis für die noch heute gültigen Vorgänge bei der Verwendung von PMMA-Knochenzementen geschaffen werden. Dies gilt als die Geburtsstunde der PMMA-Knochenzemente; sie fanden weltweites Interesse und waren fortan Gegenstand weiterer Forschungsarbeit. Die verschiedenen auf dem Markt befindlichen Materialien unterscheiden sich erheblich voneinander, obwohl sie alle auf derselben chemischen Grundlage basieren. Bis zur Einführung in die Chirurgie vergingen noch einige Jahre. Kiaer setzte 1951 erstmals kalthärtendes PMMA als reines Verankerungsmaterial ein. Sir Charnley verankerte erstmals 1958 eine Femurkopfprothese mit kalthärtendem PMMA-Knochenzement. Im Jahr 1963 wurden dann schnellhärtende Kunststoffe auch zur Defektfüllung von Gesichtsschädelverletzungen verwendet (42).

Für die Akzeptanz dieser neuen Materialien in der Chirurgie waren ausgiebige Untersuchungen zur Reaktion von Gewebe auf PMMA-Implantate nötig. Die gute Biokompatibilität bei fehlender Kanzerogenität dieser Implantate war von entscheidender Bedeutung (29;33).

Ende der 60er Jahre wurden von Buchholz (Hamburg) und der Firma Kulzer erstmalig die Zugabe eines Antibiotikums zum Knochenzement erwogen. Man erhoffte sich eine

Freisetzung des Wirkstoffes aus der Zementmatrix. So lieferten die ersten Experimente nach Zugabe von Gentamicinsulfat zu Palacos® viel versprechende Resultate, die schließlich mit der Entwicklung von Refobacin-Palacos® endeten (10;65).

Aufgrund der guten Verträglichkeit ergab sich großes klinisches Interesse und damit auch eine Vielzahl von Knochenzementen auf PMMA-Basis. Heute existieren über 70 verschiedene Zementsorten auf dem Markt.

1.2 Anwendung der PMMA-Kunststoffe in der Medizin

Die Polymethylmethacrylate finden heute in der Medizin ein weites Anwendungsgebiet. So werden zum Beispiel in der Augenheilkunde Linsen und Brillengläser verwendet, die aus diesen Kunststoffen gefertigt sind. Die wohl größte Verwendung haben PMMA-Kunststoffe heute in der Zahnheilkunde, wo sie zur Herstellung von Zahnprothesen dienen.

In der Chirurgie und Orthopädie kommt das Polymethylmethacrylat in der Endoprothetik zur Verankerung von Prothesen zum Einsatz (40). Weitere Indikationen zur Verwendung von PMMA-Knochenzement sind die Osteosynthese, die Fusion von Wirbelabschnitten und die primäre oder sekundäre Deckung von knöchernen Schädeldefekten (37).

Des weiteren werden sie als Träger von Medikamenten eingesetzt, die dem Zement beigemischt werden können. Seit mehr als 30 Jahren werden dem Knochenzement Antibiotika beigesetzt. Diese Form der lokalen Antibiose hatte sich über Jahrzehnte bei der Behandlung von chronischen Infekten von Knochen und Weichteilen bewährt (34;61). Jedoch hat diese lange Anwendungszeit auch einige Nachteile mit sich gebracht, so dass die Anwendung von mit einem Antibiotikum beladenen Knochenzement durchaus auch negativ beurteilt wird (18). So ist im Allgemeinen die Wirkung eines Antibiotikums in einem entzündeten Gebiet, in dem bekanntlich ein niedriger pH-Wert vorherrscht, abgeschwächt. Des weiteren treten immer mehr antibiotikaresistente Keime auf, die den Erfolg einer solche Behandlung gefährden (64).

Deswegen ist es heute ein Gebiet intensiver Forschung geworden, antibakteriell wirksame Stoffe dem Zement zuzufügen, die anschließend auch wieder freigesetzt werden können und die eben die oben genannten Nachteile nicht aufweisen.

So scheint das Vorhaben, einen Knochenzement mit einem Antiseptikum zu versetzen durchaus sinnvoll. Das Antiseptikum Octenidin scheint dazu geeignet zu sein. Octenidin verfügt über ein breites Anwendungsgebiet. So besitzt es eine wachstumshemmende

Wirkung gegenüber Bakterien einschließlich Chlamydien und Mycoplasmen, Pilzen, Hefen und Protozoen (2). Bei Verwendung dieses Antiseptikums sind bislang keine Resistenzen aufgetreten (20). Auch in einem entzündeten Gewebe ist die Wirkung des Octenidin nicht vermindert, da dieses einen Wirkungsbereich von pH 1,6–pH 12,2 besitzt (9).

1.3 Epidemiologie nosokomialer Infektionen in der Endoprothetik

Infektionen in der Endoprothetik stellen sowohl für den Patienten als auch für den behandelnden Chirurgen eine ernsthafte Komplikation dar. Es ist ein Misserfolg für den Chirurgen und eine Katastrophe für den Patienten (59). Periprothetische Infektionen müssen strikt von anderen Knocheninfektionen wie z.B. Osteomyelitis getrennt werden, da ein Fremdkörper daran beteiligt ist. Diese Art der Infektion folgt den Regeln der Fremdkörperinfektion. Sobald ein Fremdkörper an der Reaktion beteiligt ist, kommt es zu einer typischen Interaktion zwischen Fremdkörper und Bakterien, die diesen besiedeln können. In der Frühphase der Besiedlung, also nach der Kontamination der Prothese, beginnt das Bakterienwachstum mit der Bildung von Schleim, dem so genannten Biofilm. Diesem Schritt folgt eine dramatische Verlängerung der Generationszeit. Charakteristische Infektionszeichen können erst sehr spät auftreten, wenn die Bakterien die besiedelte Oberfläche verlassen und in das umgebende Gewebe auswandern und dadurch eine sekundäre Osteomyelitis oder Osteitis induzieren (69).

Postoperative Wundinfektionen stellen die dritthäufigste nosokomiale Infektionsart dar und sind ein Problem aller operativer Fachrichtungen (52). So kam es nach Angabe des nationalen *Krankenhausinfektions Surveillance Systems* (*KISS*) im Berechnungszeitraum Januar 1997 bis Dezember 2003 in orthopädischen Abteilungen bei Hüftendoprothesen bei einer Gesamtanzahl von 30651 Operationen zu 415 Wundinfektionen. Die postoperative Wundinfektionsrate beträgt somit 1,35%. In traumatologischen Abteilungen kam es im selben Erfassungszeitraum bei Hüftendoprothesen bei einer Gesamtanzahl von 25056 Operationen zu 635 Wundinfektionen. Damit liegt die Infektionsrate in diesen Abteilungen bei 2,53%. Die sekundäre Infektionsrate in der Traumatologie nach operativer Frakturversorgung und offenen Verletzungen liegt nach *BECK* bei 1%-3%, bei Patienten mit offenen Frakturen oder geschlossenen Frakturen mit ausgedehntem Weichteilschaden jedoch in einem Bereich zwischen 6% und 40% (7).

Die weltweite Zunahme von mulitresistenten Bakterien und die damit immer häufiger und schwerer verlaufenden Krankheitsfälle sind nicht von der Hand zu weisen. So stellten laut *DISSEMOND* vor allem multiresistente grampositive Kokken in den vergangenen Jahren ein interdisziplinär zunehmendes Problem in medizinischer und wirtschaftlicher Hinsicht bei der Therapie chronischer Wunden dar (16).

Aus diesen Gründen ist es mehr als begründet, sich intensiv mit der Verwendung des Antiseptikums Octenidin mit einem PMMA-Knochenzement auseinander zu setzen.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen von aus PMMA-Knochenzement freigesetztem Octenidin auf das Wachstum verschiedener Keime, die in vivo eine Infektion verursachen können, zu eruieren. Des weiteren soll die Freisetzungskinetik des Antiseptikums untersucht werden. Abschließend soll die Frage geklärt werden, ob es zu einer Adhäsion von Keimen an den mit Octenidin beladenen Knochenzement kommt.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Wird das dem PMMA-Knochenzement zugesetzte Antiseptikum Octenidin aus dem Zement freigesetzt?
2. Wenn Octenidin freigesetzt wird, besitzt der Wirkstoff dann aufgrund der hohen Temperaturen, die bei der Polymerisation entstehen, noch seine ursprüngliche antiseptische Wirkung?
3. Gibt es eine Adhäsion von Testkeimen an octenidinhaltigen Knochenzement?
4. Entsteht auf der Oberfläche des PMMA-Knochenzementes ein Biofilm ?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mikrobiologische Versuche

Im Folgenden sind alle Materialien in tabellarischer Form aufgelistet, die zur Durchführung der mikrobiologischen Versuche verwendet wurden:

Tabelle 1 : Verwendetes Material zu den mikrobiologischen Versuchen, zusätzlich ist der Name der herstellenden Firma und der Firmensitz angegeben

Verwendetes Material	Firmenname / Firmensitz
Palacos® Knochenzement	Biomet Merck / Altdorf
Octenidin-Dihydrochlorid	Schülke & Mayr GmbH / Norderstedt
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	DSMZ GmbH / Braunschweig
Staphylococcus aureus ATCC 29213	DSMZ GmbH / Braunschweig
Caso-Bouillon	Merck KGaA / Darmstadt
50 ml konisches Röhrchen / Falcon	Becton Dickinson / USA
1,5 ml Eppendorfröhrchen	Eppendorf AG / Hamburg
Eppendorf Tips 50–1000 µl	Eppendorf AG / Hamburg
Plattierungsspatel	Sarstedt AG & Co / Nümbrecht
Eppendorf Tips 2-200 µl	Eppendorf AG / Hamburg
Einmal Impfschlingen 10 µl	Nunc Brand Products / Dänemark
Caso–Blutagar	Heipha Dr. Müller GmbH / Eppelheim
NaCl 0,9%	B. Braun Melsungen AG / Melsungen
Pipetten 5ml / 25 ml / Falcon	Becton Dickinson / USA
Vanek Becher 100 ml	Sarstedt AG & Co / Nümbrecht
Pasteur–Pipetten Plastik	Alpha Laboratories Ltd / Hampshire
Photometer	Gene-Trak Systems / USA

Vortex–Genie 2	Scientific Industries / Wiltshire
Pipetten 100µl / 500µl	Eppendorf AG / Hamburg
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG / Buchs
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie AG / Buchs
PH–Meter	Schott Glas / Mainz
Präzisionswaage AE 200	Mettler / Berlin
Hera safe	Heraeus–Christ / Hanau
15 ml konisches Röhrchen / Falcon	Becton Dickinson / USA
Wattestäbchen – 150 mm	Applimed SA / Schweiz
Autoklav Getinge GE 406	Getinge AB / Skärhamn
Kühlschrank – 20°	Liebherr AG / Schweiz
Anrührschale für Zement plus Spatel	Golek AG
Raumluft – Brutschrank 6000	Heraeus–Christ / Hanau
Lochplatten für Zementplättchenherstellung	Eigene Herstellung
Reagenzgläser mit Kapsenbergdeckel	
Pinzetten	

Zur Herstellung der Zementplättchen wurde Knochenzement Palacos® der Firma Biomet Merck verwendet. In einer rechteckigen Faltschachtel befinden sich zwei Beutel Pulver zu je 40g und zwei Ampullen der Monomerflüssigkeit zu je 20ml. Das Pulver besteht aus 33,55g Polymethylmethacrylat, 6,13g Zirkoniumdioxid (Röntgenkontrastmittel), 0,32g Benzoylperoxid und 1mg Chlorophyll. Die Flüssigkeit setzt sich aus 18,40g Methylmethacrylat, 0,38g N,N-Dimethyl-p-Toluidin und 0,4mg Chlorophyll zusammen. Des weiteren wurde Octenidinpulver der Firma Schülke & Mayr, Norderstedt verwendet. Octenidinpulver besteht hauptsächlich aus Octenidindihydrochlorid, das in die Reihe der Bispyridine eingeordnet wird (25). Diese kationenaktiven Verbindungen mit zwei aktiven Zentren, in denen die positive Ladung auf zwei Stickstoffatome mesomer verteilt ist, erzielt ihre Wirkung durch Reaktion mit Zellwand- und

Membranbestandteilen der Mikrobenzelle und führt damit zur Zerstörung der Zellfunktion.

Als Testkeime fanden *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 Verwendung. Diese wurden zur Bebrütung in eine CASO-Nährbouillon eingebracht.

2.1.2 Adhäsionsversuch an PMMA-Knochenzement

Zur Übersicht über das bei den Adhäsionsversuchen verwendete Material dient die folgende Tabelle:

Tabelle 2: Verwendetes Material zu den Adhäsionsversuchen, zusätzlich ist der Name der herstellenden Firma und der Firmensitz angegeben

Verwendetes Material	Firmenname/Firmensitz
Palacos® Knochenzement	Biomet Merck / Altdorf
Octenidin-Dihydrochlorid	Schülke & Mayr GmbH / Norderstedt
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	DSMZ GmbH / Braunschweig
Staphylococcus aureus ATCC 29213	DSMZ GmbH / Braunschweig
Caso-Bouillon	Merck KGaA / Darmstadt
50 ml konisches Röhrchen / Falcon	Becton Dickinson / USA
1,5 ml Eppendorfröhrchen	Eppendorf AG / Hamburg
Eppendorf Tips 50–1000 µl	Eppendorf AG / Hamburg
Plattierungsspatel	Sarstedt AG & Co / Nümbrecht
Eppendorf Tips 2-200 µl	Eppendorf AG / Hamburg
Einmal Impfschlingen 10 µl	Nunc Brand Products / Dänemark
Caso–Blutagar	Heipha Dr. Müller GmbH / Eppelheim
NaCl 0,9%	B. Braun Melsungen AG / Melsungen
Pipetten 5ml / 25 ml / Falcon	Becton Dickinson / USA
Vanek Becher 100 ml	Sarstedt AG & Co / Nümbrecht
Vortex–Genie 2	Scientific Industries / Wiltshire

Pipetten 100µl / 500µl	Eppendorf AG / Hamburg
Präzisionswaage AE 200	Mettler / Berlin
Hera safe	Heraeus – Christ / Hanau
Autoklav Getinge GE 406	Getinge AB / Skärhamn
Kühlschrank – 20°	Liebherr AG / Schweiz
Anrührschale für Zement plus Spatel	Golek AG
Raumluft – Brutschrank 6000	Heraeus–Christ / Hanau
Lochplatten für Zementplättchenherstellung	
Pinzetten	
Mikroskop Zeiss mit digitaler Camera 100 x Vergrößerung	Carl Zeiss AG / Oberkochen
Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits	Molecular Probes
Ultraschallgerät Bandelin Sonorex TK 52 Transistor	Schalltec GmbH/ Mörfelden-Wall
Glasplatten	
Schüttelbank Rotamax 120	Heidolph Elektro GmbH & CoKG/ Kelheim
Objektträger	Menzel-GmbH / Braunschweig
Deckgläser	Menzel-GmbH / Braunschweig

Zur Visualisierung der am PMMA- Knochenzement adhärenten Keime kam fluoreszierender Farbstoff zur Anwendung. Dabei handelt es sich um das Präparat Live/Dead Bacterial Viabilitiy Kits der Firma Molecular Probes. Dies ist ein zweifarbiger Fluoreszenzfarbstoff, der die Unterscheidung lebendiger und toter Bakterien ermöglicht. Live/Dead Bacterial Viabilitiy Kits beinhaltet eine Mischung von SYTO 9, einem grün fluoreszierenden Nukleinsäurefarbstoff und Propidiumiodid, einem roten Fluoreszenzfarbstoff. Diese beiden Farbstoffe unterscheiden sich in ihrem

Fluoreszenzspektrum und in ihrer Fähigkeit, in gesunde Bakterien zu penetrieren. Eine alleinige Anwendung des SYTO 9 Farbstoffes markiert alle Bakterien, egal ob diese geschädigt sind oder nicht. Im Gegensatz dazu penetriert das Propidiumiodid nur geschädigte Zellmembranen, was zu einer Reduktion des grünen Farbstoffes führt, wenn gleichzeitig beide Farbstoffe anwesend sind. Also färben sich, ein bestimmtes Mischungsverhältnis der beiden Farbstoffe vorausgesetzt, bei Anwesenheit beider Farbstoffe Bakterien mit einer intakten Zellmembran grün, wohingegen Bakterien mit geschädigter Zellmembran rot fluoreszieren. Das Fluoreszenzspektrum für den grünen Farbstoff SYTO 9 liegt bei 480/500nm, das von Propidiumiodid bei 490/635nm. Der Hintergrund fluoresziert nicht. Ein übliches Kriterium für die Vitalität von Bakterien ist ihre Fähigkeit, sich in geeigneten Nährmedien zu reproduzieren. Bakterien, die ein exponentielles Wachstumsverhalten aufweisen, erzielen im Live/Dead BacLight Lebensfähigkeitstest gleiche Ergebnisse im Wachstumsverhalten wie in flüssigen oder soliden Medien. Unter gewissen Umständen werden jedoch Bakterien, die einen bestimmten Zellwandaufbau und die Fähigkeit zur Wiederherstellung und Reproduktion derselbigen besitzen, in diesem Test als tot gezählt. Bakterien, die eine intakte Zellmembran und nicht die Fähigkeit zur Regeneration besitzen, werden lebendig dargestellt.

Diese Färbungen wurden an einer Reihe von Bakterienstämmen getestet. So auch an den in dieser Arbeit verwendeten Keimen *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*. Dabei stellte sich die Eignung für die fluoreszenzmikroskopische Verwendung dieses Farbstoffes auf oben genannte Keime heraus.

2.2 Methode

2.2.1 Mikrobiologische Versuche

Der Aufbau der mikrobiologischen Versuche gliedert sich in mehrere Einzelschritte. Als erstes wurden Zementplättchen ohne und mit Zusatz einer gewissen Konzentration des Antiseptikums Octenidin hergestellt. Diese Plättchen wurden anschließend in einer Nährlösung mit einer bestimmten Anzahl von Bakterien inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Keimzahl in der Nährlösung erneut bestimmt. Anhand des Zuwachses oder einer Reduktion der Anzahl an Bakterien konnte der Effekt des Antiseptikums auf einen bestimmten Keim abgeleitet werden.

2.2.1.1 Herstellung der Zementplättchen

Zur Herstellung der Zementplättchen wurde 20g des Zementpulvers und 10ml der Monomerflüssigkeit des Knochenzementes Palacos® verwendet. Nach Zugabe des Pulvers zu der Monomerflüssigkeit fungieren das im Polymer befindliche Dibenzoylperoxid und das im Monomer enthaltenen Dimethyl-p-toluidin als Initiatorsysteme für die Polymerisation von Methylmethacrylat. Diese Substanzen erzeugen bereits bei Raumtemperatur Radikale und setzen so die Polymerisation in Gang. Durch die Vielzahl an polymerisationsauslösenden Radikalen bilden sich unzählige Polymerketten aus. Bereits nach wenigen Sekunden ist ein niedrigviskoser, homogener Teig entstanden. Dieser ist nach spätestens 60 Sekunden klebfrei aus dem Anmischgefäß zu entnehmen. Durch Zunahme der Viskosität des Teiges steigt auch die Temperatur desselbigen an, denn pro mol Methylmethacrylat wird eine Energie von 52 kJ freigesetzt. Die Verarbeitungszeit von Palacos® R liegt zwischen 3:30 Minuten und 4:00 Minuten. Die Aushärtung erfolgt zwischen 6:00 Minuten und 7:00 Minuten bei einer Temperatur von 75° Celsius. Durch vorangehende Kühlung der beiden Bestandteile bei -24° Celsius für ca. 12 Stunden lässt sich eine Verlangsamung der Polymerisation und somit eine Verlängerung der Verarbeitungszeit erreichen.

Die Zementmasse wurde nach dem Anrühren in zwei speziell angefertigte Aluminiumplatten gegossen. Diese Aluminiumplatten enthielten 18 Löcher identischen Ausmaßes von 10mm Durchmesser und 5mm Tiefe. So entstanden 36 Plättchen, die nach der Aushärtung aus der Form herausgelöst werden konnten und einzeln auf einer Präzisionswaage gewogen wurden. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass das Gewicht der einzelnen Plättchen annähernd gleich war und eine Standardabweichung von 10% nicht überschritten wurde.



Abbildung 1 : Lochplatten zur standardisierten Zementplättchenherstellung zur Prüfung unterschiedlicher Antiseptikakonzentrationen

In den folgenden Versuchsansätzen wurde den Zementkomponenten Octenidinpulver zugesetzt. Es entstanden somit Zementplättchen mit den Konzentrationen: 5% Octenidin - das entspricht einem Zusatz von 1g Octenidin - , 6% Octenidin (1,2g), 7% Octenidin (1,4g) und 8% Octenidin (1,6g). Das zugesetzte Octenidinpulver wurde gründlich mit einem sterilen Spatel mit dem Zementpulver vermischt, um vor der Zugabe der Monomerflüssigkeit eine möglichst homogene Mischung zu erreichen. Die vermischten Pulverkomponenten wurden ebenfalls steril hergestellt und anschließend vor ihrer Verwendung tief gefroren.

Alle diese Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Plättchen wurden bis zu ihrer Verwendung kühl, dunkel und in sterilen Behältern gelagert.



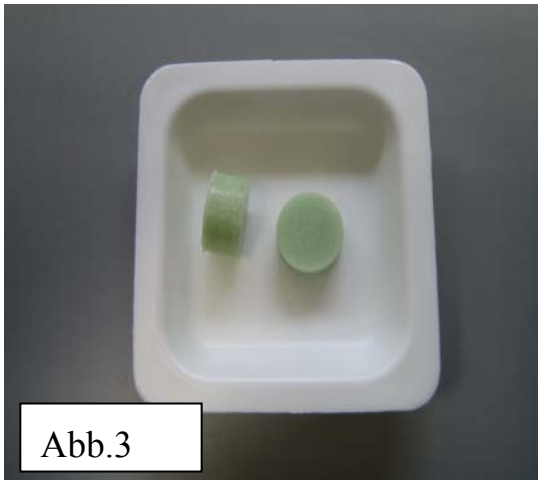


Abbildung 2: Antiseptikahaltige Plättchen aus Polymethylmethacrylat-Zement in Vanek- Bechern
Abbildung 3: Beispiel für standardisierte antiseptikahaltige Plättchen aus Polymethylmethacrylat-Zement

2.2.1.2 Herstellung der Bakteriensuspension

Als Nährlösung für die Bakteriensuspension diente eine CASO-Nährbouillon, indem 30g des Nährmediums in einem Liter demineralisiertem Wasser aufgelöst und anschließend autoklaviert wurde. Anschließend wurde eine Bakteriensuspension mit einer spezifischen optischen Dichte nach dem McFarland Standard 0,5 in 0,9% iger NaCl-Lösung mit Hilfe eines Spektralphotometers hergestellt. Diese spezifische optische Dichte betrug bei *Pseudomonas aeruginosa* 0,14 und bei *Staphylococcus aureus* 0,13. Diese konnte erreicht werden, indem man mit einem sterilen Wattetupfer eine frisch angezüchtete Bakterienkolonie in 0,9%ige NaCl-Lösung einbrachte und anschließend entweder durch Zugabe von weiteren Bakterienkulturen oder durch Zugabe von NaCl-Lösung diesen Wert einstellte. Diese Methode ermöglichte es, die Menge von Bakterien auf 10^6 Kolonie bildende Einheiten (KBE) pro ml NaCl zu standardisieren. Der direkte Nachweis dieser Bakterienzahl gelang über die Herstellung von Verdünnungsreihen. Dazu wurden 100µl der Bakteriensuspension mit 900µl steriler 0,9%iger NaCl-Lösung vermischt. Das entspricht einer Verdünnung um den Faktor zehn. Anschließend wurden vier weitere Verdünnungen nach derselben Methode durchgeführt . Die dritte und die vierte Verdünnung wurden dann auf einer CASO-Blut-Agar Platte ausgespatelt und für 24 Stunden bei 36° Celsius bebrütet. Danach wurden die Kolonien ausgezählt, wobei in der dritten Verdünnungsstufe 100 KBE und in der vierten Verdünnungsstufe 10 KBE der Zielmenge entsprach.

