Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Chirurgie
Klinik für Unfallchirurgie, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie
Prof. Dr. med. Florian Gebhard

Antiseptischer Knochenzement: Freisetzung von Octenidin aus Polymethylmethacrylat (PMMA)

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

Florian Langhoff
Kiel

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1.Berichterstatter: Privatdozent Dr. Mark Bischoff

2.Berichterstatter: Prof. Dr. Heike von Baum

Tag der Promotion: 30.05.2008

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis Seite

Abkürzungsverzeichnis 1

1. Einleitung 2

1.1 Der Knochenzement 2

1.2 Die infizierte Endoprothese 2

1.3 Antiseptika 5

1.4 Fragestellung 7

2. Material und Methoden 8

2.1 Material 8

2.2 Methoden 10

2.2.1 Herstellung der Antiseptika-haltigen Zementplättchen 10

2.2.3 Herstellung der Bakteriensupensionen 12

2.2.4 Herstellung und Verwendung des Phosphatpuffers 13

2.2.5 Agardiffusions-Test 13

2.2.6 Bioassay 14

2.2.7 High Perfomance Liquid Chromatography 16

2.3 Statistik 17

3. Ergebnisse 18

3.1 High Perfomance Liquid Chromatography 20

3.2 Agardiffusions-Test 22

3.3 Bioassay 24

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse 39

4. Diskussion 40

4.1 Fehlerdiskussion 40

4.2 Ergebnisdiskussion 41

4.3 Ausscheidungskinetik des Wirkstoffes 42

4.4 Protheseninfektionen 43

4.5 Die Verwendung von PMMA mit Antibiotika 44

5. Zusammenfassung 50

6. Literatur 52

7. Danksagung 57

8. Anhang 58

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
CASO	Caseinpepton Sojamehlpepton
DM	Deutsche Mark
g	Gramm
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KBE	Kolonie bildende Einheit
KBE/ml	Kolonie bildende Einheit pro Milliliter
l	Liter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
Na_2HPO_4	Di-Natrium-Hydrophosphat
NaH_2PO_4	Natrium-Di-Hydrophosphat
NaCl	NatriumChlorid
OD	Optische Dichte
PMMA	Polymethylmethacrylat
Ppm	parts per million
pH	Potentia hydrogenii
PA	*Pseudomonas aeruginosa*
SA	*Staphylococcus aureus*
SE	*Staphylococcus epidermidis*
SM	*Streptococcus mitis*
USD	US Dollar

1. Einleitung

1.1 Der Knochenzement

Der heute als Knochenzement bekannte Kunststoff Polymethylmethacrylat (PMMA) wurde 1902 durch den Chemiker Otto Röhm vorgestellt. Es handelt sich um einen glasartigen, festen Stoff, der als Plexiglas 1928 erstmals im Verzeichnis der deutschen Patente erwähnt wurde und seither vielseitige Einsatzmöglichkeiten findet. In der Medizin wurde der neuartige Kunststoff zunächst in der Zahnmedizin sowie der Kiefer- und Gesichtschirurgie als Zahnersatz und Zahnverankerung verwendet. Erst als 1940 ein Zusatz (Benzoylperoxid) entdeckt wurde, der die Aushärtung des Kunststoffgemisches auch bei Zimmertemperatur ermöglichte, begann die breitere Anwendung. 1949 wurde von der Firma Kulzer & Co der Kunststoff Palavit® auf den Markt gebracht, der Vorläufer des heutigen Palacos®. Zuerst wieder für Dentalzwecke gedacht, bediente man sich dessen später auch in der plastischen Chirurgie, Neurochirurgie und, hauptsächlich durch Charnley ab 1958 vorangetrieben, auch in der operativen Orthopädie [24]. Heute wird PMMA vor allem in der Endoprothetik als Knochenzement zur Verankerung von Prothesen oder als Knochenersatz in der Chirurgie verwendet. Verschiedene Firmen haben unterschiedliche Arten von Knochenzement entwickelt, die sich in erster Linie im Polymer unterscheiden, wodurch Viskosität und Aushärteverhalten beeinflusst werden [58].

Als weiterer Schritt wurden bereits 1970 von Buchholz et al. dem Knochenzement Antibiotika beigemischt, um die Infektionsrate der implantierten Prothesen zu senken [17]. Nach der aseptischen Lockerung der Prothesen ist damals wie heute die infizierte Prothese der zweithäufigste Grund für eine Revision [5, 28, 67]. Buchholz versuchte damit schon früh ein Problem zu lösen, dass auch heute noch zu einer der gefürchtetsten Komplikationen beim Gelenkersatz zählt [28].

1.2 Die infizierte Endoprothese

Bei einer geschätzten Zahl von einer Million ersetzter Gelenke pro Jahr weltweit [9], davon mehr als 120.000 Hüftprothesen allein in Deutschland [93], und einer Infektionshäufigkeit einer Prothese von 0,1-3 % je nach Zentrum und Literaturangabe [1, 65] nimmt das Problem einer infizierten Endoprothese eine wichtige Stellung ein. Die Folgen für die Patienten und das chirurgische Team sind sehr belastend und haben oft den Wechsel der Prothese, eine langandauernde antibiotische Versorgung und längere

Liegezeiten mit hohen Kosten zur Folge. Im Durchschnitt verursacht eine infizierte Endoprothese das 2-3 fache an Kosten einer unkomplizierten Primäroperation [77]. Pro Jahr werden in Deutschland ca. 20000 Revisionseingriffe durchgeführt [93]. Es ist aufgrund der demographischen Entwicklung aber zu vermuten, dass die absolute Zahl notwendiger Wechseloperationen in Zukunft steigen wird [95]. Dabei hat Pingsmann et al. 1998 in einer Kostenanalyse an der Universität Essen die gesamten Aufwendungen für die Primärimplantation einer Hüftprothese mit stationärem Aufenthalt auf 18.600 DM (= 9495 Euro) beziffert [84]. Diese Zahlen verdeutlichen die beträchtlichen gesundheitspolitischen und volkswirtschaftlichen Konsequenzen einer Protheseninfektion.

Zahlreiche Versuche, Studien und klinische Erfahrungen mit Antibiotikazusatz zum Knochenzement führten dazu, dass die Industrie heute bereits vorgefertigte Kombinationen auf den Markt gebracht hat. Palacos® hat sich in zahlreichen Studien wegen seiner besseren Abgabe der zugesetzten Antibiotika als besonders geeignet herausgestellt [97, 104] und ist mit >90 % der in Deutschland am häufigsten verwendete Knochenzement [56]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass aus bakteriologischer und physikochemischer Sicht Aminoglykoside, vor allem Gentamicin, als Antibiotikumzusatz besonders geeignet sind [64, 109]. Die Erreger einer Protheseninfektion sind vor allem grampositive Bakterienstämme. Koagulase-negative Staphylokokken wie *Staphylococcus epidermidis*, gefolgt von *Staphylococcus aureus* und Streptokokken, stellen mit 80 % die häufigsten Isolate dar [29]. Dabei gelangen die Bakterien fast immer während der Operation direkt oder indirekt in die Operationswunde. Sie stammen zumeist von der Haut der Patienten oder des Operationsteams und werden auf abgeschilferten Schuppen in die Wunde gebracht.

Eine von Ullmann modifizierte Tabelle [106], basierend auf einer Untersuchung von Nafziger et al. [71] zeigte den Wandel des Erregerspektrums zwischen 1972-1984 und 1985-1994 (siehe Tabelle 1). Dabei wurde deutlich, dass im späteren Intervall seltener *Staphylococcus aureus*, gramnegative Erreger wie E.coli und Proteus sowie Mischinfektionen, dafür aber häufiger koagulase-negative Staphylokokken und vor allem *Pseudomonas aeruginosa* bei Infektionen von Endoprothesen isoliert werden konnten.

Tabelle 1: Mikroorganismen, isoliert bei Infektionen von Gelenk-Endoprothesen [106]

Mikroorganismen	**1972-1984**		**1985-1994**	
	n	%	n	%
Grampositive	**275**	**68,9**	**194**	**71,2**
-Koagulase-negative Staphylokokken	86	21,6	75	27,7
-Staphylococcus aureus	129	32.3	72	26,6
-Streptococcus viridans	-	-	12	4,4
-Streptokokken der Gruppe D	-	-	21	7,7
-Andere	60	15,1	12	4,8
Gramnegative	**86**	**21,6**	**48**	**17,7**
-E.coli	31	7,7	7	2,6
-Proteus	21	5,3	10	3,7
-Pseudomonas aeruginosa	-	-	21	7,7
-Andere	34	8,5	10	3,7
Anaerobier	21	5,3	20	7,4
Mischinfektionen	17	4,3	20	7,4
Candida spp.	-	-	1	0,4
Summe	**399**	**100**	**271**	**100**