Nun galt es, 500µl der Bakteriensuspension in 50ml der CASO-Nährbouillon einzubringen, um wieder die Zielmenge von 10^6 KBE pro ml Lösung zu erreichen. Nachdem mit Hilfe eines Vibrationsschüttlers eine homogene Suspension hergestellt war, wurden dann je 5ml der Bakterienbouillon in die vorher beschrifteten Reagenzgläser pipettiert. Dieser Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt. Des

weiteren wurden eine Positivprobe, die nur Bakteriensuspension ohne Zementplättchen enthielt, eine Negativprobe, die nur die Nährbouillon enthielt und eine Nullprobe mit Bakteriensuspension und Zementplättchen ohne Octenidin angesetzt.



Abbildung 4: Keimsuspensionen (10^6 pro ml) mit Staphylococcus aureus plus Zementplättchen mit verschiedenen Antiseptikakonzentrationen vor Bebrütung

Alle Reagenzgläser wurden nun für 24 Stunden bei 36° Celsius bebrütet. Nach der Bebrütungszeit wurden die Zementplättchen in eine nach oben beschriebener Methode hergestellte frische Bakteriensuspension überführt und für weitere 24 Stunden bebrütet. Zur Auswertung der Proben wurden je 100µl Bakteriensuspension entnommen, die nach dem Grad der optisch wahrnehmbaren Trübung verdünnt wurde. Die Verdünnungsstufen, bei der die Anzahl der KBEs zwischen 20 und 100 vermutet wurde, wurde auf einer CASO-Blut-Agar Platte ausgespatelt. Zusätzlich wurde von jedem Reagenzglas ein Direktausstrich von 100µl bebrüteter Bakteriensuspension angefertigt, um eine Trübung durch eventuell freigesetztes Octenidin von Bakterien unterscheiden zu können. Es folgte eine ebenfalls 24 stündige Bebrütungsphase aller Ausstriche bei 36° im Brutschrank. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der KBEs auf den bebrüteten Platten.



Abbildung 5: Keimsuspensionen (10^6 pro ml) mit Staphylococcus aureus plus Zementplättchen mit verschiedenen Antiseptikakonzentrationen nach 24 h Bebrütung

Oben dargestellter Versuch hatte eine Versuchsdauer von sieben aufeinander folgenden Tagen. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1.3 Nachweis der Elution von Octenidin aus Knochenzementplättchen

Zum Nachweis der Elution von Octenidin wurden Zementplättchen mit 5%-8% igem Octenidin für sechs Wochen in 5ml Phosphatpuffer gelegt. Der Zeitraum wurde deswegen auf sechs Wochen angelegt, da innerhalb dieser Zeit normalerweise eine Knochenfrakturheilung abgeschlossen ist. Zu jeweils verschiedenen definierten Zeitpunkten wurden die Plättchen dann der Lösung entnommen und in eine frische Phosphatpufferlösung überführt. Die verschiedenen Entnahmezeitpunkte sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Versuchsbeginn war am 10.08.2004, sechs Wochen später wurden die letzten Proben entnommen.

Tabelle 3: Elutionsversuch von Octenidin aus Polymethylmethacrylat-Zementplättchen in Phosphatpufferlösung

1-112 entspricht den Röhrchenbeschriftungen mit dem Eluat zum angegebenen Zeitpunkt

Entnahmezeitpunkt	**5% Octenidin**		**6% Octenidin**		**7% Octenidin**		**8% Octenidin**	
Nach 1 h	1	15	29	43	57	71	85	99
Nach 2 h	2	16	30	44	58	72	86	100
Nach 3 h	3	17	31	45	59	73	87	101
Nach 6 h	4	18	32	46	60	74	88	102
Nach 12 h	5	19	33	47	61	75	89	103
Nach 24 h	6	20	34	48	62	76	90	104
Nach 2 d	7	21	35	49	63	77	91	105
Nach 4 d	8	22	36	50	64	78	92	106
Nach 7 d	9	23	37	51	65	79	93	107
Nach 14 d	10	24	38	52	66	80	94	108
Nach 21 d	11	25	39	53	67	81	95	109
Nach 28 d	12	26	40	54	68	82	95	110
Nach 35 d	13	27	41	55	69	83	97	111
Nach 42 d	14	28	42	56	70	84	98	112

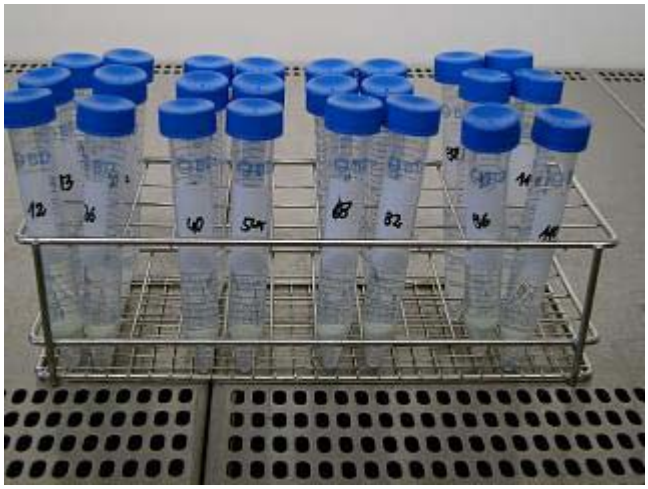


Abbildung 6: Phosphatpufferversuch im Ansatz, Zementplättchen mit verschiedenen Konzentrationen von Octenidin eingelegt zur Elution in Phosphatpufferlösung

Der 0,1 molare Phosphatpuffer wurde durch Mischung von NaH_2PO_4 mit Na_2HPO_4 hergestellt und unter zu Hilfenahme eines pH-Meters auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Nach dem Autoklavieren des Puffers erfolgte die Aufteilung des Phosphatpuffers, jeweils fünf Milliliter, auf die Reagenzgläser. Auch dieser Versuch wurde im Doppelansatz und unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zementplättchen mit den verschiedenen Octenidinkonzentrationen verblieben dann bis zu einem vorher festgelegten Entnahmezeitpunkt im Reagenzglas, ehe diese dann in einen frischen Phosphatpuffer überführt wurden. Bis zur Konzentrationsbestimmung des Octenidins wurden die Röhrchen mit dem Phosphatpuffer bei -20° Celsius tiefgefroren. So konnte man die Elution des Octenidin in Abhängigkeit von der in den Plättchen enthaltenen Octenidinkonzentration und der Verweildauer ermitteln. Diese Untersuchungen fanden im Labor der Firma Schülke & Mayr statt, die die Proben mit Hilfe einer High Performance Liquid Chromatography (HPLC) auswerteten.

Bei der HPLC handelt es sich um ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Sie stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase transportiert wird. Je nach Art der Wechselwirkung zwischen stationärer, mobiler Phase und Probe unterscheidet man in der Flüssigkeitschromatographie folgende Trennmechanismen: Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustausch-, Ausschluß- und Affinitätschromatographie. Bei der Adsorptionschromatographie werden die Probenmoleküle durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen reversibel an die stationäre Phase gebunden. Die Verweildauer der Substanzen an der stationären Phase ist aufgrund der unterschiedlich starken Wechselwirkung mit der Oberfläche der stationären Phase unterschiedlich lang. So werden die Probesubstanzen voneinander getrennt. Bei der Verteilungschromatographie nutzt man die unterschiedliche Löslichkeit der zu

trennenden Substanzen in den beiden Phasen aus. Bei der Normalphasen-Verteilungs-Chromatographie ist die stationäre Phase polarer als die mobile Phase, bei der Reversed-Phase-Chromatographie ist die mobile Phase polarer als die stationäre. Die stationäre Phase kann an ein Trägermaterial chemisch gebunden werden oder das Trägermaterial wird einfach mit der stationären Phase belegt. Die Reversed-Phase-Chromatographie wird vorwiegend bei unpolaren oder wenig polaren Substanzen angewandt (56).

2.2.2 Adhäsionsversuche an PMMA-Knochenzement

Die Adhäsionsversuche setzten sich aus zwei Versuchsteilen zusammen. Für den ersten Teil des Experimentes wurden, wie unter 2.2.1.1. bereits beschrieben, Zementplättchen hergestellt. Eine Serie von Plättchen enthielt kein, eine zweite 8% Octenidin. Diese wurden wieder gewogen, um ein einheitliches Gewicht zu gewährleisten und anschließend bis zu ihrer Verwendung kühl und dunkel verwahrt.

Um im zweiten Versuchsteil eine eventuell mögliche Adhäsion von Testkeimen unter dem Fluoreszenzmikroskop nachweisen zu können, wurde der PMMA-Zement in eine möglichst plane Objektträgerform gebracht. Hierzu wurde der flüssige Zement auf eine Glasscheibe aufgebracht und mit einer zweiten komprimiert. Nach Aushärten des Zements erhielt man eine plane Zementscheibe, die anschließend in Stücke unterteilt wurde, die die Größe eines Objektträgers hatten. Auch die so gewonnenen Zementteilchen in Form eines Objektträgers wurden bis zu ihrer Verwendung kühl und dunkel gelagert.

Für den ersten Versuchsteil zur Adhäsionsprüfung wurden 99ml einer Caso-Nährbouillon in ein Becherglas pipettiert. Zur Beimpfung derselben wurde mit Hilfe des McFarland Standards 0,5 eine Suspension hergestellt, die 10^8 Keime enthielt. Als Keime fanden im ersten Versuchsdurchgang *Staphylococcus aureus* und im zweiten *Pseudomonas aeruginosa* Verwendung. Durch Zugabe von einem Milliliter der Keimsuspension zu der Nährlösung konnte die Keimzahl in der Bouillon auf 10^6 Keime pro Milliliter eingestellt werden. Die tatsächliche vorhandene Keimzahl wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen bestätigt. Dazu wurden Eppendorfzylinder mit 900µl NaCl befüllt und mit 100µl der Keimsuspension verdünnt. Aus diesem Zylinder wurde dann wieder 100µl Suspension entnommen und in den nächsten mit 900µl NaCl befüllten Zylinder weitergegeben. Die letzten drei Verdünnungsstufen wurden dann jeweils auf einem Caso-Blutagar ausgespatelt. Nach 24 stündiger Bebrütung im Brutschrank bei 37° Celsius konnte dann mittels Auszählen der koloniebildenden Einheiten auf die genaue Anzahl der Keime rückgeschlossen werden. Diese Auszählungen bestätigten den Keimgehalt von 10^6 pro Milliliter Suspension. In die Suspension wurden Zementplättchen ohne Octenidinbeimengung, sowie in einem weiteren Versuchsansatz

Plättchen mit 8% Octenidingehalt gelegt. Diese Proben wurden auf einer Schüttelbank im Brutschrank inkubiert. Anschließend galt es, die Dauer der Inkubation der Plättchen in der Suspension festzulegen. Dazu sind mehrere Versuchsansätze mit unterschiedlicher Inkubationszeit (30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 240 min) durchgeführt und ausgewertet worden. Daraus ließ sich eine optimale Inkubationszeit für die Adhäsionsversuche mit *Staphylococcus aureus* von 60 min ermitteln, da nach selbiger die höchste Keimdichte an den Plättchen gefunden werden konnte. Dieselbe Inkubationszeit fand ebenso in der Versuchsreihe mit *Pseudomonas aeruginosa* Anwendung.

Alle der folgenden Experimente wurden im dreifachen Ansatz durchgeführt. Wie oben beschrieben, erfolgte die Inkubation von jeweils drei Zementplättchen entweder ohne oder mit Zusatz von Octenidin in der dazu vorbereiteten Keimsuspension für 60 min im Brutschrank bei 37° Celsius. Danach wurden mit sterilen Pinzetten je ein bebrütetes Zementplättchen in ein 50ml fassendes Eppendorfröhrchen überführt. Anschließend erfolgten drei Waschschritte durch Zugabe von je 20ml NaCl 0,9%. Danach Aufschütteln unter Zugabe von 10ml NaCl und Entnahme von 100µl aus der so gewonnenen Suspension. Eine zweite Probe ebenfalls von 100µl wurde 1:100 verdünnt. Die entnommenen Proben wurden auf einem Caso-Blutagar ausgespatelt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die restliche Suspension wurde daraufhin verworfen. Es folgte eine weitere Befüllung der mit dem Zementplättchen belegten Röhrchen mit 10ml NaCl. Diese Probe wurde für 30 Sekunden in ein Ultraschallbad eingebracht. Danach wurden wieder 100 µl aus der Suspension direkt und verdünnt ausgespatelt. Die zweite Probe von 100µl aus derselben Suspension wurde 1:100 verdünnt, auf Caso-Agar ausgestrichen und für 24 Stunden im Brutschrank bebrütet. Am nächsten Tag erfolgte die Auszählung der koloniebildenden Einheiten.

Für den zweiten Teil dieses Adhäsionsversuches wurden die wie oben beschrieben hergestellten Objektträger aus PMMA-Knochenzement verwendet. Diese wurden ebenfalls für eine Stunde in einer mit entweder *Staphylococcus aureus* oder *Pseudomonas aeruginosa* beimpften Keimsuspension auf einer Schüttelbank inkubiert. Allerdings wurde die Nährlösung mit 10^{10} koloniebildenden Einheiten pro Milliliter zur besseren fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung versetzt. Bestätigung fand diese Keimzahl in oben beschriebenen Verdünnungsreihen. Nach der Inkubationsphase wurden die Objektträger aus Zement gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Diese Präparate wurden auf einem Objektträger aus Glas fixiert. Danach erfolgte unter Zugabe von 15µl eines bestimmten Fluoreszenzfarbstoffes- Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits- auf diese Präparate die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes, der lebendige Bakterien grün und tote Bakterien rot fluoreszieren lässt, konnte der Befund differenziert und ausgewertet werden.

2.2.3 Statistik

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Mittelwerte berechnet. Außerdem wurde die Reduktion der Testkeime bei unterschiedlichen Antiseptikakonzentrationen in log Stufen angegeben. Statistische Verfahren gelangten nicht zur Anwendung.

3. Ergebnisse

3.1 Mikrobiologische Versuche

3.1.1 Herstellung von Zementplättchen für die Versuche

Das Versuchsprotokoll über die Herstellung der einzelnen Chargen der Zementplättchen ohne bzw. mit Zugabe von Octenidin ist in Tabellen 17-21 im Anhang einsehbar. Die Zementplättchen ohne Zusatz von Octenidin hatten ein durchschnittliches Gewicht von 0,4587g pro Plättchen. Die Abweichung im Gewicht der einzelnen Plättchen betrug 7,9%. Bei den Plättchen, denen 5% Octenidin zugesetzt wurde, konnte ein Durchschnittsgewicht von 0,4530g pro Plättchen ermittelt werden. Die Gewichtsabweichung lag bei 9,4%. Bei Zugabe von 6% des Wirkstoffes lag das gemittelte Gewicht bei 0,4428g pro Plättchen. Die Abweichung betrug 5,6%. Die Plättchen mit 7% Octenidin wogen im Durchschnitt 0,4158g. Hier trat eine Standardabweichung von 6,2% auf. Bei den mit 8% Octenidin beladenen Zementplättchen belief sich das durchschnittliche Gewicht auf 0,4339g pro Plättchen. Die ermittelte Standardabweichung betrug 6,43%. Die Plättchen, die entweder zu schwer oder zu leicht waren wurden aussortiert, damit die willkürlich festgelegte Standardabweichung von maximal 10% gewährleistet werden konnte.

3.1.2 Wachstumsverhalten von Staphylococcus aureus unter dem Einfluss unterschiedlicher Octenidinkonzentrationen

Der Versuchsansatz mit *Staphylococcus aureus* und 5%-8% Octenidin enthaltenden Zementplättchen erbrachte folgende Resultate:

Abbildung 7 zeigt die Wirkung von Zementplättchen mit einem Octenidingehalt von 5% auf *Staphylococcus aureus*. Die der Bouillon zugesetzte Keimzahl war über sieben Tage konstant. Ebenfalls konstant war die Keimzahl in der Positivprobe und mit einer Ausnahme - am vierten Tag - auch die Keimzahl in der Nullprobe. Die Negativprobe war erwartungsgemäß keimfrei. Der Effekt des Octenidin war in den im Doppelansatz durchgeführten Versuchen in beiden Proben nachweisbar.

Bei 5% Octenidin findet sich eine deutliche Reduktion der Keimlast in beiden Proben. Das Ausmaß der Keimreduktion reicht von einer Logstufe bis zur vollständigen Eradikation der Keime. Das entspricht dann einer Reduktion der Keimlast um sechs Logstufen. Des weiteren erkennt man in Abbildung 7, dass in der Probe A am ersten und zweiten Versuchstag die Keimzahl annähernd die Anzahl der 10^6 zugesetzten Keime erreicht und der erwünschte antiseptische Effekt des Octenidins nicht so deutlich auftritt.

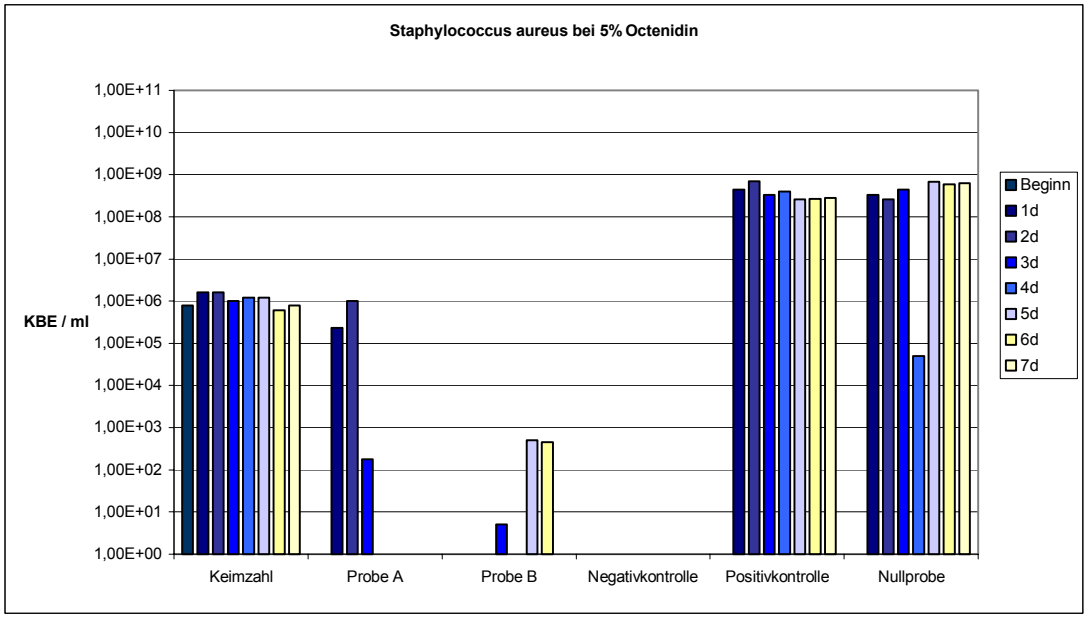


Abbildung 7: Wachstumsverhalten von Staphylococcus aureus bei 5% Octenidin in Polymethylmethacrylat-Knochenzement (KBE = Kolonie bildende Einheiten, d = Tag, Keimzahl = der Nährlösung zugesetzte Bakterienanzahl, Probe A/B = erste und zweite Versuchsreihe, Negativkontrolle= Nährlösung ohne Zementplättchen und ohne Bakterienzusatz, Positivkontrolle = Nährlösung mit Bakterienzusatz ohne Zementplättchen, Nullprobe = Nährlösung mit Bakterienzusatz und Zementplättchen ohne Octenidin)

Bei 6% Octenidin haltigen Zementplättchen lässt sich ebenfalls die in Abbildung 8 dargestellte bakterizide Wirkung des Octenidin aufzeigen. Probe A zeigt allerdings am zweiten und dritten Tag, Probe B am ersten, zweiten, dritten und siebten Tag keine vollständige bakterizide Wirkungsweise des Octenidin auf. Jedoch kann ein Reduktionspektrum gefunden werden, das von einer bis zu sechs logarithmischen Stufen reicht. Eine Reduktion um sechs logarithmische Stufen bedeutet eine vollständige Vernichtung aller zugesetzten Keime.

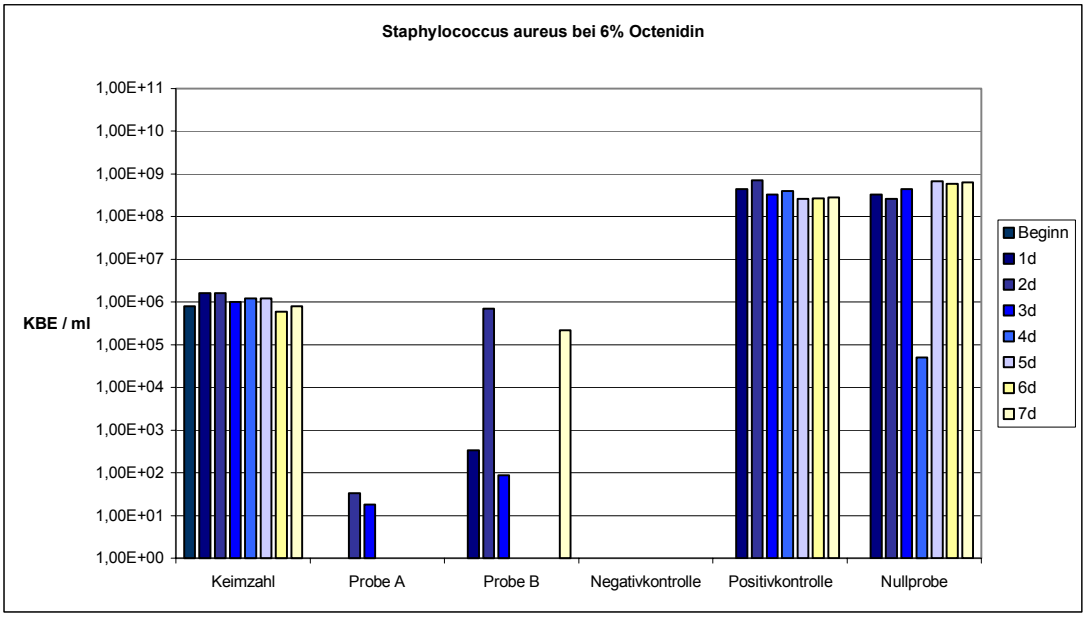


Abbildung 8 : Wachstumsverhalten von Staphylococcus aureus bei 6% Octenidin in Polymethylmethacrylat- Knochenzement (KBE = Kolonie bildende Einheiten, d = Tag, Keimzahl = der Nährlösung zugesetzte Bakterienanzahl, Probe A/B = erste und zweite Versuchsreihe, Negativkontrolle = Nährlösung ohne Zementplättchen und ohne Bakterienzusatz, Positivkontrolle = Nährlösung mit Bakterienzusatz ohne Zementplättchen, Nullprobe = Nährlösung mit Bakterienzusatz und Zementplättchen ohne Octenidin)

Der Versuchsansatz mit *Staphylococcus aureus* und Zementplättchen mit 7% Octenidingehalt zeigt, wie Abbildung 9 darstellt, ebenfalls die Bakterizidie des Antiseptikums. Probe A zeigt am dritten, Probe B am fünften und siebten Tag nur bedingt bakterizide Wirkung des Octenidin. Das heißt, dass das Antiseptikum, das an den anderen Tagen die Keimzahl um sechs logarithmische Stufen mindert, hier eine geringere Effizienz aufweist. Dies geht jedoch mit einer Reduktion der Keimzahl um mindestens eine Zehnerpotenz einher.

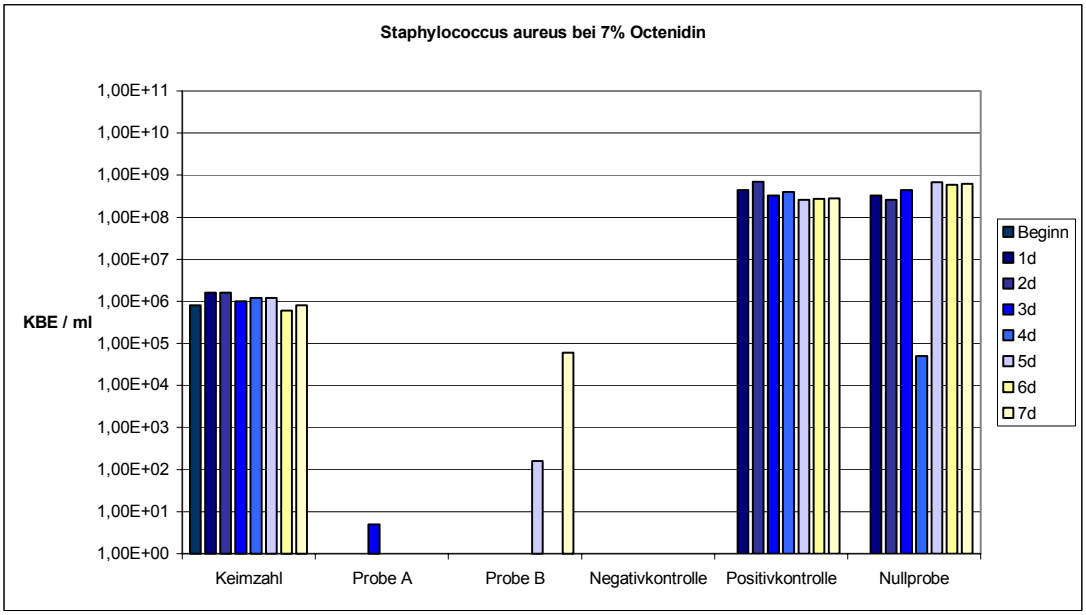


Abbildung 9 : Wachstumsverhalten von Staphylococcus aureus bei 7% Octenidin in Polymethylmethacrylat- Knochenzement (KBE = Kolonie bildende Einheiten, d = Tag, Keimzahl = der Nährlösung zugesetzte Bakterienanzahl, Probe A/B = erste und zweite Versuchsreihe, Negativkontrolle = Nährlösung ohne Zementplättchen und ohne Bakterienzusatz, Positivkontrolle = Nährlösung mit Bakterienzusatz ohne Zementplättchen, Nullprobe = Nährlösung mit Bakterienzusatz und Zementplättchen ohne Octenidin)

Auch 8% Octenidin haltige Zementplättchen zeigen einen bakteriziden Effekt auf *Staphylococcus aureus*. In der Probe A findet man an allen Tagen eine vollständige Auslöschung aller zugesetzten Keime. Dies entspricht einer Reduktion der Keimlast von sechs Logstufen. In der Probe B zeigt das Antiseptikum am dritten und vierten Versuchstag eine Reduktion der Keimlast um zwei, am sechsten Versuchstag eine Reduktion um drei Zehnerpotenzen im Vergleich zur zugegebenen Keimzahl. Abbildung 10 verdeutlicht oben beschriebene Ergebnisse.

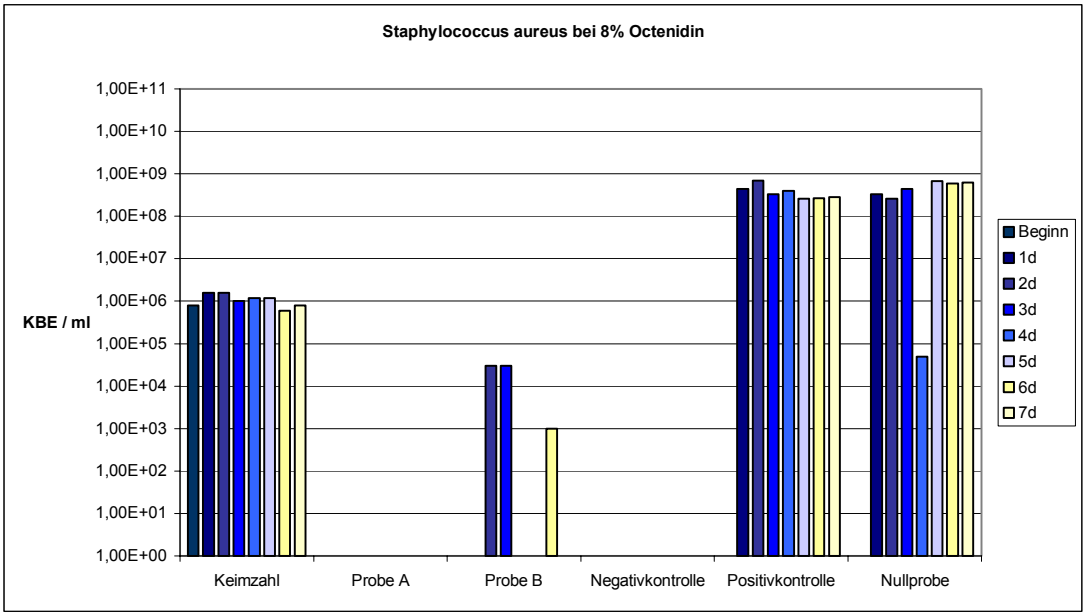


Abbildung 10: Wachstumsverhalten von Staphylococcus aureus bei 8% Octenidin in Polymethylmethacrylat Knochenzement (KBE = Kolonie bildende Einheiten, d = Tag, Keimzahl = der Nährlösung zugesetzte Bakterienanzahl, Probe A/B = erste und zweite Versuchsreihe, Negativkontrolle = Nährlösung ohne Zementplättchen und ohne Bakterienzusatz, Positivkontrolle = Nährlösung mit Bakterienzusatz ohne Zementplättchen, Nullprobe = Nährlösung mit Bakterienzusatz und Zementplättchen ohne Octenidin)

3.1.3 Wachstum von Pseudomonas aeruginosa unter dem Einfluss unterschiedlicher Octenidinkonzentrationen

Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Wachstumsversuche von *Pseudomonas aeruginosa* mit 5% Octenidin haltigen Zementplättchen. Auch hier war die der Nährbouillon zugesetzte Keimzahl über sieben Tage hinweg konstant. Erwartungsgemäß konnte ein Wachstum sowohl in der Positivprobe als auch in der Nullprobe festgestellt werden. Die Negativprobe war frei von Bakterien. In Proben A und B zeigte sich aber trotz Zementplättchen mit Wirkstoffzusatz täglich ein Keimzuwachs von ungefähr zwei Zehnerpotenzen. Dieser Zuwachs entsprach annäherungsweise dem in der Positiv- und der Nullprobe. Jedoch stellte sich an einigen Tagen eine leichte Reduktion der Keimlast gegenüber der Positiv- bzw. Nullprobe dar. Das heißt, dass 5% Octenidin haltige Zementplättchen keinen bakteriziden Effekt auf das Wachstumsverhalten von *Pseudomonas aeruginosa* in diesem Versuch zeigt.

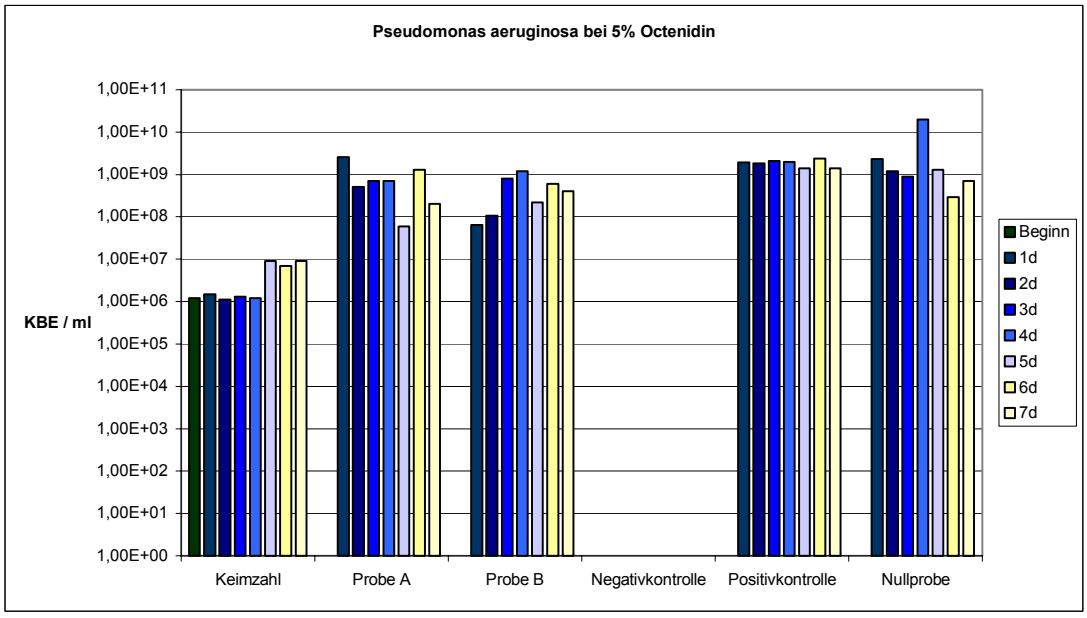


Abbildung 11: Wachstumsverhalten von Pseudomonas aeruginosa bei 5% Octenidin in Polymethylmethacrylat – Knochenzement (KBE = Kolonie bildende Einheiten, d = Tag, Keimzahl = der Nährlösung zugesetzte Bakterienanzahl, Probe A/B = erste und zweite Versuchsreihe, Negativkontrolle = Nährlösung ohne Zementplättchen und ohne Bakterienzusatz, Positivkontrolle = Nährlösung mit Bakterienzusatz ohne Zementplättchen, Nullprobe = Nährlösung mit Bakterienzusatz und Zementplättchen ohne Octenidin)

Das Diagramm 12 zeigt wie das obige auch bei 6% Octenidin einen annäherungsweise normalen Keimzuwachs um zwei Zehnerpotenzen in beiden Proben an allen sieben Tagen, der jedoch in beiden Proben an den jeweils ersten vier Tagen geringer ausfällt als in der Positivprobe. Es konnte im Vergleich zum normalen Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* in der Positivkontrolle an diesen Tagen eine Reduktion des Wachstums um bis zu drei Logstufen gefunden werden.

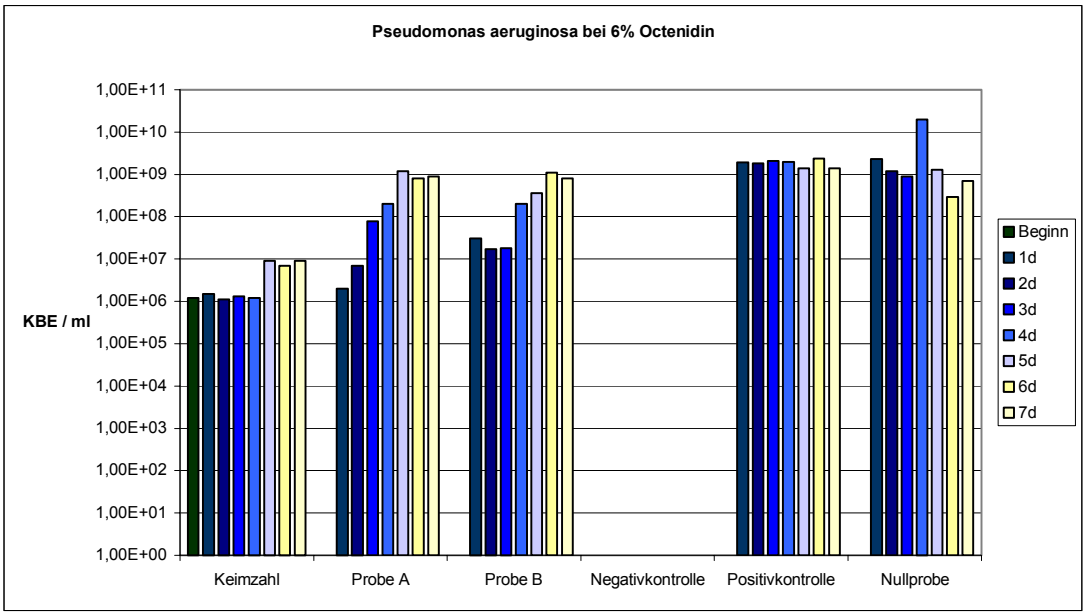


Abbildung 12: Wachstumsverhalten von Pseudomonas aeruginosa bei 6% Octenidin in Polymethylmethacrylat – Knochenzement (KBE = Kolonie bildende Einheiten, d = Tag, Keimzahl = der Nährlösung zugesetzte Bakterienanzahl, Probe A/B = erste und zweite Versuchsreihe, Negativkontrolle = Nährlösung ohne Zementplättchen und ohne Bakterienzusatz, Positivkontrolle = Nährlösung mit Bakterienzusatz ohne Zementplättchen, Nullprobe = Nährlösung mit Bakterienzusatz und Zementplättchen ohne Octenidin)

7% Octenidin haltige Zementplättchen hatten, wie Diagramm 13 zeigt, eine bakteriostatische Wirkung auf *Pseudomonas aeruginosa*. Der Wirkeffekt des Octenidin zeigte sich in beiden Proben an den jeweils ersten fünf Versuchstagen. Das heißt, dass sich im Gegensatz zu einem Keimzuwachs um drei Zehnerpotenzen in der Positivprobe in den Ansätzen mit einem 7% Octenidin haltigen Zementplättchen lediglich ein Anstieg der Keimzahl von einer oder zwei Zehnerpotenzen im Bezug auf die Ausgangskeimzahl nachweisen lässt. In der Probe A ist die ermittelte Keimzahl am dritten Tag, in der Probe B am zweiten, dritten und vierten Tag im Gegensatz zur Ausgangskeimzahl sogar reduziert. Des weiteren fällt auf, dass in beiden Proben und an allen Tagen im Endeffekt weniger Keime im Ansatz zu finden waren als in der Positivprobe, die das normale Wachstumsverhalten des Keimes in vitro widerspiegelt. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse dieser Proben.

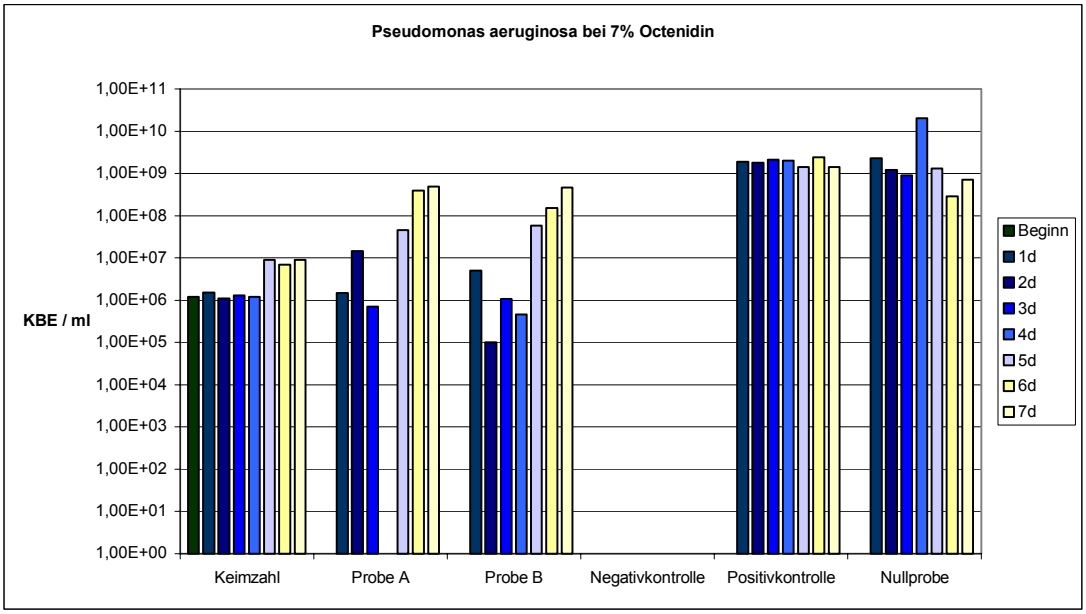


Abbildung 13: Wachstumsverhalten von Pseudomonas aeruginosa bei 7% Octenidin in Polymethylmethacrylat – Knochenzement (KBE = Kolonie bildende Einheiten, d = Tag, Keimzahl = der Nährlösung zugesetzte Bakterienanzahl, Probe A/B = erste und zweite Versuchsreihe, Negativkontrolle = Nährlösung ohne Zementplättchen und ohne Bakterienzusatz, Positivkontrolle = Nährlösung mit Bakterienzusatz ohne Zementplättchen, Nullprobe = Nährlösung mit Bakterienzusatz und Zementplättchen ohne Octenidin)

Bei 8% Octenidin treten in beiden Proben an verschiedenen Versuchsagen auch die Keimzahl senkende Effekte des Octenidins zu Tage. In Abbildung 14 ist dies graphisch dargestellt. Gegenüber der Positivkontrolle sind die Keimzahlen an allen Versuchstagen mit octenidinhaltigem Zement verringert. Es lässt sich in Probe A am zweiten und dritten Versuchstag, in der Probe B am ersten, zweiten und vierten Versuchstag sogar eine Reduktion der Keimzahl unter die Ausgangskeimzahl von 10^6 darstellen. Dies entspricht einer Minderung der Ausgangskeimzahl um eine Zehnerpotenz. Auch wurde in dieser Versuchsreihe mit Octenidinzusatz an keinem der Versuchstage das physiologische Wachstumsverhalten wie in der Positivkontrolle erreicht.

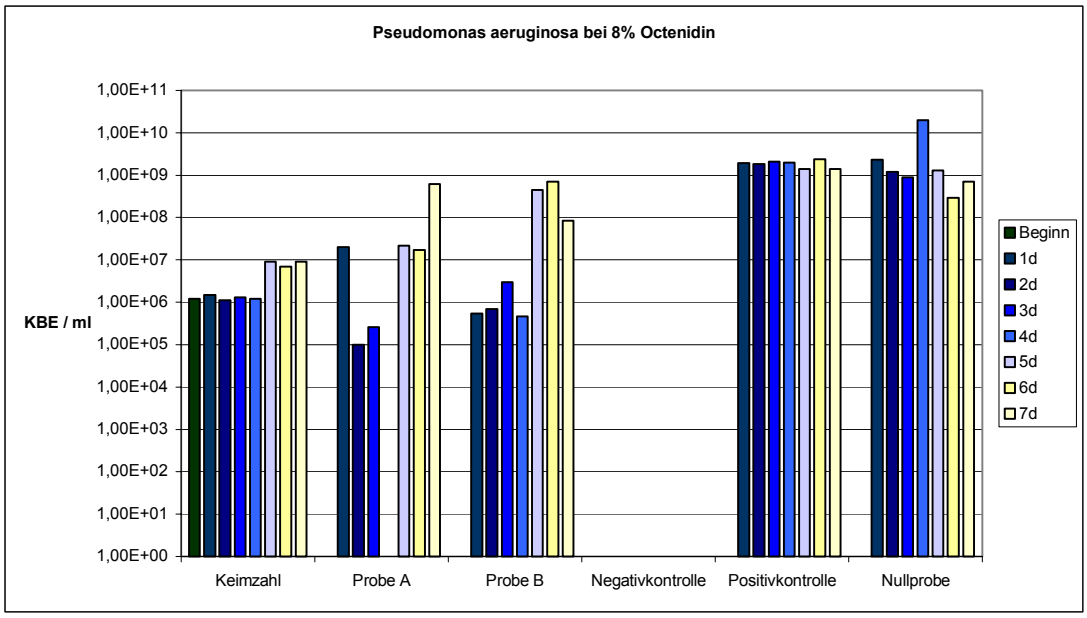


Abbildung 14: Wachstumsverhalten von Pseudomonas aeruginosa bei 8% Octenidin in Polymethylmethacrylat – Knochenzement (KBE = Kolonie bildende Einheiten, d = Tag, Keimzahl = der Nährlösung zugesetzte Bakterienanzahl, Probe A/B = erste und zweite Versuchsreihe, Negativkontrolle = Nährlösung ohne Zementplättchen und ohne Bakterienzusatz, Positivkontrolle = Nährlösung mit Bakterienzusatz ohne Zementplättchen, Nullprobe = Nährlösung mit Bakterienzusatz und Zementplättchen ohne Octenidin)

3.1.4 Elutions-Phosphatpufferversuche

Die Freisetzungskinetik von Octenidin aus PMMA- Knochenzement, die mittels HPLC von der Firma Schülke und Mayr bestimmt wurde, zeigt sich in folgenden Abbildungen:

Bei fünf Prozent Octenidin zeigte sich bereits beim ersten Entnahmezeitpunkt eine Freisetzung von 100ppm Octenidin. Es folgte eine weitere kontinuierliche Freisetzung des Wirkstoffes über den gesamten Beobachtungszeitraum von sechs Wochen. Dabei ist zu beobachten, dass bereits zu Beginn der Versuchsreihe relativ viel Wirkstoff freigesetzt wurde; der fast lineare Anstieg der Kurve verdeutlicht dies. Im weiteren Verlauf der Untersuchung jedoch verlor sich der lineare Anstieg der Konzentrationskurve nach etwa 12 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits 225ppm Octenidin nachweisbar. Nach sechs Wochen war ein Maximum von 952ppm erreicht. Abbildung 15 zeigt den Verlauf der Elution über sechs Wochen graphisch.

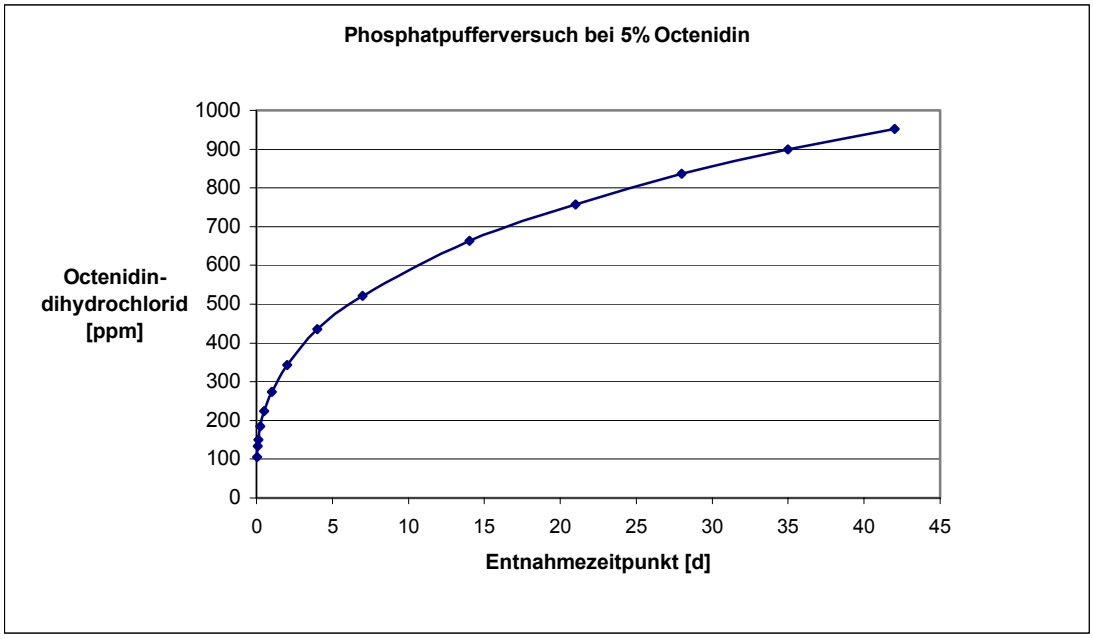


Abbildung 15: Freisetzungskinetik von 5 % Octenidin aus Polymethylmethacrylat-Zement (angegeben ist die Freisetzung von Octenidin aus Polymethylmethacrylat-Zement in Phosphatpufferlösung über sechs Wochen, ppm = parts per million)

Bei sechs Prozent Octenidin im PMMA- Zement lag bereits nach einer Stunde eine Konzentration von 207ppm Octenidin im Eluat vor. Auch hier war in den ersten zwölf Stunden ein fast linearer Anstieg des Octenidins im Eluat erfolgt. Dies führte zu einer Konzentration von 461ppm Octenidin. Danach wurde ebenfalls weiter kontinuierlich Octenidin aus dem Zement freigesetzt. Am Ende der Messung nach sechs Wochen lag eine Gesamtkonzentration von 1673ppm Octenidin vor. Dieser Versuch ist in Abbildung 16 graphisch dargestellt.