Die nahe liegende prophylaktische Verwendung von Knochenzement mit Antibiotika wurde in unterschiedlichen Studien untersucht, eine einheitliche Meinung lässt sich daraus nicht ableiten. So wurde in einigen Studien durch die prophylaktische Verwendung von antibiotikabeladenem Knochenzement eine deutliche Reduktion der Protheseninfektionen festgestellt [49, 102, 118], andere Untersuchungen zu diesem Thema widerlegten diese Ergebnisse aber einige Jahre später [33] (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Prospektive und retrospektive Studien, die die Infektionsraten nach systemischer Antibiotikagabe (ohne antibiotikabeladenem Zement) und lokaler Antibiotikagabe (mit antibiotikabelandenem Zement) als Infektionsprophylaxe bei Erstimplantation vergleichen.

Patientenanzahl	Studiendesign	Infektionsrate (in %) Mit / Ohne Antibiotika		Follow-up (in Jahren)	Referenz
667	Retrospektiv	0,6	4,1	4 – 5	Thierse 1978
800	Prospektiv	0,0	0,0	2	Pfarr und Burri 1979
445	Prospektiv	1,1	5,9	3 – 6	Wannske und Tscherne 1979
1688	Prospektiv	0,8	1,9	5	Josefsson 1990
4825	Retrospektiv	0,9	0,8	8	Espehaug et al 1997.

Zudem wurden schon bald nach dem ersten Einsatz von Knochenzement mit Gentamicin erste Resistenzen von *Staphylococcus aureus* bekannt [70, 96, 123]. Es zeigte sich, dass gerade die Staphylokokken eine besondere Affinität zu Endoprothesen und Kunststoffmaterialien wie PMMA besitzen [112].
Das Auftreten immer wieder neuer Resistenzen der Erreger zwingt zur Entwicklung neuer Maßnahmen. In den USA allein hat 1998 laut einer Veröffentlichung von Lysaght et al. das Forschungsaufkommen zur Entwicklung neuer, antibiotisch wirkender Oberflächenmaterialien eine Summe von jährlich USD 450 Millionen erreicht [65].

1.3 Antiseptika

Als Alternative der externen Antibiotikabehandlung werden schon lange in Ergänzung zur chirurgisch-mechanischen Wundreinigung, zur Behandlung aseptischer und septischer Wunden sowie zur Gelenkspülung Antiseptika eingesetzt. Nach allgemeiner Definition besteht die prophylaktische bzw. therapeutische Zielsetzung der Antiseptik darin, Mikroorganismen mit Hilfe lokal wirkender chemischer Substanzen (Antiseptika oder auch Antiinfektiva) abzutöten, zu inaktivieren oder in ihrer Vermehrung zu hemmen.
Die Abtötung der Bakterien in therapeutischer Dosierung wird auch Bakterizidie genannt. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Bakteriostase zur Hemmung des Bakterienwachstums.

Die Entwicklung der Antiseptika fing schon in der Antike mit in Wein getauchten Leinenverbänden an und fand in der Entwicklung des Karbol-Säure-Verbandes des englischen Arztes J. Lister im Jahre 1867 einen neuen Ansatz. Durch die Erfindung des Antibiotikums etwas in den Hintergrund gerückt, fand nach Ausbildung immer weiterer Resistenzen die Behandlung mit Antiseptika in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Die Forschung brachte immer mehr antiseptische Substanzen auf den Markt. Viele dieser Präparate besitzen ein breites antimikrobielles Wirkspektrum und eine geringe systemische Toxizität, einige auch eine gute lokale Verträglichkeit an Haut und Schleimhäuten. Das in dieser Arbeit verwendete Antiseptikum Octenidin ist in Verbindung mit Phenoxyethanol seit 1995 als Octenisept® in Deutschland als Schleimhautantiseptikum zugelassen. Es zeichnete sich bisher besonders in der Gynäkologie und Urologie durch sehr gute Verträglichkeit und Wirksamkeit aus [32]. *In vitro* Versuche zeigten die abtötende Wirkung von Octenisept® auf grampositive und gramnegative Bakterien innerhalb von 30 Sekunden [35]. Dabei hat der Wirkstoff Octenidinhydrochlorid keinen negativen Einfluss auf die Wundheilung [41]. Von Kalteis et al. wurde Octenidin in einer *in vivo* Studie ebenfalls eine geringe Toxizität bestätigt [51].

Es kam daher die Frage auf, ob das Antiseptikum Octenidin als Zugabe zum Knochenzement seine Eigenschaften behält und eine antibakterielle Wirkung zeigt, ähnlich dem Wirkprinzip antibiotischer Knochenzemente.