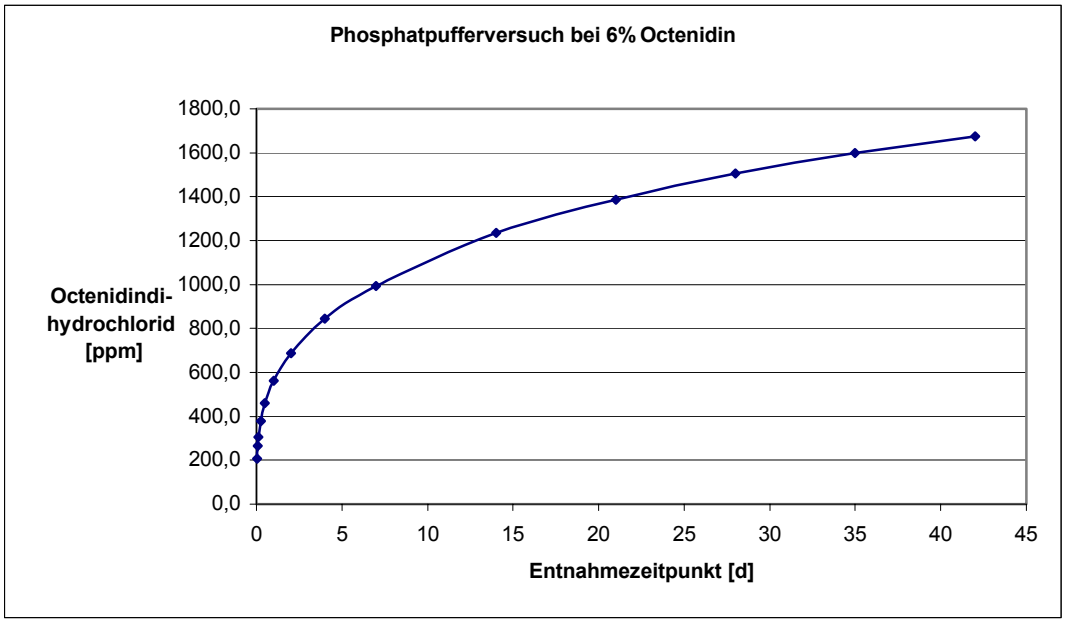


Abbildung 16: Freisetzungskinetik von 6 % Octenidin aus Polymethylmethacrylat-Zement (angegeben ist die Freisetzung von Octenidin aus Polymethylmethacrylat-Zement in Phosphatpufferlösung über sechs Wochen, ppm = parts per million)

Bei 7% Wirkstoff kam es in der ersten Stunde zu einer Freisetzung von 251ppm des Antiseptikums. Auch hier stellte sich über die ersten fünf Messzeitpunkte ein linearer Konzentrationsanstieg dar, der mit einer Konzentration von 586ppm Octenidin einherging. Die über die gesamte weitere Versuchsdauer gemessene Zunahme an Konzentration des Wirkstoffes endete mit einem Wert von 2304ppm nach sechs Wochen. In Abbildung 17 ist der zeitliche Verlauf der Probe wiedergegeben.

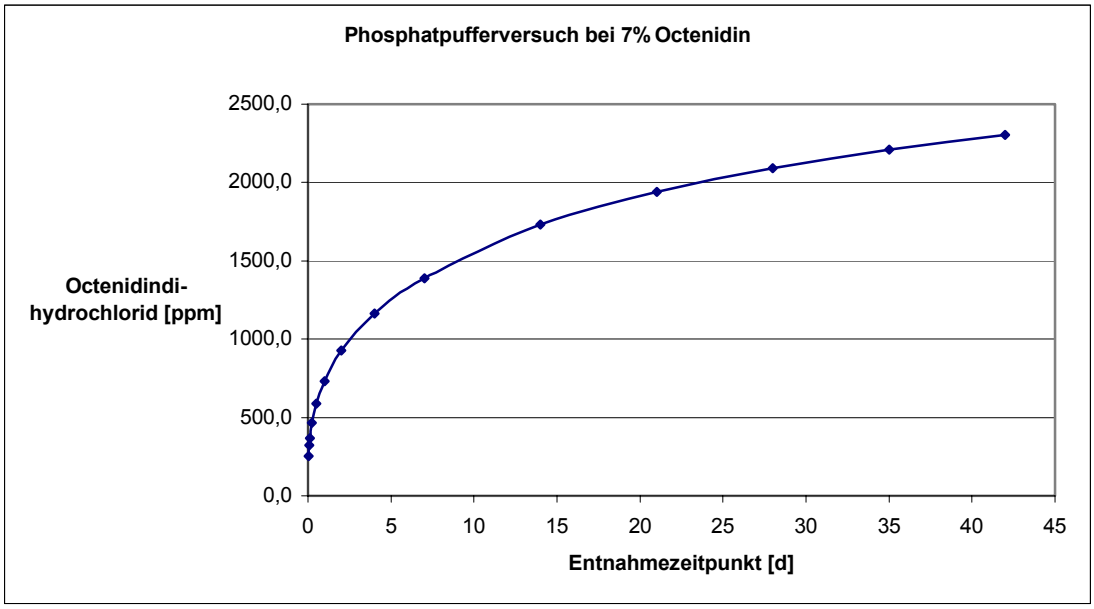


Abbildung 17: Freisetzungskinetik von 7 % Octenidin aus Polymethylmethacrylat-Zement (angegeben ist die Freisetzung von Octenidin aus Polymethylmethacrylat-Zement in Phosphatpufferlösung über sechs Wochen, ppm = parts per million)

Im Versuchsansatz mit 8% Octenidin im Zement wurde in der ersten Stunde eine Freisetzung von 232ppm gemessen. Der lineare Anstieg der Konzentration erreichte nach zwölf Stunden einen Wert 561ppm und endete, wie in Abbildung 18 dargestellt, nach weiterer Freisetzung bei 2514ppm.

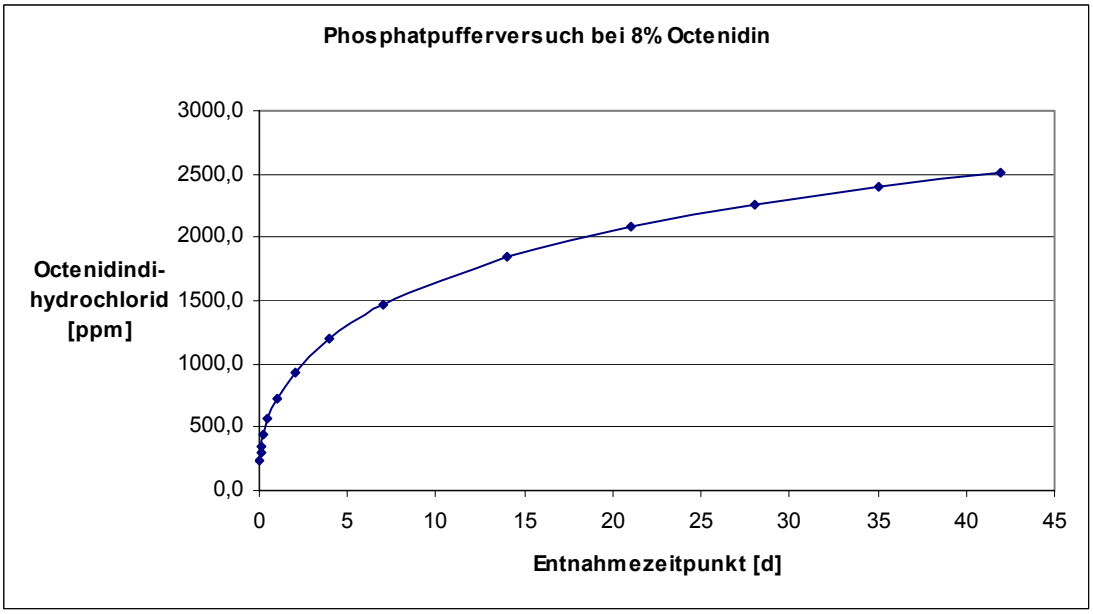


Abbildung 18: Freisetzungskinetik von 8 % Octenidin aus Polymethylmethacrylat-Zement (angegeben ist die Freisetzung von Octenidin aus Polymethylmethacrylat-Zement in Phosphatpufferlösung über sechs Wochen, ppm = parts per million)

3.2 Adhäsionsversuch an PMMA-Knochenzement

3.2.1 Ermittlung der geeigneten Inkubationszeit der Zementplättchen

Um die Inkubationszeit der Zementplättchen in der Keimsuspension ermitteln zu können, wurden mit *Staphylococcus aureus*, wie unter 2.2.2 beschrieben, Versuchsreihen mit verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt. Die Resultate der einzelnen Versuche zu den jeweiligen Inkubationszeiten sind im Folgenden in den Tabellen 4-9 dargestellt.

Staphylococcus aureus: 0% Octenidin

Tabelle 4: Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylatplättchen ohne Octenidin, Inkubationszeit 30 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
30- 1. Ansatz	1	0	49	0
30- 2. Ansatz	1	0	29	0
30- 3. Ansatz	1	0	48	1
Mittelwert	1	0	42	0,33

Tabelle 5: Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylatplättchen ohne Octenidin, Inkubationszeit 45 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
45- 1. Ansatz	3	0	49	0
45- 2. Ansatz	5	0	56	1
45- 3. Ansatz	9	0	33	1
Mittelwert	6	0	46	0,66

Tabelle 6: Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylatplättchen ohne Octenidin, Inkubationszeit 60 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
60- 1. Ansatz	6	0	58	1
60- 2. Ansatz	1	0	36	0
60- 3. Ansatz	12	0	35	0
Mittelwert	6,33	0	43	0,33

Tabelle 7: Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylatplättchen ohne Octenidin, Inkubationszeit 90 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
90- 1. Ansatz	2	0	31	3
90- 2. Ansatz	1	0	37	2
90- 3. Ansatz	2	0	34	0
Mittelwert	2,33	0	34	1,66

Tabelle 8: Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylatplättchen ohne Octenidin, Inkubationszeit 120 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
120- 1. Ansatz	3	0	14	2
120- 2. Ansatz	6	0	11	0
120- 3. Ansatz	6	0	12	1
Mittelwert	5	0	12,33	1

Tabelle 9: Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylatplättchen ohne Octenidin, Inkubationszeit 240 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
240- 1. Ansatz	0	0	1	0
240- 2. Ansatz	0	0	3	0
240- 3. Ansatz	2	0	0	0
Mittelwert	0,66	0	1,33	0

Diese Versuchsansätze machten deutlich, dass für die geplanten Versuche eine Inkubationsdauer von 60min als günstig anzusehen ist, da eine sehr hohe Anzahl an adhärenten Bakterien gefunden werden kann. Diese können dann fluoreszenzmikroskopisch leicht detektiert werden.

Dieselben Ansätze wurden mit *Staphylococcus aureus* und 8% Octenidin haltigen Zementplättchen ebenfalls durchgeführt. In der folgenden tabellarischen Auflistung der verschiedenen Inkubationszeiten wird deutlich, dass zu keinem Zeitpunkt weder im Waschwasser noch nach der Ultraschallbehandlung vermehrungsfähige Bakterien zu finden waren.

Staphylococcus aureus: 8% Octenidin

Tabelle 10: Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylatplättchen mit 8% Octenidin, Inkubationszeit 30 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
30- 1. Ansatz	0	0	0	0
30- 2. Ansatz	0	0	0	0
30- 3. Ansatz	0	0	0	0
Mittelwert	0	0	0	0

Tabelle 11: Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylatplättchen mit 8% Octenidin, Inkubationszeit 60 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
60- 1. Ansatz	0	0	0	0
60- 2. Ansatz	0	0	0	0
60- 3. Ansatz	0	0	0	0
Mittelwert	0	0	0	0

Tabelle 12: Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylatplättchen mit 8% Octenidin, Inkubationszeit 120 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
120- 1. Ansatz	0	0	0	0
120- 2. Ansatz	0	0	0	0
120- 3. Ansatz	0	0	0	0
Mittelwert	0	0	0	0

Tabelle 13: Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylatplättchen mit 8% Octenidin, Inkubationszeit 240 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
240- 1. Ansatz	0	0	0	0
240- 2. Ansatz	0	0	0	0
240- 3. Ansatz	0	0	0	0
Mittelwert	0	0	0	0

3.2.2 Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an PMMA-Knochenzement

3.2.2.1 Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an PMMA-Knochenzement ohne Zugabe von Octenidin

Die Versuche zur Adhäsion von *Staphylococcus aureus* an Zementplättchen ohne Zusatz des Antiseptikums Octenidin nach einer Inkubationszeit von 60min zeigten folgende Ergebnisse:

Die erste Probe aus dem vierten Waschwasser ergab im Mittel einen Wert von 6 KBE pro 100µl. In der bei jedem Ansatz durchgeführten Verdünnung 1: 100 konnten keine Keime nachgewiesen werden. Nach der 30 Sekunden dauernden Ultraschallbehandlung konnten dann aber wieder im Mittel 43 Keime pro 100µl der ausgespatelten Waschlösung gefunden werden.

Tabelle 6: Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylatplättchen ohne Octenidin, Inkubationszeit 60 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
60- 1. Ansatz	6	0	58	1
60- 2. Ansatz	1	0	36	0
60- 3. Ansatz	12	0	35	0
Mittelwert	6,33	0	43	0,33

In der Fluoreszenzmikroskopie wurden in der 1000 fachen Vergrößerung sowohl vitale- an der grünen Fluoreszenz erkennbar- als auch tote, rot fluoreszierende Bakterien gefunden werden. Die meisten der am Knochenzement adhärenten Bakterien stellten sich fluoreszenzmikroskopisch als vital dar.

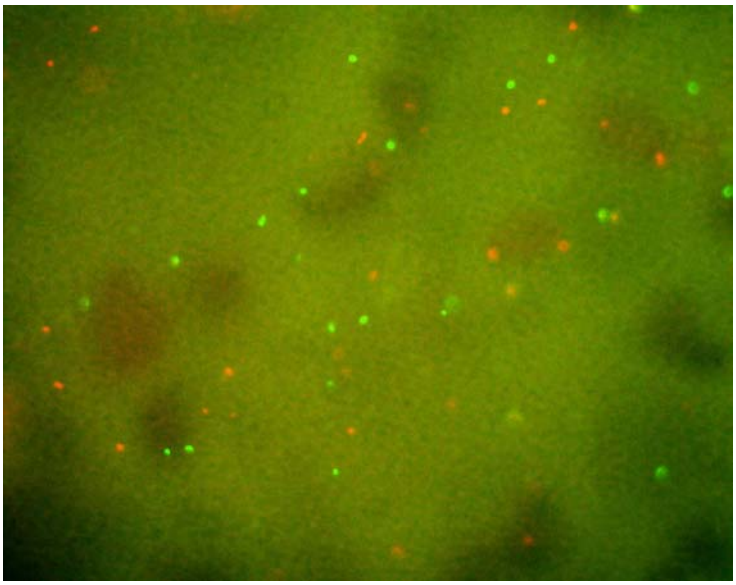


Abbildung 19: Adhäsion von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylat ohne Octenidin, Fluoreszenzmikroskopische Darstellung in 100 facher Vergrößerung

3.2.2.2 Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an PMMA-Knochenzement mit 8% Octenidin

Nach 60 minütiger Inkubation der 8% Octenidin haltigen Zementplättchen in einer Suspension mit *Staphylococcus aureus* fand sich nach dreimaligem Spülen der Plättchen in der vierten Suspension im direkten Ausstrich kein Keimmaterial. Auch die 1:100 Verdünnung der Probe war in allen drei Ansätzen negativ. Mittels der anschließend durchgeführten Ultraschallbehandlung konnten keine Keime nachgewiesen werden. Es waren alle drei Versuchsansätze negativ.

Tabelle 11: Adhäsionsversuch von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylatplättchen mit 8% Octenidin, Inkubationszeit 60 min

Entnahmezeit In min	**Keimzahl Waschwasser direkt**	**Keimzahl Waschwasser 1 : 100**	**Ultraschall-Behandlung direkt**	**Ultraschall-Behandlung 1: 100**
60- 1. Ansatz	0	0	0	0
60- 2. Ansatz	0	0	0	0
60- 3. Ansatz	0	0	0	0
Mittelwert	0	0	0	0

In der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung mit dem Dead/Live BacLight Farbstoff zeigten sich überwiegend rot fluoreszierende Bakterien, die am Knochenzement adhärent waren. Dies weist auf eine irreversible Schädigung der Bakterienmembran hin und ist der Grund für die fehlende kulturelle Anzüchtbarkeit im Versuchsansatz. Das heißt, dass sich auch bei Zugabe von 8% Octenidin zum Knochenzement ein Biofilm an diesem bildet, dieser jedoch nicht aus vitalen Bakterien besteht.

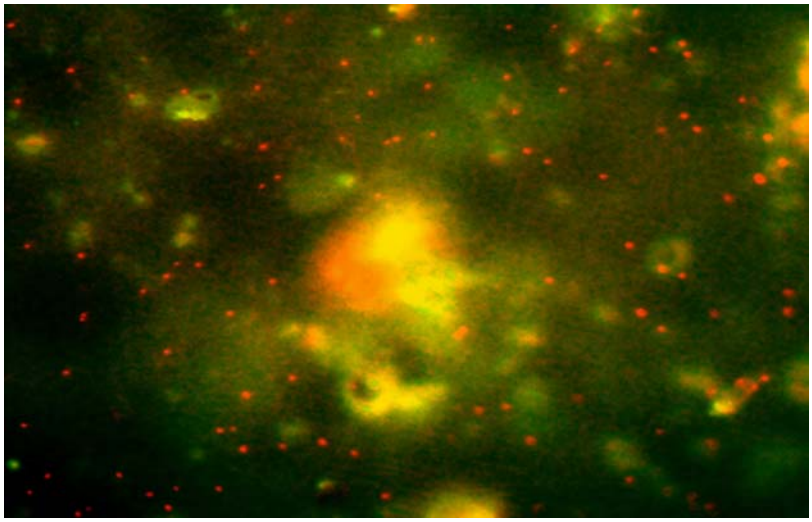


Abbildung 20: Adhäsion von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylat mit 8 % Octenidin, Fluoreszenzmikroskopische Darstellung in 100 facher Vergrößerung

Der Versuchsansatz mit 4% Octenidin haltigen Zementplättchen zeigte ebenfalls die bakterizide Wirkung des aus dem Zement freigesetzten Antiseptikums auf.

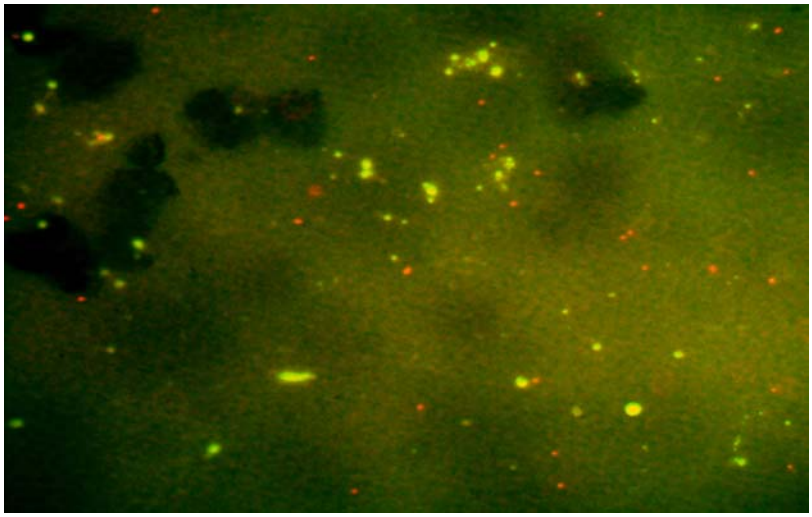


Abbildung 21: Adhäsion von Staphylococcus aureus an Polymethylmethacrylat mit 4 % Octenidin, Fluoreszenzmikroskopische Darstellung in 100 facher Vergrößerung

Hier stellten sich vereinzelt noch vitale, an der grünen Fluoreszenz erkennbare Bakterien dar. Diese konnten bei 8% Octenidin haltigem Zement, wie oben dargestellt, nicht mehr nachgewiesen werden. Der Großteil an adhärentem Keimmaterial stellte sich, bereits an der roten Fluoreszenz erkennbar, geschädigt oder schon tot dar.

Die Adhäsion von *Staphylococcus aureus* an PMMA-Knochenzement erfolgt unabhängig von der dem Knochenzement zugesetzten Octenidinkonzentration. Jedoch nimmt mit steigender Konzentration des Antiseptikums Octenidin bei gleicher Inkubationszeit der Anteil an bereits geschädigten oder getöteten Bakterien zu.

3.2.3 Adhäsionsversuch von Pseudomonas aeruginosa an PMMA-Knochenzement

3.2.3.1 Adhäsion von Pseudomonas aeruginosa an PMMA-Knochenzement ohne Octenidin

Der als Biofilmbildner bekannte Keim *Pseudomonas aeruginosa* zeigte im Experiment eine gute Adhäsion an PMMA-Knochenzement. Unter dem Mikroskop fand sich im Vergleich zu *Staphylococcus aureus* bei gleicher Inkubationszeit und zugesetzter Keimmenge eine deutlich größere Anzahl von an PMMA adhärenten Keimen. Nach 60 Minuten Inkubation und dreimaligem Waschen der Plättchen fanden sich im vierten Waschwasser im Mittel der drei Versuchsansätze 243 Keime. In der hundertfachen Verdünnung konnte ein Mittelwert von 1,6 Keimen angezüchtet werden. Nach Ultraschallbehandlung der Plättchen ließ sich in allen drei Ansätzen ein Rasen von *Pseudomonas aeruginosa* anzüchten. In der hundertfach verdünnten Ultraschallprobe waren im Durchschnitt 67,6 Keime kultivierbar.

Tabelle 14: Adhäsionsversuch von Pseudomonas aeruginosa an Polymethylmethacrylatplättchen ohne Octenidin, Inkubationszeit 60 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
60- 1. Ansatz	199	0	Rasen	80
60- 2. Ansatz	266	2	Rasen	72
60- 3. Ansatz	265	2	Rasen	51
Mittelwert	243,33	1,66	Rasen	67,66

Dies beweist die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* an den PMMA-Knochenzement.

In der mikroskopischen Darstellung stellte sich der Biofilm folgendermaßen dar:

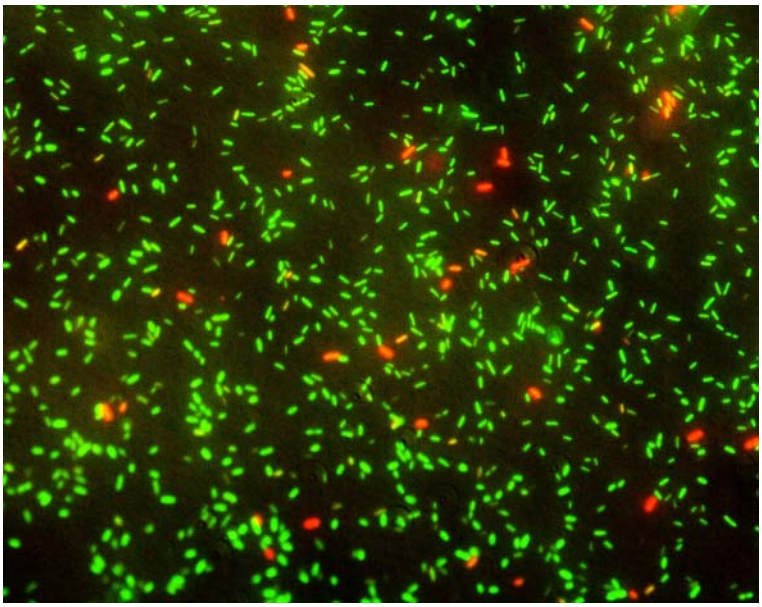


Abbildung 22: Adhäsion von Pseudomonas aeruginosa an Polymethylmethacrylat ohne Octenidin, Fluoreszenzmikroskopische Darstellung in 100 facher Vergrößerung

Das gramnegative Stäbchen zeigt eine massive Adhäsion. Die meisten Keime stellen sich vital dar und fluoreszieren damit grün. Aber es sind auch einige rot leuchtende Keime darstellbar, die somit als tot eingestuft werden können.

3.2.3.2 Adhäsion von Pseudomonas aeruginosa an PMMA-Knochenzement bei 8% Octenidin

Bei Zugabe von 8% Octenidin zu dem Knochenzement erhielt man eine deutlich reduzierte Anzahl von *Pseudomonas aeruginosa* im vierten Waschwasser. Im Durchschnitt konnten in den drei Ansätzen 31,3 Keime kultiviert werden. Die Verdünnungen fielen durchwegs negativ aus. Die Ultraschallbehandlung der Zementplättchen brachte jedoch wieder einige Keime in Kultur zum Vorschein. So konnten 4,6 Keime durchschnittlich angezüchtet werden. Die Agarplatten der Verdünnungsreihen blieben keimfrei.

Tabelle 15: Adhäsionsversuch von Pseudomonas aeruginosa an Polymethylmethacrylatplättchen mit 8% Octenidin, Inkubationszeit 60 min

Entnahmezeit In min	Keimzahl Waschwasser direkt	Keimzahl Waschwasser 1 : 100	Ultraschall-Behandlung direkt	Ultraschall-Behandlung 1: 100
60- 1. Ansatz	4	0	7	0
60- 2. Ansatz	17	0	1	0
60- 3. Ansatz	13	0	6	0
Mittelwert	11,33	0	4,66	0

Aus diesen Experimenten kann gefolgert werden, dass sich *Pseudomonas aeruginosa* auch bei Verwendung des Antiseptikums an den Zement anlagert.

Mikroskopisch stellte sich folgendes Bild dar:

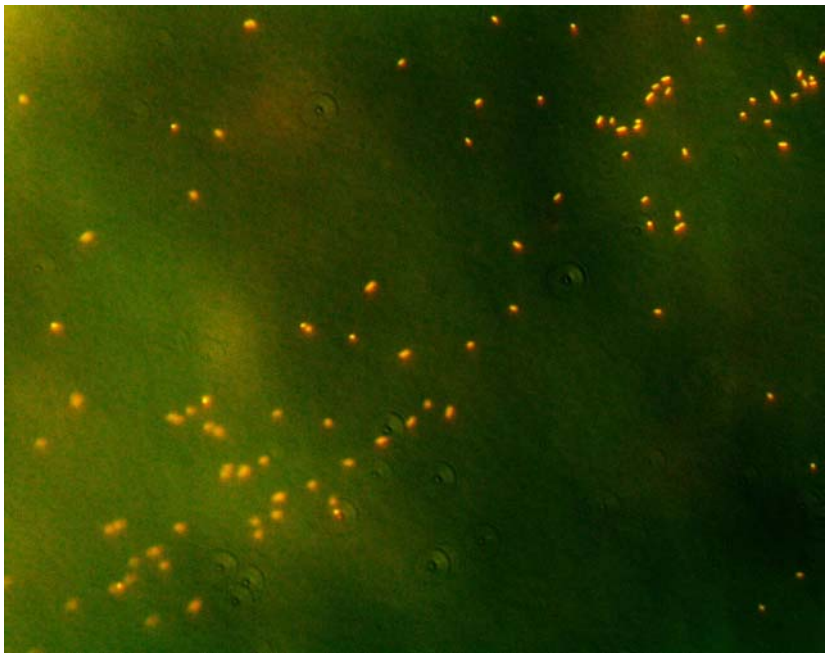
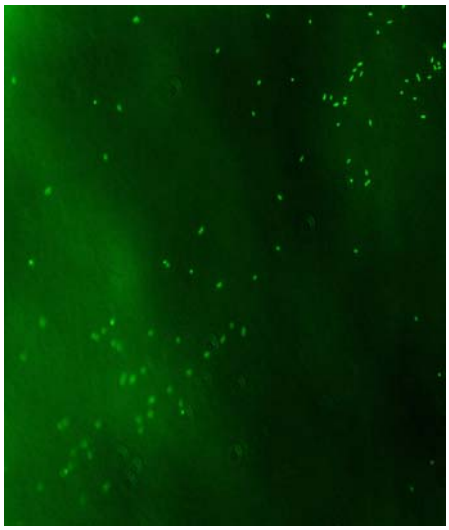
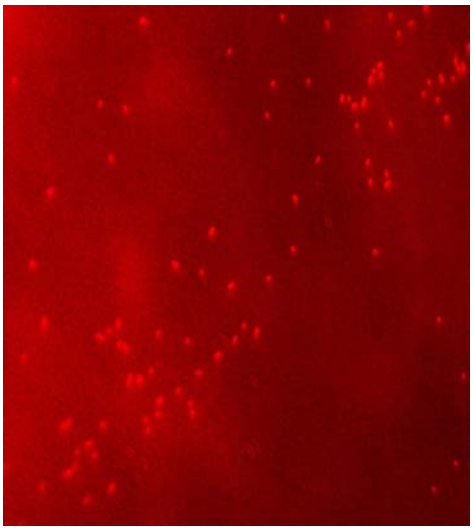


Abbildung 23: Adhäsion von Pseudomonas aeruginosa an Polymethylmethacrylat mit 8% Octenidin , Fluoreszenzmikroskopische Darstellung in 100 facher Vergrößerung

Die Zahl der adhärenten Keime zeigte sich im Gegensatz zu dem unter 3.2.2.1. gezeigten Bild, das ohne Verwendung von Octenidin bei gleicher Ausgangskeimzahl angefertigt wurde, deutlich reduziert. Eine genaue Unterscheidung in vital oder irreversibel geschädigt ist hier nicht sicher möglich, da die Keime weder deutlich grün, noch deutlich rot fluoreszieren.

Bei Betrachtung der Aufnahmen mit jeweils nur einem grünen oder roten Filter unter dem Mikroskop, stellte sich ein annähernd gleiches Bild hinsichtlich der Verteilung der Bakterien dar.





Abbildungen 24 + 25: Adhäsion von Pseudomonas aeruginosa an Polymethylmethacrylat bei 8 % Octenidin mit links selektivem grünem und rechts selektiv rotem Fluoreszenzspektrum, Fluoreszenzmikroskopische Darstellung in 100 facher Vergrößerung

Das bedeutet, dass sich die Pseudomonaden weder vollständig vital noch bereits irreversibel geschädigt zeigten. Sie befanden sich also wahrscheinlich in einer Phase des Zugrundegehens. Ihre Fähigkeit zur Regeneration und Reproduktion schien wegen geringer Anzüchtbarkeit in Kultur aber bereits verloren zu sein.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.3.1 Mikrobiologische Versuche

In Konzentrationen von 5% – 8% in Polymethylmethacrylatknochenzement wirkt Octenidin bakterizid auf den Testkeim *Staphylococcus aureus*. Unter Bakterizidie versteht man einen Wirkmechanismus, der zur Abtötung der Bakterien führt. Dieser Mechanismus differiert je nach Art und Konzentration des verwendeten Wirkstoffes und der Bakterienart. Bakterizidie kann durch Proteinkoagulation, Zerstörung der Bakterienzellwand, Verhinderung der Zellwandsynthese, Zellwandveränderungen oder einer irreversiblen Schädigung der Zellwand erfolgen (30). Es konnte dadurch eine Reduktion um bis zu sechs Zehnerpotenzen erreicht werden.

Es fand sich im Vergleich zur Keimzahl, die zu Beginn einer jeweiligen Versuchsreihe der Nährlösung zugesetzt wurde, in allen Proben und an allen Tagen mindestens eine Reduktion der Keimlast unter die Ausgangskeimzahl. In einigen Proben zeigte sich sogar nach Inkubation mit octenidinhaltigen Knochenzementplättchen gar kein nachweisbares Keimwachstum mehr. In Abbildung 26 sind die Mittelwerte aller Versuchsreihen graphisch zusammengefasst.

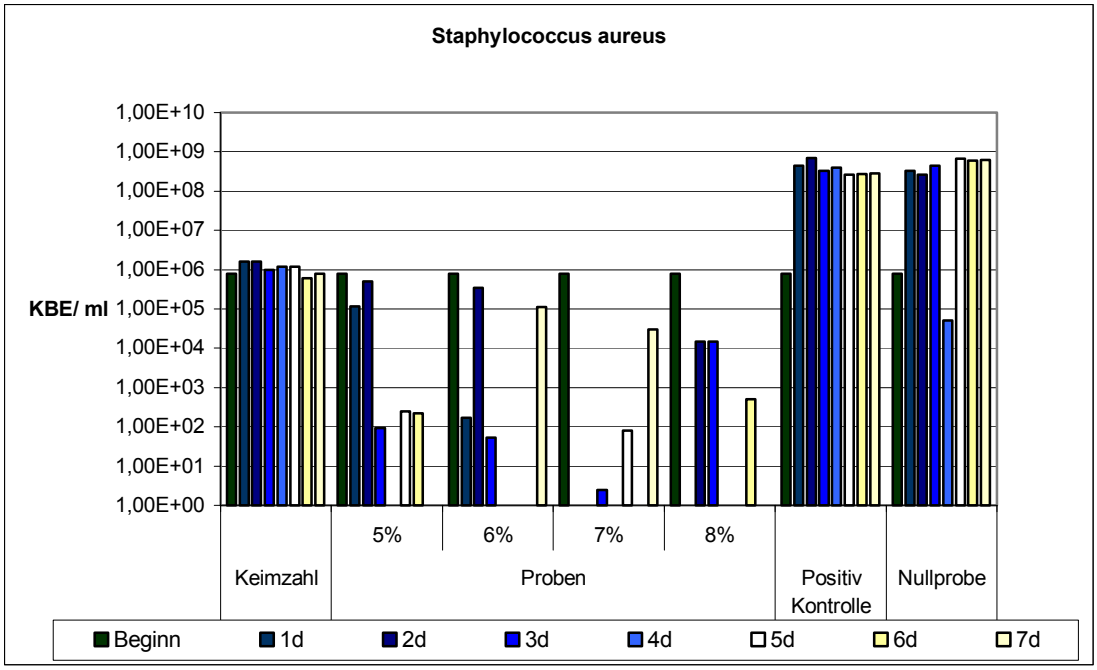


Abbildung 26: Mittelwerte des Wachstumsverhaltens von Staphylococcus aureus bei unterschiedlichen Octenidinkonzentrationen in Polymethylmethacrylat – Knochenzement (KBE = Kolonie bildende Einheiten, d = Tag, Keimzahl = der Nährlösung zugesetzte Bakterienanzahl, Positivkontrolle = Nährlösung mit Bakterienzusatz ohne Zementplättchen, Nullprobe = Nährlösung mit Bakterienzusatz und Zementplättchen ohne Octenidin)

Octenidin in Konzentrationen von 5%-8% vermischt mit Polymethylmethacrylatknochenzement zeigte, wie aus den in Diagramm 27 dargestellten Mittelwerten ersichtlich ist, keine bakterizide Wirkung auf *Pseudomonas aeruginosa*. Bei 5% Wirkstoff wurden annähernd gleiche Keimzahlen wie in der Positivkontrolle gefunden. Bei 6% stellte sich doch ein deutlich geringeres Wachstum im Gegensatz zu den Kontrollmessungen dar. Bei 7% und bei 8% war sogar in einigen Ansätzen eine Verringerung der Keimlast im Vergleich zu der ursprünglichen Keimlast anzutreffen. Hier ist doch ein zumindest bakteriostatischer Effekt des Octenidin auf *Pseudomonas aeruginosa* darstellbar. Unter dem Begriff Bakteriostase versteht man eine zur Hemmung der Vermehrungsfähigkeit führende reversible Schädigung von Bakterien, die nur solange anhält, wie ausreichend hohe Konzentrationen eines bakteriostatisch wirksamen Wirkstoffes vorliegen (1).

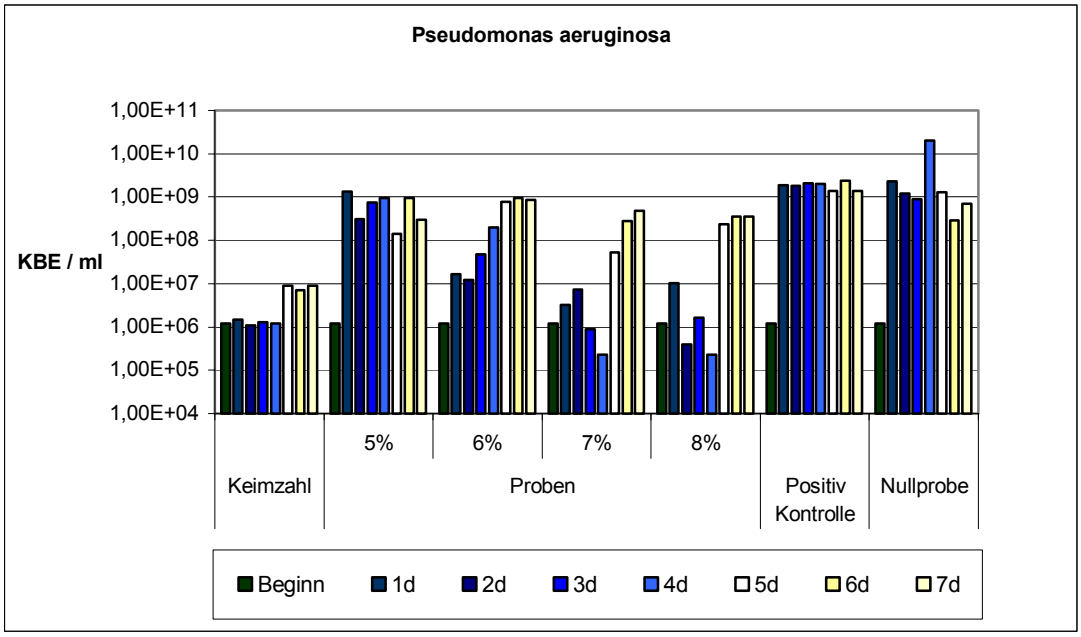


Abbildung 27: Mittelwerte des Wachstumsverhalten von Pseudomonas aeruginosa bei unterschiedlicher Octenidinkonzentration in Polymethylmethacrylat – Knochenzement (KBE = Kolonie bildende Einheiten, d = Tag, Keimzahl = der Nährlösung zugesetzte Bakterienanzahl, Positivkontrolle = Nährlösung mit Bakterienzusatz ohne Zementplättchen, Nullprobe = Nährlösung mit Bakterienzusatz und Zementplättchen ohne Octenidin)

Die Freisetzungskinetik von Octenidin in Konzentrationen von 5%-8% aus PMMA-Knochenzement folgte jeweils innerhalb der ersten fünf Messzeitpunkte einem linearen Konzentrationsanstieg des freigesetzten Wirkstoffes. Danach fand sich bei allen Konzentrationen und zu allen Zeitpunkten eine weitere, jedoch geringere Zunahme der Wirkstofffreisetzung. Jeweils bis zum Versuchsende nach sechs Wochen wurde Octenidin aus dem Zement eluiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass, je mehr Wirkstoff dem Zement zugesetzt wurde, desto mehr Wirkstoff letztendlich auch im Eluat gemessen wurde. Es zeigte sich kein Unterschied im Freisetzungsverhalten des Octenidin bei unterschiedlichen Konzentrationen. Abbildung 28 zeigt zusammenfassend die jeweilige Freisetzungekinetik bei unteschiedlicher Octenidinkonzentration graphisch.

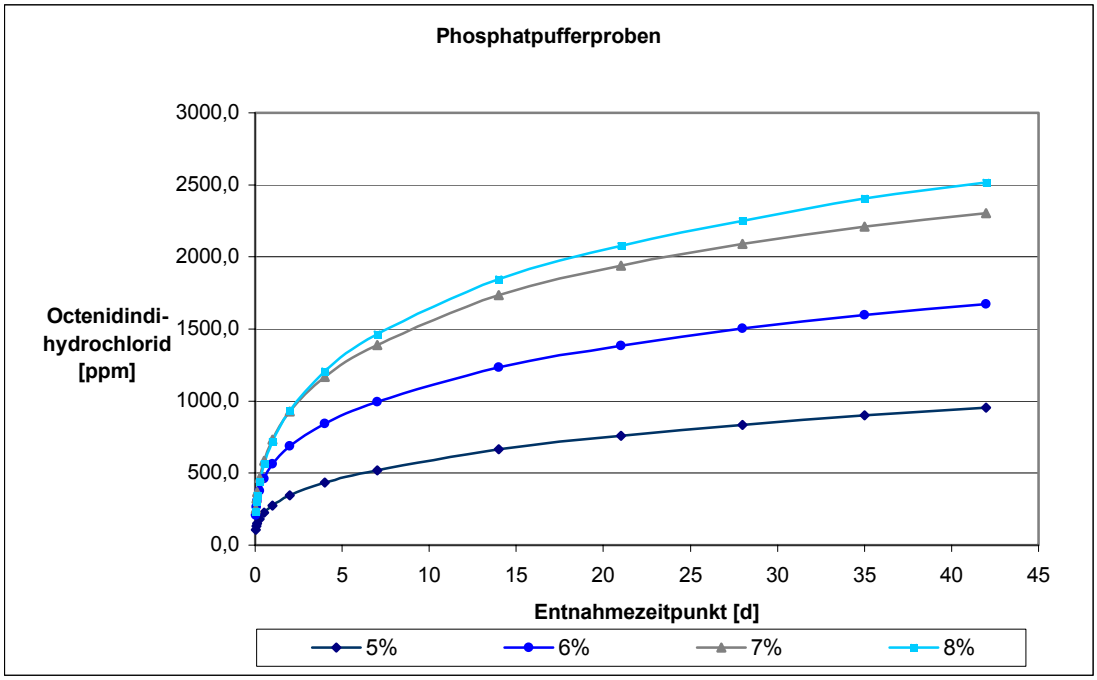


Abbildung 28: Elutionsversuche mit verschiedenen Konzentrationen von Octenidin in Polymethylmethacrylat – Knochenzement (angegeben ist die Freisetzung von verschiedenen Konzentrationen von Octenidin aus Polymethylmethacrylat-Zement in Phosphatpufferlösung über sechs Wochen, ppm = parts per million)

3.3.2 Adhäsionsversuche an PMMA-Knochenzement

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl *Staphylococcus aureus* als auch *Pseudomonas aeruginosa* eine Adhäsion an PMMA- Knochenzement zeigen.

Bei *Staphylococcus aureus* sinkt mit steigender Octenidinkonzentration auch die Anzahl der zur Reproduktion befähigten Keime auf der Oberfläche des Zementplättchen. Ohne Octenidin wurden hauptsächlich lebensfähige Keime gefunden, bei 8% Octenidin sind ausnahmslos alle auf der Oberfläche auffindbaren Keime tot. Eine Änderung des Adhäsionsverhaltens durch das beigemengte Octenidin ließ sich nicht darstellen.

Bei *Pseudomonas aeruginosa* nimmt ebenfalls mit steigender Konzentration des Antiseptikums die Anzahl der zur Reproduktion fähigen Keime in Kultur ab. Grundsätzlich kann man eine größere Anzahl an adhärenten Bakterien nachweisen.

4. Diskussion

4.1 Präventionsstrategien von nosokomialen Infektionen in der Endoprothetik

Die Vermeidung von postoperativen Wundinfektionen, die zu längeren Liegezeiten, Re-Eingriffen, erhöhten Kosten, Verlust der betroffenen Extremität und eventuell sogar zum Tod führen, ist das Ziel des Chirurgen (4;28;63).

Die Infektionsverhütung ist eine Herausforderung für alle Beteiligten. Denn die Patienten werden immer älter und multimorbider, die Operationen immer aufwendiger und die Behandlungskonzepte komplizierter. In gleichem Maße steigt jedoch auch der Anspruch der zu behandelnden Patienten auf eine erfolgreiche Operation, die oftmals elektiv oder zu kosmetischen Zwecken durchgeführt wird.

Das Robert-Koch-Institut hat Richtlinien für die Einhaltung der Infektionshygiene festgelegt, die in Krankenhäusern in Hygieneplänen die innerbetrieblichen Verfahrensweisen zur Infektionshygiene regeln. Des weiteren gehören eine gutes OP-Management, die intraoperative Minimierung des Gewebetraumas, die Reduktion der Operationszeit (14) und die antibiotische Prophylaxe zu den gängigen Standards.

Grundsätzlich ist die lokale antiinfektive Behandlung im Vergleich zur systemischen antiinfektiven Behandlung mit einigen Vorteilen assoziiert. Lokale Antiinfektiva ermöglichen eine gezielte antimikrobielle Behandlung in therapeutischer oder prophylaktischer Absicht, wohingegen die systemische Gabe von Antiinfektiva meist unter therapeutischen Gesichtspunkten indiziert ist. Der entscheidende Vorteil der lokalen Anwendung ist jedoch die Erreichbarkeit wirksamer mikrobiozider Konzentrationen direkt am Ort des Geschehens ohne eine Überflutung des gesamten Organismus zu verursachen. Damit ist das Risiko des Auftretens von Nebenwirkungen erniedrigt. Aufgrund des mikrobioziden Wirkungsmechanismus und der lokal vorherrschenden Konzentrationen der Antiinfektiva ist bis dato keine relevante Resistenzentwicklung zu verzeichnen gewesen (38). Durch den Einsatz lokaler Antiinfektiva wird die auch heutzutage immer noch häufig ungezielte systemische Anwendung vieler Antibiotika überflüssig. Grundsätzlich gibt es daneben viele verschiedene Strategien, eine bakterielle Infektion medizinischer Implantate zu vermeiden. *SCHIERHOLZ* beschreibt folgende Möglichkeiten der Prophylaxe: kovalent gebundene Antibiotika, eine mit Antibiotika versetzte Grundmatrix, adsorbierte Antibiotika, ionische Verbindungen mit Antibiotika, Imprägnierung mit Antiseptika,

Inkorporation von Silbersalzen, Inkorporation von Silberionen und metallischem Silber (54).

4.2 Werkstoffe mit Antibiotika / Antiseptika

Um Komplikationen zu vermeiden, werden in der orthopädischen Chirurgie bereits bestimmte Voraussetzungen an den Werkstoff der Prothesen gestellt. Zum einen ist auf die Bioverträglichkeit des Implantates zu achten, zum anderen ist die Biofunktionsfähigkeit zu überprüfen. Unter Biofunktionsfähigkeit wird die Streckgrenze, die Zugfestigkeit, die Kerbempfindlichkeit, das Gefüge und die Verschleißfestigkeit subsummiert (31). Auch die Wirtschaftlichkeit und die Akzeptanz des Werkstoffes durch die Mediziner ist ein bedeutender Aspekt bei der Auswahl des geeigneten Materials. Zum Beispiel verfügt man heute in der Hüftendoprothetik über eine reiche Auswahl von metallischen, polymeren und keramischen Implantatwerkstoffen, die international normiert sind.

Die antibiotische Prophylaxe kann entweder systemisch oder lokal verabreicht werden. Die systemische intravenöse Gabe eines Antibiotikums vor dem Hautschnitt reduziert effektiv die Prävalenz einer tiefen Wundinfektion (24) in der Endoprothetik.

Die lokale Applikation von Antibiotika kann auf verschiedene Arten vollzogen werden.

WINKLER et al. berichtet in einer Studie über Knochentransplantate, die mit Tobramycin und Vancomycin beladen worden sind. Es konnte gezeigt werden, dass Knochen in der Lage ist, Antibiotika zu binden und verzögert wieder freizusetzen. Somit könnten pathogene Keime eradiziert und gleichzeitig osteomyelitische Knochendefekte behandelt werden (73).

MACKEY et al. beschrieben Kalziumsulfat (Gips) als möglichen Träger von Antibiotika. Dieser Gips wird als Füllmaterial für osteomyelitische Defekte und Knochenzysten benutzt. Ein Vorteil dieser Methode ist die vollständige Resorption des Materials (47).

An Kollagenschwämme können ebenfalls Antibiotika angelagert werden. Meist sind dies Aminoglykoside. Die Kollagenschwämme werden ebenfalls vollständig resorbiert und zur Behandlung von chronischen Osteitiden eingesetzt (48).

Des weiteren können intraoperativ so genannte Kugeln aus Polymethylmethacrylat (Septopalketten®), die als Trägerstoff für ein Antibiotikum dienen, implantiert werden. Die therapeutische Wirksamkeit von mit Gentamicin-beladenen PMMA-Kugeln ist bewiesen. Es werden hohe lokale Wirkspiegel des Antibiotikums bei gleichzeitig in Serum und Urin messbar niedrigen Konzentrationen erreicht. Das bringt eine gute lokale Wirksamkeit bei gleichzeitig fehlenden systemischen toxischen Erscheinungen mit sich

(67). Nachteil dieser Methode ist die zur Entfernung des Materials notwendige Re-Operation (44).

Die wohl gängigste Form der lokalen Applikation von Antibiotika in der Endoprothetik ist die Freisetzung eines Antibiotikums aus einem Knochenzement, der zur Verankerung der Prothese verwendet wird. Hierzu kommen sowohl mehrere Zementsorten, die alle auf der gleichen chemischen Grundlage basieren, als auch mehrere Antibiotika in Frage (66). Es soll damit nach Implantation im Organismus eines Patienten eine kontinuierliche lokale Wirkung eines bestimmten Pharmakons über einen längeren Zeitraum erzielt werden (68).

Das verwendete Antibiotikum sollte ein möglichst großes Keimspektrum abdecken und schnellstmöglich nach der Implantation aus dem Knochenzement freigesetzt werden. Des weiteren sollte der Wirkstoff kontinuierlich und über eine längere Periode freigesetzt werden können. Auch die Toxizität spielt eine wichtige Rolle. Unter den dann lokal vorherrschenden hohen Konzentrationsspiegeln von Antibiotika sollten keine toxischen oder allergischen Reaktionen auftreten. Primär sollten jedoch solche Antibiotika verwendet werden, die bereits bei geringer Konzentration ihre volle Wirkung entfalten und deren Wirkmechanismus auf die Bakterien hinreichend bekannt ist. Zudem sind einige physikalische Voraussetzungen zu erfüllen. So sollte das verwendete Antibiotikum eine hohe Wasserlöslichkeit und eine gute Freisetzungskinetik aus dem Polymethylmethacrylat besitzen. Aufgrund der bei der Polymerisation des PMMA-Zementes entstehenden Wärme muss es zusätzlich thermostabil sein. Eine weitere Voraussetzung ist, dass die verwendeten Antibiotika bei einer normalen Körpertemperatur von 37° Celsius über einen längeren Zeitraum konstant und stabil sein müssen (70).

Nach *KUEHN et al.* sind mechanische und physikalische Eigenschaften von herausragender Bedeutung für die Güte eines Knochenzementes (41). Grundsätzlich führt die Beimengung eines Antibiotikums zu einer Reduktion der mechanischen Festigkeit der Matrix. Die Menge des zugemischten Antibiotikums sollte deshalb so gering wie möglich sein. Deswegen sollte auch nur ein Antibiotikum verwendet werden, das eine gute Freisetzungskinetik aus dem Knochenzement besitzt (72). Die Freisetzungsperiode verschiedener Antibiotika aus Knochenzement reicht laut einer Studie von *LODENKAMPER et al.* von wenigen Tagen bis zu Monaten oder sogar Jahren (45). Auch *BUNETEL et al.* beschreibt eine Freisetzungsphase von Gentamicin aus Knochenzement über 18 Monate (14). Die nachfolgende Literaturübersicht soll einen Überblick über die Verwendung verschiedener Zementsorten in Kombination mit unterschiedlichen Antibiotika geben.

Tabelle 16: Literaturübersicht über mit Antibiotika beladenen Knochenzement

Knochenzement	Antibiotikum	Studiendesign	Aussage	Referenz
Simplex® P.	Erythromycin / Colistin	In vitro	Inhibition grampositiver und gramnegativer, aerober und anaerober Keime außer Pseudomonas	(53)
CMW-1®	Gentamycin	In vitro	Freisetzung von Konzentration des Antibiotikums abhängig	(15)
Palacos®	Gentamicin / Cephalotin	In vitro	Empfindlich: S. epidermidis, S. aureus, E. coli, Resistent auf Cephalotin : P. aeruginosa	(71)
Surgical Simplex Cement	Gentamicin / Cephalotin	In vitro	Wirkung auf S.aureus und S. epidermidis	(70)
PMMA- und Hydroxyapatit-zement	Gentamicin / Amikacin / Ceftiofour	In vitro	Bessere Elution der Antibiotika aus Hydroxyapatit-zement als aus PMMA	(19)
Sulfix-6	Neomycin / Bacitracin	In vitro	Freisetzung effektiver Konzentrationen in der Wunde, nicht systemisch toxisch	(17)
Simlpex® P	Tobramycin	In vitro	Hervorragende Wirkung auf P. aeruginosa	(57)
PMMA-Knochenzement	Vancomycin / Tobramycin	In vitro	Wirkung auf grampositive Keime	(21)
Simplex P	Tobramycin	In vitro	Wirkung auf Grampositive, Gramnegative, Anaerobier, Aerobier, Mykobakterien	(58)

Bei dem Umgang mit Antibiotika ist grundlegend noch auf zwei Besonderheiten hinzuweisen. Zum einen ist die Wirkung eines Antibiotikums vom pH-Wert des infizierten Gewebes abhängig (35). Zum anderen ist mit einer immer größeren Anzahl resistenter Bakterien zu rechnen.

Deswegen ist es auch Gegenstand intensiver Forschungsarbeit, diverse Antibiotika durch Antiseptika oder andere antiseptisch wirksame Materialien zu ersetzen. Die Entwicklung und Herstellung von Biomaterialien überhaupt ist ein intensiv beforschtes Gebiet (46).

ALT et al. führten eine Studie durch, in der dem Knochenzement ein neues antimikrobielles Agens, nämlich nanopartikuläres Silber, zugegeben wurde. In vitro konnte eine Wirkung auf gentamicinresistente MRSE- und MRSA-Stämme gezeigt werden. Der Nanosilber-Zement zeigte in allen Zytotoxizitätsuntersuchungen keinen signifikanten Unterschied zur nichttoxischen Kontrollgruppe (3).

Die Beschichtung von Materialien mit Antiseptika wird auch zur Senkung der Infektionsraten durchgeführt. So zeigte sich in einer Studie von *DEJONG et al.*, dass die zur externen Fixation verwendeten Pins, wenn sie mit Chlorhexidin beschichtet sind, zu einer erfolgreichen Reduktion der Infektionsraten im Vergleich zu herkömmlichen Pins führen (13).

Auch zur intramedullären Nagelung von Frakturen sind beschichtete Nägel günstig. So zeigt eine Arbeit von *DAROUICHE et al.*, dass Nägel, die mit einer Kombination von Chlorhexidin und Chloroxylenol beschichtet sind, eine signifikant niedrigere Rate von Implantat assoziierten Osteomyelitiden im Tiermodell verursachen (12).

4.3 Interpretation von Material und Methode

Die Auswahl des Knochenzementes für den Operateur ist bei dem reichhaltigen Angebot an Zementsorten nicht immer ganz einfach. Für diese Experimente wurde der Zement Palacos® der Firma Biomet Merck verwendet. Dabei handelt es sich um ein hochvisköses Präparat. Ein Grund für die Auswahl dieses Präparates für die Studie ist die in Deutschland weit verbreitete Anwendung und die langjährige Erfahrung mit diesem Material. In Deutschland ist Palacos® mit mehr als 90% der am meisten angewendete Knochenzement (39). In den USA findet Palacos nur in 10% der Fälle Verwendung (26). Ein aber wohl entscheidender Punkt für die Auswahl von Palacos® ist dessen hohe Freisetzung von zugegebenen Medikamenten (23). So berichtet zum Beispiel *HOFF et al.* in einer Arbeit über eine höhere Elution von Penicillin aus Palacos® im Gegensatz zu dem Knochenzement Simplex P (32). Auch *PENNER et al.* konnten eine bessere Elution von Tobramycin und Vancomycin aus Palacos® als aus CMW beschreiben (51). Diese Merkmale des Knochenzementes sind für vorliegende Studie von großer Bedeutung.

Die Auswahl des Antiseptikums Octenidin als Zusatz zu dem Knochenzement hat mehrere Gründe. Zum einen ist Octenidin als Wirkstoff in Octenisept-Lösung bereits als Arzneimittel zugelassen. In dieser Form wird es zur Schleimhaut- und Wundantiseptik eingesetzt. Das große Wirkspektrum auf verschiedene Keime und die pH-Stabilität in einem großen Bereich sind weitere Kriterien, die für die Auswahl von Octenidin als Zusatz zum Knochenzement sprechen. Eine Zugabe von flüssigen Medikamenten zu PMMA-Pulver hat negative Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften des Zements (26). Octenidin ist in pulverisierter Form erhältlich. Deswegen ist eine Applikation von Octenidin in Pulverform zu PMMA-Zement ein weiterer Vorteil.

Grundsätzlich ist jedoch bei jeglicher Anwendung von Antiseptika auch auf die mit diesen Stoffen verbundene mögliche negative Auswirkung auf das Gewebe zu achten. Zum einen besteht unter der Verwendung eines Antiseptikums genauso wie unter einer Antibiotikatherapie das Problem der Allergisierung. Zum anderen ist die Zytotoxizität ein wichtiger Gesichtspunkt. Denn unter Therapie mit einem Antiseptikum werden im Gegensatz zur Antibiotikatherapie nicht selektiv Erreger angegriffen und vernichtet. Ein Antiseptikum ist zytotoxisch sowohl für Erreger als auch für die physiologische Zellflora (8). Dies ist bei einer Verwendung eines solchen Wirkstoffes immer zu berücksichtigen. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass unter der Verwendung von verschiedenen Antiseptika eine Beeinflussung der Granulation und damit der Wundheilung beobachtet werden kann (50).

Für diese Studie wurden die Keime ausgewählt, die in der Praxis für eine Protheseninfektion verantwortlich sein können. So sind nur wenige Bakterienarten für

mehr als 90% aller Protheseninfektionen verantwortlich. Bei einer großen Studie der *ENDO-Klinik* aus den Jahren 1985-1989 wurde folgendes Keimspektrum gefunden:

41% *Staphylococcus epidermidis*, 26% *Staphylococcus aureus*, 10% *Streptococcus spp*., 9% *Propinoi*, 4% *Pseudomonas aeruginosa*, 2% *Enterococcus spp*. und 8% verschiedene Keime (27). *Pseudomonas aeruginosa* wurde als Vertreter der typischerweise im Krankenhaus auftretenden Problemkeime ausgewählt. *Staphylococcus aureus*, der bekannt ist für seine vielen Resistenzen gegen Antibiotika, ist der zweithäufigste Auslöser einer Protheseninfektion und wurde deswegen für diese Studie ausgewählt. Die Studie von *LANGHOFF* zeigte bei Konzentrationen von 1%-4% Octenidin bereits eine bakterizide Wirkung des Octenidins auf *Staphylococcus epidermidis*. Deswegen fand *Staphylococcus epidermidis* bei dieser Studie keine Berücksichtigung mehr.

Die Methode für die Durchführung dieser Studie ist in Teilen neu. Sie stellt einen innovativen experimentellen Ansatz dar, der für die vorliegende Arbeit entwickelt wurde.

Die Bestimmung der Elution des Octenidins aus PMMA-Knochenzement durch Einlegen in eine Phosphatpufferlösung und anschließende Bestimmung der Konzentration des Wirkstoffes in der Flüssigkeit stellt ein etabliertes Verfahren dar. Analog wurde die Elutionskinetik von Wirkstoffen bereits in mehreren Studien ermittelt (44;67;68). Die Elutionseigenschaften konnten anschließend durch die HPLC genau erfasst und ausgewertet werden.

Die Bestimmung der Wirksamkeit von mit Antibiotika beladenen Zementplättchen auf Keime wurde aber in diesen Studien in einem Agardiffusionstest durchgeführt. Diese Tests führte *LANGHOFF* ebenfalls mit 1%-4% Octenidin beladenen Zementplättchen durch. In dieser Studie konnte aber kein Effekt des Octenidin auf *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *Staphylococcus epidermidis* und *Bacillus subtilis* im Agardiffusionstest nachgewiesen werden (43). Grund dafür ist wohl ein anderer Mechanismus der Wirkstofffreisetzung von Octenidin aus PMMA-Knochenzement. Deswegen wurde zur Wirksamkeitstestung eine mit Keimen versetzte Nährlösung mit dem beladenen Zementplättchen bestückt. Dieser Ansatz erwies sich als günstig und repräsentiert wohl eher eine physiologische Situation.

Ein wichtiger Punkt bei der Herstellung der Zementplättchen ist jedoch, dass das Octenidin möglichst homogen dem PMMA-Polymer-Pulver zugemischt werden sollte. Hier liegt ein technisches Problem dieser Studie. Es ist vor Zugabe der flüssigen Monomerlösung, die die Polymerisation in Gang bringt, eine homogene Mischung des PMMA-Pulvers und des Antiseptikums nötig. Dies wurde versucht, durch sorgfältiges

Mischen der beiden Pulver mit einem Spatel zu erreichen. Andernfalls entstehen Einschlüsse von Octenidinpulver in der PMMA-Matrix, die sowohl die Freisetzungskinetik als auch die Stabilität des Knochenzementes beeinträchtigen können.

4.4 Interpretation der Ergebnisse

4.4.1 Mikrobiologische Versuche

LANGHOFF führte dieselben mikrobiologischen Versuche mit 1%-4% Octenidin beladenem Knochenzement durch. Als Keime fanden *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis* und *Pseudomonas aeruginosa* Verwendung. Es zeigten sich auch bei geringeren Octenidinkonzentrationen ein deutlicher bakterizider Effekt auf *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Streptococcus mitis*. Bei *Pseudomonas aeruginosa* konnte kein deutlicher Effekt des Antiseptikums nachgewiesen werden (43).

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die von *LANGHOFF* beschriebenen bakteriziden Effekte auf *Staphylococcus aureus*. Es zeigte sich eine deutliche bakterizide Wirkung des Antiseptikums bei Konzentrationen von 5%-8% auf *Staphylococcus aureus*. Die unterschiedliche Ausprägung dieser bakteriziden Wirkung, die von der vollständigen Eradikation des zugesetzten Keimmaterials bis zu einer lediglichen Wachstumshemmung der Keime reicht, ist offensichtlich. Ein Grund für die an manchen Versuchstagen und in manchen Ansätzen geringere Ausprägung der Wirkung könnte eine Kontamination der Versuchsansätze sein, die bekanntlich nie völlig auszuschließen ist. Der aber wohl schwerwiegendere Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse ist in einer inhomogenen Mischung der Zementplättchen zu suchen. Trotz intensiver Bemühungen, eine homogene Zementmischung herzustellen, könnten manche der Plättchen weniger Octenidin enthalten oder ein Teil des zugesetzten Wirkstoffes könnte bei der Polymerisation mit dem PMMA-Knochenzement verklumpt sein. Trotzdem ist in keinem Versuchsansatz mit einem Octenidin beladenen Zementplättchen ein Keimzuwachs aufgetreten. Des weiteren ist ein systematischer Fehler nahezu auszuschließen, da die Proben, bei denen sich eine verminderte Wirkung des Octenidins zeigt, keinen Zusammenhang hinsichtlich des Auftretens erkennen lassen.

Die Ergebnisse der Wirkung von Octenidin auf *Pseudomonas aeruginosa* zeigen eine bakteriostatische Beeinträchtigung der Keime in dieser Studie. In *LANGHOFFs* Studie konnte dieser Effekt nicht deutlich nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie verhalten sich die Ergebnisse jedoch eindeutig. Es wird in allen Ansätzen im Vergleich zu normalem Keimwachstum in Suspension eine reduzierte Keimzahl nachgewiesen. Dies spricht für einen bakteriostatischen Effekt des Octenidin. Auffallend ist jedoch, dass sich jeweils zu Beginn einer Versuchsreihe, also an den ersten drei Tagen, eine größere Reduktion der Keimzahl findet. Dies ist wohl auf die hohe Konzentration des Octenidins zurückzuführen, die in den ersten Stunden und Tagen aus dem Zement freigesetzt wird. In der Literatur jedoch wird ein bakterizider Effekt des Octenidin auf

Pseudomonas aeruginosa beschrieben (60). Die Gründe, weswegen sich dieser Effekt in der vorliegenden Studie nicht in gewünschtem Ausmaß einstellte, könnten vielfältig sein. Zum einen könnte die Einwirkungszeit von 24 Stunden für die Tötung der Pseudomonaden zu kurz sein. Des weiteren ist es möglich, dass trotz der hohen Konzentration von Octenidin, die zugesetzt wurde, in vitro nicht ausreichend hohe Wirkspiegel erreicht werden konnten, die zur Bakterizidie geführt hätten.

Für die Entwicklung eines mit Octenidin beladenen Knochenzementes spielen jedoch die in dieser Studie verwendeten Konzentrationen von 5%-8% Octenidin wohl keine Rolle. Zum einen ist in den von *LANGHOFF* durchgeführten Versuchsreihen mit *Staphylococcus aureus* ein für die Praxis der Infektionsbehandlung weit ausreichender Effekt beschrieben worden, der sich auch durch die Zugabe von höheren Konzentrationen nicht steigern ließ. Zum anderen ist der Effekt auch mit höheren Konzentrationen des Antiseptikums im Versuch mit *Pseudomonas aeruginosa* nicht deutlich abweichend von den Ergebnissen mit niedrigeren Konzentrationen. Dabei ist aber durchaus mit einzubeziehen, dass sich die Elution in vivo und in vitro nicht unbedingt vergleichen lässt. Deswegen ist eine Überprüfung der Wirksamkeit des Zementes in vivo unabdingbar. So ist anhand der vorliegenden Ergebnisse eine Konzentration von 3%-4% Octenidin im Knochenzement Palacos® günstig. Damit kann man optimale Wirkung des Antiseptikums auf Bakterien bei geringer Beeinträchtigung der Stabilität des Zementgemisches erreichen und die möglichen Nebenwirkungen des Antiseptikums wie zum Beispiel dessen Zytotoxizität durch die niedrige Konzentration gering halten. Diese potentiellen Nebenwirkungen sind jedoch erst im Tierversuch zu erforschen.

4.4.2 Adhäsionsversuche an PMMA-Knochenzement

Staphylococcen besitzen die Fähigkeit, ein breites Spektrum von Matrixproteinen, Gewebestrukturen und andere lösliche Faktoren ihres jeweiligen Wirtsorganismus zu binden. Dadurch kommt es zur Entstehung eines so genannten Biofilms. Nach *THULL* stellen Biofilme eine strukturierte Gemeinschaft bakterieller Mikroorganismen dar, die in einer selbst erzeugten polymeren Matrix eingeschlossen sind und sich unter bestimmten Voraussetzungen auf allen natürlichen und künstlichen Oberflächen bilden. Ein solcher strukturierter Zusammenschluss von Bakterien setzt Organisations- und Kommunikationsstrukturen voraus, die untereinander etabliert, aber auch von chemischen und physikalischen Eigenschaften der benutzten Oberfläche beeinflusst werden (22;55). Aufgrund der meist rauen Oberflächenstruktur der medizinischen Implantate bieten solche Metall- oder Kunststofffremdkörper einen idealen

Besiedelungsort für Bakterien (74). Im Allgemeinen gibt es Unterschiede zwischen den Materialklassen bezüglich ihrer Affinität zu Bakterien. *Staphylococcus epidermidis* zum Beispiel besitzt eine hohe Affinität zu den Polymethylmethacrylaten, wohingegen dieser Keim eine sehr geringe Akkumulations- und Adhäsionsfähigkeit an Edelstahl aufweist (55).

Die klinische Bedeutung der Biofilmbildung ist enorm groß. Durch Anheftung, Verankerung, Verdichtung und Glykokalyxentstehung entwickelt sich eine zunehmende Widerstandsfähigkeit der Mikroorganismen gegenüber Antibiotika. *ARIZONO* beschreibt eine 20 fach höhere Wirkung eines Antibiotikums auf freie Bakterien im Gegensatz zu solchen, die einen Biofilm gebildet haben (5). Dazu kommt noch, dass durch den Biofilm das Eindringen der Wirkstoffe behindert wird (62). Dadurch wird nicht nur die Behandlung, sondern auch die Diagnose einer Infektion einer Endoprothese erschwert.

Auch in dieser Studie zeigte sich eine Adhäsion und Biofilmbildung sowohl von *Staphylococcus aureus*, als auch von *Pseudomonas aeruginosa* an PMMA-Knochenzement mit und ohne Octenidinzusatz.

BARTH et al. beschreibt in seiner Studie eine äußerst schnelle Anlagerung von *Staphylococcus aureus* nach einer Stunde der Inkubation an verschiedene Materialien (6). Die Ergebnisse konnten in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Es findet sich eine rasche Adhäsion von *Staphylococcus aureus* an den PMMA-Knochenzement. Die Adhäsion an sich erschien unabhängig davon abzulaufen, ob dem Zementplättchen das Antiseptikum Octenidin zugesetzt wurde und in welcher Konzentration dies zugegeben wurde. Dieselben Beobachtungen konnten auch in einer Studie von *KENDALL et al.* gemacht werden. Dieser beschreibt die Oberfläche von Knochenzement trotz der Anwesenheit von Antibiotika als geeignetes Substrat für bakterielles Wachstum (36). Lediglich sank mit höherer Octenidinkonzentration die Anzahl an lebensfähigen Bakterien innerhalb des Biofilms. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse stellt sich jedoch die Frage der Übertragbarkeit in ein physiologisches Milieu. Denn die gewählte Methode machte es nötig, mit einer Keimzahl von 10^{10} KBE/ml zu arbeiten, um eine optimale Darstellung zu erreichen. In vivo ist eine solch hohe Keimzahl aber nur schwer vorstellbar. Aufgrund dieser Tatsache ist in dieser Studie keine Aussage über die Quantität der Adhäsion der einzelnen Keime möglich. *CHANG et al.* beschreibt in einer Arbeit, dass die Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* an PMMA-Knochenzement nach 30 Minuten gleich ist, egal ob der PMMA-Zement mit Gentamicin angereichert wurde oder nicht (11).

Jedoch konnten anhand dieser Studie einige Grundfragen geklärt werden. Zum einen erfolgt die Adhäsion von *Staphylococcus aureus* an Knochenzement mit und ohne

Octenidinzusatz, zum anderen besitzt das freigesetzte Octenidin trotz der Bildung eines Biofilms eine bakterizide Wirkung auf diese adhärenten Keime.

Die Ergebnisse der Adhäsionsversuche mit *Pseudomonas aeruginosa* stellten sich ähnlich dar. So konnte eine Adhäsion und Biofilmbildung auch hier gezeigt werden. Ohne Zusatz des Antiseptikums stellten sich fluoreszenzmikroskopisch alle Keime als vital dar. Auffällig hingegen waren die Ergebnisse nach Zusatz von 8% Octenidin. Die Adhäsion findet auch hier statt, jedoch befinden sich die adhärenten Keime anscheinend in einer Phase des Zugrundegehens, da sie sich weder in Kultur als vital, noch mikroskopisch als bereits tot darstellten. Letztlich konnte so auch eine Wirkung des Antiseptikums Octenidin auf den Problemkeim *Pseudomonas aeruginosa* dargestellt werden, die sich in Kultur nicht so deutlich ergeben hat. Bei diesen Ergebnissen ist jedoch auch analog zu den Versuchen mit *Staphylococcus aureus* eine Übertragbarkeit in eine physiologische Umgebung aufgrund der hohen Keimzahl nicht möglich.

Die Ergebnisse der Elutionsversuche stellten sich günstig dar. Unabhängig von der Konzentration von zugesetztem Octenidin wird Octenidin aus dem Knochenzement freigesetzt. Je höher die zugegebene Konzentration ist, desto größer ist die freigesetzte Menge an messbarem Wirkstoff. Innerhalb der ersten zwölf Stunden zeigt sich eine konzentrationsunabhängige lineare Freisetzungskinetik des Wirkstoffes. Dies ist für eine erfolgreiche intra- oder postoperative Prophylaxe sehr günstig. Ebenfalls positiv zu vermerken ist die lange Dauer der Wirkstofffreisetzung, die zwar mit der Zeit an Intensität abnimmt, jedoch auch noch nach sechs Wochen zu verzeichnen ist. Ähnliche Ergebnisse konnten in Studien, die die Elution von diversen Antibiotika aus verschiedenen Zementsorten untersuchten, gezeigt werden. So findet sich auch hier in den ersten Stunden ein Maximum an Wirkstofffreisetzung, die mit der Zeit deutlich abnimmt (36;49).

5. Ausblick

Nachdem sich die Wirkung des dem PMMA-Knochenzement zugesetzten Antiseptikums Octenidin in vitro bestätigt hat, wird der nächste Schritt auf dem Weg zur Weiterentwicklung eines Octenidin haltigen Knochenzementes ein Tierversuch sein. Octenidin ist zwar bereits als Medikament zugelassen, jedoch nur zur äußerlichen Anwendung.

Der projektierte Tierversuch soll die Gewebeverträglichkeit durch einen Versuchsansatz mit Wistar-Ratten prüfen. Außerdem sind weitere Experimente zur Auffindung der idealen Octenidinkonzentration geplant. Ziel ist es, eine möglichst hohe Wirkstoffkonzentration bezüglich der bakteriziden Wirkung einsetzen zu können und hierbei eine maximale Stabilität des Knochenzementes zu gewährleisten.

Angesichts des Anstiegs multiresistenter Erreger bietet der Einsatz von Antiseptika zur Infektionsprophylaxe eine zunehmend wichtigere therapeutische Alternative. Der Vorteil wirkstoffbeschichteter Materialien, die z.B. prothesennah im Patienten eingesetzt werden können, ist eine direkte Freisetzung des jeweiligen Wirkstoffes. Hierdurch können am Zielort höhere Konzentrationsspiegel als durch die systemische Anwendung erreicht werden. Außerdem wird das Risiko unerwünschter systemischer Nebenwirkungen reduziert.

In wieweit sich Antiseptika beschichtete Knochenzemente in der chirurgisch-orthopädischen Praxis als Routinemaßnahme durchsetzen können bleibt abzuwarten. In jedem Falle besteht hier aber die Möglichkeit, für Patienten mit besonderen Risikoprofilen eine zusätzliche therapeutische Option anbieten zu können. Ergänzend zur Antibiotikaprophylaxe bei Insertion von Prothesen böte ein beschichteter Knochenzement den Vorteil, in den ersten Stunden und Tagen nach Insertion, einem Zeitpunkt zu dem das Risiko einer primären Besiedelung der Prothese durch operationsbedingte Bakteriämien besonders hoch ist, dieses zu reduzieren und somit dem Prozess der Kolonisierung der Prothese frühzeitig entgegenzuwirken.

Dadurch könnte dem Patienten möglicherweise eine Infektion der Endoprothese und die damit verbundenen Komplikationen erspart werden.

6. Zusammenfassung

Die Zugabe von antimikrobiell wirksamen Substanzen zu Polymethylmethacrylat-Knochenzement stellt heutzutage eine Standardtechnik in der Chirurgie und der Orthopädie dar. Die Wirksamkeit verschiedener Substanzen ist in vivo und in vitro Studien belegt. Die Verwendung eines Antiseptikums in Verbindung mit dem Knochenzement stellt einen neuen Ansatz zur Infektionsverhütung in der Endoprothetik dar. In der vorliegenden Arbeit wurde dem handelsüblichen Knochenzement Palacos® der Firma Biomet Merck das Antiseptikum Octenidin der Firma Schülke & Mayr in Konzentrationen von 5% bis 8% in pulverisierter Form zugesetzt.

Zunächst wurde geprüft, in wieweit Octenidin aus dem Knochenzement wieder freigesetzt werden kann. Hierbei konnte bei allen zugegebenen Konzentrationen ein fast linearer Anstieg der Freisetzung des Octenidin innerhalb der ersten 12 Stunden beobachtet werden. Danach konnte eine geringere aber dennoch kontinuierliche Freisetzung von Octenidin über einen Versuchszeitraum von 6 Wochen gefunden werden. Je mehr Octenidin dem Zement zugegeben wurde, desto mehr wurde insgesamt auch wieder freigesetzt.

In einem nächsten Versuchsansatz mit *Staphylococcus aureus* konnte eine bakterizide Wirkung des mit Octenidin versetzten Knochenzements nachgewiesen werden. Demgegenüber ließ sich für *Pseudomonas aeruginosa* bei Verwendung von 5% bis 8% Octenidin haltigem Knochenzement maximal eine Reduktion der zugesetzten Keimzahl um eine Logstufe ermitteln.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Adhäsionsverhalten von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* an mit Octenidin versetztem Knochenzement überprüft. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl *Staphylococcus aureus* als auch *Pseudomonas aeruginosa* einen Biofilm sowohl auf dem unbehandelten als auch auf dem mit Octenidin versetzten Knochenzement bildeten. Bei den Adhäsionsversuchen mit *Staphylococcus aureus* zeigte sich, dass sich mit steigender Konzentration des Octenidin weniger zur Reproduktion fähige Keime im Biofilm befanden. Ohne Zusatz des Antiseptikums wurde ein vitaler Biofilm aus *Staphylococcus aureus* gefunden, wohingegen bei Zusatz von 8% Octenidin keine vitalen adhärenten Keime mehr nachgewiesen werden konnten. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei der Adhäsionsprüfung mit *Pseudomonas aeruginosa*. Auch hier nahm mit steigender Konzentration des Antiseptikums die Anzahl der reproduktionsfähigen Keime ab.

Basierend auf den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen stellt die Zugabe des Antiseptikums Octenidin zu Polymethylmethacrylat-Knochenzement möglicherweise

eine neue Alternative zu den bereits in Verbindung mit Knochenzement verwendeten Wirkstoffen für die Infektionsprävention bei Endoprothesen dar. Die vorliegende Arbeit bildet die Grundlage für die nun notwendigen Experimente in vivo zur Untersuchung der Bioverträglichkeit des mit Octenidin versetzten Knochenzementes.

7. Literatur

(1) Roche Lexikon Medizin. Urban & Schwarzenberg, 7. Auflage, 155-156, 2005.

(2) Rote Liste 2003. Rote Liste Service GmbH, Editio Cantor Verlag, 2003.

(3) Alt V., Bechert T., Steinrücke P., Wagener M., Seidel P., Dingeldein E., Scheddin D., Domann E., Schnettler R. Nanopartikuläres Silber- Ein neues mikrobielles Agens für Knochenzement. Der Orthopäde 33, 885-892, 2004.

(4) An Y., Friedman R. Animal models of orthopedic implant infection. Invest Surg 11,139-146, 1998.

(5) Arizono T., Oga M., Sugioka Y. Increased resistance of bacteria after adherence to polymethylmethacrylate. Acta Orthop Scand 63, 661-664, 1992.

(6) Barth E., Myrvik QM., Wagner W., Gristina AG. In vitro and in vivo comparative colonization of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis on orthopaedic implant materials. Biomaterials 10, 325-328, 1989.

(7) Beck A., Kinzl L., Bischoff M. Antibiotikaprophylaxe und Therapie in der Unfallchirurgie. Der Unfallchirurg 102, 955-966, 1999.

(8) Berke A. Allergische und toxische Nebenwirkungen von Konservierungs-und Desinfektionsmitteln in der Kontaktlinsenhygiene. Die Kontaktlinse 5, 5-13, 1996.

(9) Braunwarth H. Octenidindihydrochlorid - Der neue Wirkstoff in Antiseptika in der zu Ende gehenden Dekade. Anzag Magazin, 25-27, 1998.

(10) Buchholz H., Engelbrecht E. Über die Depotwirkung einiger Antibiotika beim Vermischen mit dem Kunstharz Palacos. Chirurg 41, 511-514, 1970.

(11) Chang CC., Merritt K. Microbial adherence on polymethylmethacrylat surfaces. J Biomed Mater Res 26, 197-207, 1992.

(12) Darouiche RO., Farmer J., Chaput C., Mansouri M., Saleh G., Landon GC. Antiinfective efficacy of antiseptic-coated intramedullary nails. Bone Joint Surg Am 80, 1336-1340, 1998.

(13) DeJong ES., DeBerardino TM., Brooks DE., Nelson BJ., Campell AA., Bottoni CR., Pusateri AE., Walton RS., Guymon CH., McManus AT. Antimicrobial efficacy of external fixator pins coated with a lipid stabilized hydroxyapatit/chlorhexidine complex to prevent pin tract infection in a goat model. J Trauma 50, 1008-1014, 2001.

(14) Dickinson GM., Bisno AL. Infections associated with indewelling devices: infections related to extravascular devices. Antimicrob Agents Chemother 33, 602-607, 1989.

(15) Diez-Pena E., Frutos G., Frutos P., Barrales-Rienda J. Gentamicin Sulphate Release from a Modified Commercial Acrylic Surgical Radiopaque Bone Cement. Chem Pharm Bull 50, 1201-1208, 2002.

(16) Dissemond J. Aktuelle und zukünftige Therapiestrategien von MRSA in chronischen Wunden. Hartmann WundForum 2, 16-19, 2003.

(17) Endler M., Wewalka G. Antibiotic concentration in postpoerative wound secretions and in serum of patients after implantation of hip endoprotheses having used neomycin - bacitracin loaded bone cement. Wien Klin Wochenschr 92,443 - 447, 1980.

(18) Espehaug B., Engesaeter LB., Vollset SE., Havelin LI., Langeland N. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Bone Joint Surg Br 79, 590-595, 1997.

(19) Ethell M., Bennet R., Merrit K., Davidson J., Tran T. In Vitro Elution of Gentamycin, Amikacin, and Ceftiofur From Polymethylmethacrylat and Hydroxyapatite Cement. Veterinary Surgery 29, 375-382, 2000.

(20) Giacometti A., Cirioni O., Greganti G., Fineo A., Ghiselli R., Del Prete MS., Mocchegiani F., Fileni B., Caselli F., Petrelli E., Saba V., Scalise G. Antiseptic compounds still active against bacterial strains isolated from surgical wound infections despite increasing resistence. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21, 553-556, 2002.

(21) Gonzalez Della Valle A., Bostrom M., Brause B., Harney C., Salvati E. Effective bactericidal activity of tobramycin and vancomycin eluted from acrylic bone cement. Acta Orthop Scand 72,237 -240, 2001.

(22) Gottenbos B., Busscher HJ., Van der Mei H., Nieuwenhuis P. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. J Mater Sci Mater Med 13, 717-722, 2002.

(23) Hanssen A. Prophylactic use of antibiotic bone cement. J Arthroplasty 19, 73 - 77, 2004.

(24) Hanssen A., Osmon D. The use of prophylactic antimicrobial agents during and after hip arthroplasty. Clin Orthop 124-138, 1999.

(25) Harke H. Octenidin dihydrochloride, properties of a new antimicrobial agent. Zentralbl Hyg Umweltmed 188,188-193, 1989.

(26) Heck D., Rosenberg A., Schink-Ascani M., Garbus S., Kiewitt T. Use of antibiotic-impregnated cement during hip and knee arthroplasty in the United States. J Arthroplasty 10, 470 - 475, 1995.

(27) Hendrich C., Frommelt L. Keim-orientierte Antibiotikatherapie bei Protheseninfektionen. In: Hendrich C., Frommelt L., Eulert J., (Hrsg). Septische Knochen-und Gelenkchirurgie. Springer Verlag, 259-271, 2004.

(28) Hendriks J., Horn van J, Mei van der H., Busscher H. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prothesis-related infection. J Biomed Mat Res 25, 545-556, 2004.

(29) Henrichsen E., Jansen K, Krogh-Poulson W. Experimantal investigation of the tissue reaction to acrylic plastics. Clin Orthop Relat Res 352, 4-6, 1952.

(30) Herder. LEXIKON der Biochemie und Molekularbiologie. Spektrum Verlag, 1. Aufl., 1995.

(31) Herosch J., Effenberger H.,Fuchs S. Hüftendoprothetik. Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York , 2-6, 1996.

(32) Hoff SF., Fitzgerald RH., Kelly PJ. The depot administration of penicillin G and gentamycin in acrylic bone cement. J Bone Joint Surg Am 63, 798-804, 1981.

(33) Hulliger L. Untersuchungen über die Wirkung von Kunstharzen in Gewebekultur. Arch Orthop Unfallchir 54, 581 - 588, 1962.

(34) Josefsson G., Gudmundsson G., Kolmert L., Wijkstrom S. Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamycin bone cement in total hip arthroplasty. Clin Orthop Relat Res 253, 173-178, 1990.

(35) Karow T., Lang-Roth R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 12. Aufl., 2004.

(36) Kendall RW., Duncan CP., Smith JA., Ngui-Yen JH. Persistance of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots. A reason for caution. Clin Orthop Relat Res 329, 273-280, 1996.

(37) Kenny SM., Buggy M. Bone cements and Fillers: a review. J Mater Sci Mater Med 14, 923-938, 2003.

(38) Kramer A., Adrian V. Lokale Antiinfektiva als Alternative zu systemischen Antiinfektiva mit Ergebnissen zur Gewebeverträglichkeit im Explantationstest als einem weiterentwickelten In-vitro-Prüfmodell. Topische Infektionstherapie und Prophylaxe 19-23, 1996.

(39) Kreutzer J., Schneider M., Schlegel U., Ewerbeck V., Breusch SJ. Cemented total hip arthroplasty in Germany- an update. Orthop Ihre Grenzgeb 143, 48-55, 2005.

(40) Kuehn KD., Ege W., Gopp U. Acrylic bone cements: composition and properties. Orthop Clin North Am 36, 17-28, 2005.

(41) Kuehn KD., Ege W., Gopp U. Acrylic bone cements: mechanical and physical properties. Orthop Clin North Am 36, 29-39, 2005.

(42) Kuehn KD. Knochenzemente für die Endoprothetik. Springer Verlag, 1. Aufl., 2001.

(43) Langhoff F. Wirksamkeit und Elution von mit Octenidin beladenem Knochenzement. (Publikation in Vorbereitung)

(44) Liu SJ., Ueng SW., Chan EC., Lin SS., Tsai CH., Wei FC.,Shih CH. In Vitro Elution of Vancomycin from Biodegradable Beads. J Biomed Mater Res 48, 613 - 620, 1999.

(45) Lodenkamper H., Lodenkamper U., Trompa K. Elimination of antibiotics from Palacos bone cement. Z Orthop Ihre Grenzgeb 120, 801-805, 1982.

(46) Lysaght MJ., Nguy NA., Sullivan K. An economic survey of the emerging tissue engineering industry. Tissue Eng 4, 231-238, 1998.

(47) Mackey D., Varlet A., Debeaumont D. Antibiotic loaded plaster of Paris pellets: an in vitro study of a possible method of local antibiotic therapy in bone infection. Clin Orthop Relat Res. 167, 263-268, 1982.

(48) Mendel V., Simanowski H., Scholz H., Heymann H. Therapy with gentamycin-PMMA-beads, gentamycin-collagen sponge, and cefazolin for experimental osteomyelitis due to staphylococcus aureus in rats. Arch Orthop Trauma Surg 125, 363-368, 2005.

(49) Neut D., Van de Belt H, Van Horn J., Van der Mei H., Busscher H. The effect of mixing on gentamycin release from polymethylmethacrylate bone cements. Acta Orthop Scand 74, 670-676, 2003.

(50) Niedner R. Experimentelle Beeinflussung der Wundheilung durch lokale antimikrobielle Substanzen. Zbl Haut 162, 647 - 652, 1993.

(51) Penner MJ., Duncan CP., Masri BA. The in vitro elution characteristics of antibiotic-loaded CMW and Palacos-R bone cements. J Arthroplasty 14, 209-214, 1999.

(52) Robert Koch Institut. Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System. www.nrz-hygiene.de. 2004.

(53) Rosenthal A., Rovell J., Girard A. Polyacryl-Knochenzement angereichert mit Erythromycin und Colistin. Munch Med Wochenschr 118, 987 - 990, 1976.

(54) Schierholz J., Beuth J. Implant infection: a heaven for opportunistic bacteria. J Hosp Infect 49, 87-93, 2001.

(55) Schierholz J., Morsczeck C., Brenner N., König D., Yücel N., Korenkov M.,Neugebauer E., Rump AF., Waalenkamp G., Beuth J., Pulverer G., Arens S. Besonderheiten der implantatassoziierten Infektion in der orthopädischen Chirurgie. Orthopäde 33, 397-404, 2004.

(56) Schwendt G. Taschenatlas der Analytik. 2. Aufl. Georg Thieme Verlag-Stuttgart, 1996.

(57) Scott C., Higham P. Antibiotic bone cement for the treatment of pseudomonas aeruginosa in joint arthroplasty. J Biomed Mater Res 64B, 94-98, 2003.

(58) Scott C., Higham P., Dumbleton J. Effectiveness of bone cement containing tobramycin. J Bone Joint Surg Br 81, 440-443, 1999.

(59) Sculco TP. The economic impact of infected total joint arthroplasty. Instr Course Lect 42, 349-351, 1993.

(60) Steinhauer K., Braunwarth H., Goroncy-Bermes P., Bischoff M. Einsatz von Octenisept bei der Instillationsvakuumsversiegelung. Krh.-Hyg.+ Inf.verh 25, 13-16, 2003.

(61) Thierse L. Experiences with Refobacin-Palacos with regard to deep late infections following hip-joint endoprosthesis surgery. Z Orthop Ihre Grenzgeb 116, 847-852, 1978.

(62) Thull R. Implantatoberfläche und Biofilm. In: Hendrich C., Frommelt L., Eulert J. Septische Knochen- und Gelenkchirurgie. 1. Aufl. Springer Verlag, 203-210, 2004

(63) Tunney M., Patrick S., Nixon J., Murphy P., Gorman S. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from orthopedic implants following revision hip surgery. Antimicrob Agents Chemother 42, 3002-3005, 1998.

(64) Van de Belt H, Neut D., Schenk W., Van Horn J., Van der Mei H., Busscher H. Infection of orthopedic implant and the use of antibiotic-loaded bone cements. Acta Orthop Scand 72, 557-571, 2001.

(65) Wahlig H, Dingeldein E. Antibiotics and Bone Cement. Experimental and Clinical Long-Term Observations. Acta Orthop.Scand 51, 49-56, 1980.

(66) Wahlig H. Über die Freisetzungskinetik von Antibiotika aus Knochenzement - Ergebnisse vergleichender Untersuchungen in vitro und in vivo. Aktuelle Probleme in Chirurgie und Orthopädie. Verlag Hans Huber Bern, 221-225, 1987.

(67) Wahlig H., Dingeldein E., Bergmann R., Reuss K. Experimentelle und pharmakokinetische Untersuchungen mit Gentamycin-PMMA-Kugeln. Zbl Chirurgie 104,923-933, 1979.

(68) Wahling H., Hameister W., Grieben A. Über die Freisetzung von Gentamycin aus Polymethylmethacrylat. Langenbecks Archiv für Chirurgie 331, 169-192,1972.

(69) Walenkamp G., Murray D. Bone cement and cementing technique. 1.Aufl., Springer Verlag, 127-134, 2001.

(70) Welch A. Antibiotics in Acrylic Bone Cement. J Biomed Mat Res 12, 692-700. 1978.

(71) Welch A. Antibiotics in Acrylic Bone Cement. J Biomed Mat Res 12, 678-700, 1978.

(72) Willert H.., Buchhorn G. Aktuelle Probleme in der Chirurgie und Orthopädie Band 31 Knochenzement. 221-226, 1987.

(73) Winkler H., Janata O., Berger C., Wein W., Georgopoulos A. In vitro release of vancomycin and tobramycin from impreganted human and bovine bone grafts. J Antimicrob Chemother. 46, 423-428, 2000.

(74) Ziebuhr W. Mikrobiologische Aspekte und Resistenzentwicklung. In: Hendrich C., Frommelt L., Eulert J. Septische Knochen- und Gelenkchirurgie. 1. Aufl., Springer Verlag, 20-24, 2004.

8. Anhang

1. Protokoll über die Herstellung der Zementplättchen:

1.1. Zementplättchen ohne Wirkstoff

Tabelle 17: Zementplättchen ohne Wirkstoff (angegeben ist das Gewicht eines jeden Plättchens, das maximale Gewicht, das minimale Gewicht, das Gesamtgewicht aller Plättchen dieser Charge, das durchschnittliche Gewicht eines Plättchens und die Standardabweichungen, g = Gewicht in Gramm)

Plättchennummer	Gewicht in g	Plättchennummer	Gewicht in g
1	0,4556	19	0,4687
2	0,4519	20	0,4645
3	0,4563	21	0,4627
4	0,4591	22	0,4545
5	-	23	0,4503
6	0,4613	24	0,4788
7	0,4624	25	-
8	0,4587	26	0,4752
9	0,4503	27	0,4721
10	0,4408	28	0,4535
11	0,4573	29	0,4573
12	0,4615	30	0,4793
13	0,4525	31	0,4613
14	0,4557	32	0,4497
15	0,4504	33	0,4561
16	-	34	0,4577
17	0,4693	35	0,4495
18	0,4478	36	0,4558

Gewicht max.:	0,4788g
Gewicht min.:	0,4408g
Gewicht ges.:	15,1379g
Gewicht Ø:	0,4587g
S1 = Gmax / G Ø:	1,04 = 4%
S2 = Gmin / G Ø:	0.9609 = 3,9%
Sges = S1 + S2:	7,90%

- bedeutet, dass diese Plättchen nicht verwendbar waren

1.2. Zementplättchen mit 5% Wirkstoff

Tabelle 18: Zementplättchen mit 5% Octenidingehalt (angegeben ist das Gewicht eines jeden Plättchens, das maximale Gewicht, das minimale Gewicht, das Gesamtgewicht aller Plättchen dieser Charge, das durchschnittliche Gewicht eines Plättchens und die Standardabweichungen, g = Gewicht in Gramm)

Plättchennummer	Gewicht in g	Plättchennummer	Gewicht in g
1	0,4599	19	-
2	0,4333	20	0,4457
3	-	21	0,4378
4	0,4335	22	0,4364
5	0,0000	23	0,4568
6	0,4311	24	0,4583
7	0,4440	25	0,4624
8	-	26	0,4620
9	-	27	0,4667
10	-	28	0,4740
11	0,4336	29	0,4561
12	0,4583	30	0,4727
13	0,4685	31	0,4664
14	0,4254	32	0,4715
15	0,4312	33	0,4710
16	0,4329	34	0,4675
17	-	35	0,4708
18	0,4383	36	0,4718

Gewicht max.:	0,4740g
Gewicht min.:	0,4311g
Gewicht ges.:	13,1339g
Gewicht Ø:	0,4529g
S1 = Gmax / G Ø:	1,046= 4,6%
S2 = Gmin / G Ø:	0,9519 = 4,8%
Sges = S1 + S2:	9,40%

- bedeutet, dass diese Plättchen nicht verwendbar waren

1.3. Zementplättchen mit 6% Wirkstoff

Tabelle 19: Zementplättchen mit 6% Octenidingehalt (angegeben ist das Gewicht eines jeden Plättchens, das maximale Gewicht, das minimale Gewicht, das Gesamtgewicht aller Plättchen dieser Charge, das durchschnittliche Gewicht eines Plättchens und die Standardabweichungen, g = Gewicht in Gramm)

Plättchennummer	Gewicht in g	Plättchennummer	Gewicht in g
1	0,4772	19	0,4442
2	0,4488	20	0,4406
3	0,4439	21	0,4450
4	0,4456	22	0,4348
5	0,4420	23	0,4322
6	0,4366	24	0,4358
7	0,4471	25	0,4389
8	0,4408	26	0,4344
9	0,4376	27	0,4432
10	0,4402	28	0,4385
11	0,4428	29	0,4395
12	0,4463	30	0,4413
13	0,4467	31	0,4423
14	0,4439	32	0,4352
15	0,4461	33	0,4441
16	0,4461	34	0,4395
17	0,4432	35	0,4517
18	0,4402	36	0,4442

Gewicht max.:	0,4517g
Gewicht min.:	0,4322g
Gewicht ges.:	15,9405g
Gewicht Ø:	0,4428g
S1 = Gmax / G Ø:	1,0323 =3,2%
S2 = Gmin / G Ø:	0,024 = 2,4%
Sges = S1 + S2:	5,60%

1.4. Zementplättchen mit 7% Wirkstoff

Tabelle 20: Zementplättchen mit 7% Octenidingehalt (angegeben ist das Gewicht eines jeden Plättchens, das maximale Gewicht, das minimale Gewicht, das Gesamtgewicht aller Plättchen dieser Charge, das durchschnittliche Gewicht eines Plättchens und die Standardabweichungen, g = Gewicht in Gramm)

Plättchennummer	Gewicht in g	Plättchennummer	Gewicht in g
1	0,4324	19	0,4202
2	0,4381	20	0,4282
3	0,4260	21	0,4357
4	0,4352	22	0,4384
5	0,4251	23	0,4275
6	0,4339	24	0,4234
7	0,4317	25	0,4200
8	0,4269	26	0,4230
9	0,4239	27	0,4202
10	0,4272	28	0,4337
11	0,4302	29	0,4248
12	0,4218	30	0,4300
13	0,4215	31	0,4277
14	0,4262	32	0,4307
15	0,4315	33	0,4339
16	0,4240	34	0,4286
17	0,4337	35	-
18	0,4193	36	0.4357

Gewicht max.: 0,4384g
Gewicht min.: 0,4193g
Gewicht ges.: 14,5546g
Gewicht Ø: 0,4158g
S1 = Gmax / G Ø: 1,054 = 5,4%
S2 = Gmin / G Ø: 1,0084 = 0,8%
Sges = S1 + S2: 6,20%

- bedeutet, dass diese Plättchen nicht verwendbar waren

1.5. Zementplättchen mit 8% Wirkstoff

Tabelle 21: Zementplättchen mit 8% Octenidingehalt (angegeben ist das Gewicht eines jeden Plättchens, das maximale Gewicht, das minimale Gewicht, das Gesamtgewicht aller Plättchen dieser Charge, das durchschnittliche Gewicht eines Plättchens und die Standardabweichungen, g = Gewicht in Gramm)

Plättchennummer	Gewicht in g	Plättchennummer	Gewicht in g
1	-	19	0,4356
2	0,4314	20	0,4346
3	0,4334	21	0,4192
4	0,4367	22	-
5	0,4467	23	0,4386
6	0,4400	24	0,4258
7	0,4335	25	0,4409
8	0,4352	26	0,4236
9	0,4212	27	0,4293
10	0,4209	28	0,4447
11	0,4231	29	0,4373
12	0,4322	30	0,4361
13	0,4436	31	0,4392
14	0,4208	32	0,4403
15	0,4261	33	0,4285
16	-	34	0,4372
17	0,4376	35	0,4471
18	0,4390	36	0,4404

Gewicht max.:	0,4471g
Gewicht min.:	0,4192g
Gewicht ges.:	14,3198g
Gewicht Ø:	0,4339g
S1 = Gmax / G Ø:	1,0304 = 3,04%
S2 = Gmin / G Ø:	0.9661 = 3,39%
Sges = S1 + S2:	6,43%

- bedeutet, dass diese Plättchen nicht verwendbar waren

2. Versuchsprotokoll mit Pseudomonas aeruginosa

Tabelle 22: Ergebnisübersicht über die Wirkung von verschiedenen Octenidinkonzentrationen in Polymethylmethacrylatzement auf Pseudomonas aeruginosa

Alle Zahlenwerte sind pro Milliliter angegeben (d = Tag)

			5%			
Zeit	**Keimzahl**	**Probe A**	**Probe B**	**Negativ Kontrolle**	**Positiv Kontrolle**	**Nullprobe**
Beginn	$1{,}2 \times 10^{6}$					
1d	$1{,}5 \times 10^{6}$	$2{,}6 \times 10^{7}$	$6{,}4 \times 10^{7}$	0 direkt	$1{,}9 \times 10^{9}$	$2{,}3 \times 10^{9}$
2d	$1{,}1 \times 10^{6}$	$5{,}1 \times 10^{8}$	$1{,}08 \times 10^{8}$	0 direkt	$1{,}8 \times 10^{9}$	$1{,}2 \times 10^{9}$
3d	$1{,}3 \times 10^{6}$	$7{,}0 \times 10^{8}$	$8{,}0 \times 10^{8}$	0 direkt	$2{,}1 \times 10^{9}$	$9{,}0 \times 10^{8}$
4d	$1{,}2 \times 10^{6}$	$7{,}0 \times 10^{8}$	$1{,}2 \times 10^{9}$	0 direkt	$2{,}0 \times 10^{9}$	$2{,}0 \times 10^{10}$
5d	$9{,}0 \times 10^{6}$	$6{,}0 \times 10^{7}$	$2{,}2 \times 10^{8}$	0 direkt	$1{,}4 \times 10^{9}$	$1{,}3 \times 10^{9}$
6d	$7{,}0 \times 10^{6}$	$1{,}3 \times 10^{9}$	$6{,}0 \times 10^{8}$	0 direkt	$2{,}4 \times 10^{9}$	$2{,}9 \times 10^{8}$
7d	$9{,}0 \times 10^{6}$	$2{,}0 \times 10^{8}$	$4{,}0 \times 10^{8}$	0 direkt	$1{,}4 \times 10^{9}$	$7{,}0 \times 10^{8}$

			6%			
Zeit	**Keimzahl**	**Probe A**	**Probe B**	**Negativ Kontrolle**	**Positiv Kontrolle**	**Nullprobe**
Beginn	$1{,}2 \times 10^{6}$					
1d	$1{,}5 \times 10^{6}$	$2{,}0 \times 10^{6}$	$3{,}1 \times 10^{7}$	0 direkt	$1{,}9 \times 10^{9}$	$2{,}3 \times 10^{9}$
2d	$1{,}1 \times 10^{6}$	$7{,}0 \times 10^{6}$	$1{,}72 \times 10^{7}$	0 direkt	$1{,}8 \times 10^{9}$	$1{,}2 \times 10^{9}$
3d	$1{,}3 \times 10^{6}$	$7{,}7 \times 10^{7}$	$1{,}8 \times 10^{7}$	0 direkt	$2{,}1 \times 10^{9}$	$9{,}0 \times 10^{8}$
4d	$1{,}2 \times 10^{6}$	$2{,}0 \times 10^{8}$	$2{,}0 \times 10^{8}$	0 direkt	$2{,}0 \times 10^{9}$	$2{,}0 \times 10^{10}$
5d	$9{,}0 \times 10^{5}$	$1{,}2 \times 10^{9}$	$3{,}6 \times 10^{8}$	0 direkt	$1{,}4 \times 10^{9}$	$1{,}3 \times 10^{9}$
6d	$7{,}0 \times 10^{5}$	$8{,}0 \times 10^{8}$	$1{,}1 \times 10^{9}$	0 direkt	$2{,}4 \times 10^{9}$	$2{,}9 \times 10^{8}$
7d	$9{,}0 \times 10^{5}$	$9{,}0 \times 10^{8}$	$8{,}0 \times 10^{8}$	0 direkt	$1{,}4 \times 10^{9}$	$7{,}0 \times 10^{8}$

			7%			
Zeit	**Keimzahl**	**Probe A**	**Probe B**	**Negativ Kontrolle**	**Positiv Kontrolle**	**Nullprobe**
Beginn	$1{,}2 \times 10^{6}$					
1d	$1{,}5 \times 10^{6}$	$1{,}49 \times 10^{6}$	$5{,}0 \times 10^{6}$	0 direkt	$1{,}9 \times 10^{9}$	$2{,}3 \times 10^{9}$
2d	$1{,}1 \times 10^{6}$	$1{,}45 \times 10^{7}$	$1{,}0 \times 10^{5}$	0 direkt	$1{,}8 \times 10^{9}$	$1{,}2 \times 10^{9}$
3d	$1{,}3 \times 10^{6}$	$7{,}0 \times 10^{5}$	$1{,}07 \times 10^{6}$	0 direkt	$2{,}1 \times 10^{9}$	$9{,}0 \times 10^{8}$
4d	$1{,}2 \times 10^{6}$	0×10^{4}	$4{,}6 \times 10^{5}$	0 direkt	$2{,}0 \times 10^{9}$	$2{,}0 \times 10^{10}$
5d	$9{,}0 \times 10^{5}$	$4{,}6 \times 10^{7}$	$5{,}8 \times 10^{7}$	0 direkt	$1{,}4 \times 10^{9}$	$1{,}3 \times 10^{9}$
6d	$7{,}0 \times 10^{5}$	$4{,}0 \times 10^{8}$	$1{,}5 \times 10^{8}$	0 direkt	$2{,}4 \times 10^{9}$	$2{,}9 \times 10^{8}$
7d	$9{,}0 \times 10^{5}$	$4{,}9 \times 10^{8}$	$4{,}6 \times 10^{8}$	0 direkt	$1{,}4 \times 10^{9}$	$7{,}0 \times 10^{8}$

			8%			
Zeit	**Keimzahl**	**Probe A**	**Probe B**	**Negativ Kontrolle**	**Positiv Kontrolle**	**Nullprobe**
Beginn	$1{,}2 \times 10^{6}$					
1d	$1{,}5 \times 10^{6}$	$2{,}0 \times 10^{7}$	$5{,}4 \times 10^{5}$	0 direkt	$1{,}9 \times 10^{9}$	$2{,}3 \times 10^{9}$
2d	$1{,}1 \times 10^{6}$	$1{,}0 \times 10^{5}$	$7{,}0 \times 10^{5}$	0 direkt	$1{,}8 \times 10^{9}$	$1{,}2 \times 10^{9}$
3d	$1{,}3 \times 10^{6}$	$2{,}6 \times 10^{5}$	$3{,}0 \times 10^{6}$	0 direkt	$2{,}1 \times 10^{9}$	$9{,}0 \times 10^{8}$
4d	$1{,}2 \times 10^{6}$	0×10^{4}	$4{,}6 \times 10^{5}$	0 direkt	$2{,}0 \times 10^{9}$	$2{,}0 \times 10^{10}$
5d	$9{,}0 \times 10^{5}$	$2{,}2 \times 10^{7}$	$4{,}5 \times 10^{8}$	0 direkt	$1{,}4 \times 10^{9}$	$1{,}3 \times 10^{9}$
6d	$7{,}0 \times 10^{5}$	$1{,}7 \times 10^{7}$	$7{,}0 \times 10^{8}$	0 direkt	$2{,}4 \times 10^{9}$	$2{,}9 \times 10^{8}$
7d	$9{,}0 \times 10^{5}$	$6{,}2 \times 10^{8}$	$8{,}3 \times 10^{7}$	0 direkt	$1{,}4 \times 10^{9}$	$7{,}0 \times 10^{8}$

3. Versuchsprotokoll mit Staphylococcus aureus

Tabelle 23: Ergebnisübersicht über die Wirkung von verschiedenen Octenidinkonzentrationen in Polymethylmethacrylatzement auf Staphylococcus aureus
Alle Zahlenwerte sind pro Milliliter angegeben (d = Tag)

			5%			
Zeit	**Keimzahl**	**Probe A**	**Probe B**	**Negativ Kontrolle**	**Positiv Kontrolle**	**Nullprobe**
Beginn	$8{,}0 \times 10^5$					
1d	$1{,}6 \times 10^6$	$2{,}3 \times 10^5$	0 direkt	0 direkt	$4{,}4 \times 10^8$	$3{,}3 \times 10^8$
2d	$1{,}6 \times 10^6$	$1{,}0 \times 10^6$	0 direkt	0 direkt	$7{,}0 \times 10^8$	$2{,}6 \times 10^8$
3d	$1{,}0 \times 10^6$	179 direkt	5 direkt	0 direkt	$3{,}3 \times 10^8$	$4{,}4 \times 10^8$
4d	$1{,}2 \times 10^6$	0 direkt	0 direkt	0 direkt	$4{,}0 \times 10^8$	$5{,}0 \times 10^4$
5d	$1{,}2 \times 10^6$	0 direkt	500 direkt	0 direkt	$2{,}6 \times 10^8$	$6{,}7 \times 10^8$
6d	$6{,}0 \times 10^5$	0 direkt	450 direkt	0 direkt	$2{,}7 \times 10^8$	$5{,}9 \times 10^8$
7d	$8{,}0 \times 10^5$	0 direkt	0 direkt	0 direkt	$2{,}8 \times 10^8$	$6{,}3 \times 10^8$

			6%			
Zeit	**Keimzahl**	**Probe A**	**Probe B**	**Negativ Kontrolle**	**Positiv Kontrolle**	**Nullprobe**
Beginn	$8{,}0 \times 10^5$					
1d	$1{,}6 \times 10^6$	0 direkt	$3{,}4 \times 10^2$	0 direkt	$4{,}4 \times 10^8$	$3{,}3 \times 10^8$
2d	$1{,}6 \times 10^6$	33 direkt	$6{,}9 \times 10^5$	0 direkt	$7{,}0 \times 10^8$	$2{,}6 \times 10^8$
3d	$1{,}0 \times 10^6$	18 direkt	88 direkt	0 direkt	$3{,}3 \times 10^8$	$4{,}4 \times 10^8$
4d	$1{,}2 \times 10^6$	1 direkt	0 direkt	0 direkt	$4{,}0 \times 10^8$	$5{,}0 \times 10^4$
5d	$1{,}2 \times 10^6$	0 direkt	0 direkt	0 direkt	$2{,}6 \times 10^8$	$6{,}7 \times 10^8$
6d	$6{,}0 \times 10^5$	0 direkt	1 direkt	0 direkt	$2{,}7 \times 10^8$	$5{,}9 \times 10^8$
7d	$8{,}0 \times 10^5$	0 direkt	$2{,}2 \times 10^5$	0 direkt	$2{,}8 \times 10^8$	$6{,}3 \times 10^8$

			7%			
Zeit	**Keimzahl**	**Probe A**	**Probe B**	**Negativ Kontrolle**	**Positiv Kontrolle**	**Nullprobe**
Beginn	$8{,}0 \times 10^5$					
1d	$1{,}6 \times 10^6$	0 direkt	0 direkt	0 direkt	$4{,}4 \times 10^8$	$3{,}3 \times 10^8$
2d	$1{,}6 \times 10^6$	0 direkt	0 direkt	0 direkt	$7{,}0 \times 10^8$	$2{,}6 \times 10^8$
3d	$1{,}0 \times 10^6$	5 direkt	0 direkt	0 direkt	$3{,}3 \times 10^8$	$4{,}4 \times 10^8$
4d	$1{,}2 \times 10^6$	0 direkt	0 direkt	0 direkt	$4{,}0 \times 10^8$	$5{,}0 \times 10^4$
5d	$1{,}2 \times 10^6$	0 direkt	160 direkt	0 direkt	$2{,}6 \times 10^8$	$6{,}7 \times 10^8$
6d	$6{,}0 \times 10^5$	0 direkt	0 direkt	0 direkt	$2{,}7 \times 10^8$	$5{,}9 \times 10^8$
7d	$8{,}0 \times 10^5$	0 direkt	$6{,}0 \times 10^4$	0 direkt	$2{,}8 \times 10^8$	$6{,}3 \times 10^8$

			8%			
Zeit	**Keimzahl**	**Probe A**	**Probe B**	**Negativ Kontrolle**	**Positiv Kontrolle**	**Nullprobe**
Beginn	$8{,}0 \times 10^5$					
1d	$1{,}6 \times 10^6$	0 direkt	0 direkt	0 direkt	$4{,}4 \times 10^8$	$3{,}3 \times 10^8$
2d	$1{,}6 \times 10^6$	0 direkt	$3{,}0 \times 10^4$	0 direkt	$7{,}0 \times 10^8$	$2{,}6 \times 10^8$
3d	$1{,}0 \times 10^6$	0 direkt	$3{,}0 \times 10^4$	0 direkt	$3{,}3 \times 10^8$	$4{,}4 \times 10^8$
4d	$1{,}2 \times 10^6$	0 direkt	0 direkt	0 direkt	$4{,}0 \times 10^8$	$5{,}0 \times 10^4$
5d	$1{,}2 \times 10^6$	0 direkt	0 direkt	0 direkt	$2{,}6 \times 10^8$	$6{,}7 \times 10^8$
6d	$6{,}0 \times 10^5$	0 direkt	1000 direkt	0 direkt	$2{,}7 \times 10^8$	$5{,}9 \times 10^8$
7d	$8{,}0 \times 10^5$	0 direkt	0 direkt	0 direkt	$2{,}8 \times 10^8$	$6{,}3 \times 10^8$

4. Ergebnisse der HPLC:

Tabelle 24: Ergebnisse der HPLC (angegeben ist die Konzentration von Octenidin in ppm in der jeweiligen Probe, HPLC = High Performance Liquid Chromatography, ppm = parts per million)

Probe	**Octenidindi-hydrochlorid [ppm]**	Probe	**Octenidindi-hydrochlorid [ppm]**	Probe	**Octenidindi-hydrochlorid [ppm]**
1	104	**39**	154	**77**	193
2	27	**40**	119	**78**	244
3	17	**41**	94	**79**	227
4	33	**42**	77	**80**	356
5	42	**43**	229	**81**	211
6	51	**44**	58	**82**	158
7	75	**45**	37	**83**	127
8	93	**46**	74	**84**	101
9	87	**47**	89	**85**	240
10	140	**48**	103	**86**	77
11	93	**49**	132	**87**	55
12	78	**50**	163	**88**	105
13	62	**51**	152	**89**	131
14	50	**52**	240	**90**	167
15	106	**53**	150	**91**	224
16	29	**54**	118	**92**	274
17	17	**55**	95	**93**	252
18	35	**56**	71	**94**	378
19	40	**57**	234	**95**	237
20	48	**58**	72	**96**	173
21	64	**59**	46	**97**	137
22	89	**60**	96	**98**	113
23	85	**61**	120	**99**	225
24	146	**62**	142	**100**	58
25	93	**63**	194	**101**	37
26	80	**64**	235	**102**	85
27	66	**65**	216	**103**	110
28	54	**66**	338	**104**	148

29	185	**67**	198	**105**	201
30	58	**68**	145	**106**	278
31	42	**69**	111	**107**	258
32	75	**70**	89	**108**	393
33	76	**71**	269	**109**	224
34	97	**72**	69	**110**	173
35	119	**73**	45	**111**	138
36	152	**74**	102	**112**	102
37	143	**75**	120		
38	245	**76**	150		

9. Danksagungen

Am Abschluss der vorliegenden Arbeit waren viele verschiedene Personen beteiligt, bei denen ich mich ganz herzlich bedanken möchte.

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. Heike von Baum für die Idee zu dieser Arbeit, ihre fürsorgliche Betreuung und allzeitige Unterstützung, begonnen bei der Durchführung der mikrobiologischen Versuche über die Interpretation der Resultate bis hin zur kompletten Fertigstellung der Arbeit. Für den andauernden Einsatz für mich als Doktorand und die Korrekturen der Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei ihr bedanken.

Herrn PD Dr. Mark Bischoff danke ich für die Idee zu dieser Arbeit und die Vermittlung wichtiger Kontakte, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben. Des weiteren danke ich ihm für die Korrekturen meiner Arbeit und für die Unterstützung während der gesamten Zeit als Doktorand.

Herrn Dr. Horst Braunwarth (Firma Schülke&Mayr) danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung des Octenidin sowie für die Durchführung der chromatographischen Konzentrationsbestimmungen des Octenidin.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Angelika Möricke bedanken. Frau Möricke war mir mit größtem Einsatz und immer guten Ideen bei der Ausführung der experimentellen Versuche behilflich. Frau Möricke hat durch ihren unermüdlichen Einsatz und ihre starken Nerven einen großen Anteil an der vorliegenden Arbeit. Vielen herzlichen Dank für die allzeitige Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Lutz von Müller. Herr Dr. von Müller hat mir die Möglichkeit eröffnet, digitale fluoreszenzmikroskopische Bilder aufzunehmen und damit viel Zeit für mich geopfert. Herzlichen Dank dafür.

Meinem Doktorandenkollegen und Freund Florian Groß möchte ich auch ganz herzlich für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und auch außerhalb der Uni danken.

Großer Dank gilt ebenfalls dem gesamten Team der Sektion für Klinikhygiene. Die angenehme Atmosphäre hat ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen voran gilt mein besonderer Dank meinen Eltern Elisabeth und Prof. Dr. Arnulf Weckbach für die langjährige äußerst großzügige Unterstützung und Förderung meiner Ausbildung. Ebenfalls bedanke ich mich ganz herzlich bei ihnen für die Unterstützung in allen Lebenslagen. Ihnen ist diese Arbeit in größter Dankbarkeit gewidmet.