1.4 Fragestellung

- Wird nach Zugabe zu handelsüblichem Knochenzement der Wirkstoff Octenidin freigesetzt?
- In welcher Größenordnung wird der Wirkstoff Octenidin aus dem Knochenzement freigesetzt?
- Hat die bei der Polymerisation des Knochenzements entstehende Hitze einen Wirkungsverlust von Octenidin zur Folge?
- Hat die Zugabe des Antiseptikums Octenidin zu handelsüblichem Knochenzement eine antibakterielle Wirkung auf häufige Verursacher von Endoprotheseninfektionen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

Verbrauchsmaterial:

-Knochenzement: Palacos® (Merck Biomaterial GmbH, D-64271 Darmstadt)
Refobacin-Palacos® R (Merck Biomaterial GmbH, D-64271 Darmstadt)

-Antiseptikum: Octenidin-Dihydrochlorid, Charge 1046639 (Schülke&Mayr GmbH, D-22851 Norderstedt)

Verwendet wurde handelsüblicher Knochenzement Palacos® R der Firma Biomet Merck. Dieser gehört zu den Knochenzementen mit Standardviskosität beim Anmischen unter Raumtemperaturbedingungen und besteht aus 2 steril verpackten Päckchen á 40 g Zementpulver und 2 Ampullen mit je 20 ml Monomerflüssigkeit. Das Pulver ist ein feines Polymerisat (Teilchendurchmesser <30 µm) aus Methacrylsäuremethylester, mit einem Copolymeranteil von Methylacrylat. Als Katalysator sind dem Pulver ca. 0,5 % Dibenzoylperoxid zugesetzt. Als Röntgenkontrastmittel enthält das Pulver ca. 15 % Zirkondioxid.
Die Flüssigkeit besteht aus monomerem Methacrylsäuremethylester.
Beim Zusammenmischen von 2 Gewichtsteilen Pulver mit 1 Gewichtsteil Flüssigkeit reagiert das Dibenzolperoxid im Pulver mit dem Dimethyl-p-toluidin in der Flüssigkeit miteinander, was die radikalische Polymerisation des Monomers anregt. Die Mischung ist so abgestimmt, dass sie schon nach etwa 1 min als Teig verwendet werden kann. Dieser Teig bleibt für ca. 4 min knetbar und beginnt dann unter Wärmeentwicklung auszuhärten. Je nach Masse des geformten Zementkörpers entstehen dabei Temperaturen bis 70° C. Nach ca. 6 min ist die Polymerisation im Wesentlichen abgeschlossen und ein mechanisch einheitlich harter Körper entstanden. Durch vorherige Kühlung der Bestandteile auf unter 4° C lässt sich eine Verlangsamung der Polymerisation und damit eine Verlängerung der Verarbeitungszeit erreichen.
Das bei diesen Versuchen dem Knochenzement zugefügte Octenidinpulver ist ein breit antimikrobiell wirkendes Antiseptikum der Firma Schülke & Mayr. Es enthält im wesentlichen Octenidindihydrochlorid.
Octenidindihydrochlorid wird in die Reihe der Bispyridine eingeordnet. Jedes Molekül enthält 2 kationaktive Zentren, in denen die positive Ladung auf 2 Stickstoffatome mesomer verteilt ist. Seine Wirkung erzielt es durch Reaktion mit Zellwand- und

Membranbestandteilen der Mikrobenzelle und führt dadurch zur Zerstörung der Zellfunktion.

Laborausstattung:

-Aluminiumform mit 18 Löchern, je 10 mm Durchmesser, 5 mm Dicke, Zwischenplatten aus Teflon (Sonderanfertigung, hergestellt durch das Feinmechaniklabor der Universität Ulm, D-89075 Ulm)

-Zementschale mit Spachtel, Polyacetat-Polyethenelastomer (Protek AG, CH-3110 Bern)

-Präzisonswaage (Mettler AE 200)

-Inkubator Heraeus B 6420 (Heraeus Instruments)

-Spektral-Photometer GT 9301 (Gene-Trak Systems)

-Vibrationsschüttler Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

Materialien für die mikrobiologische Diagnostik:

-Bakterienspezies: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)
Streptococcus mitis (ATCC 47456)
Staphylococcus epidermidis (ATCC 12228)
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)
(Universität Ulm, Sektion Klinikhygiene, 89075 Ulm)

-Caseinpepton-Sojamehlpepton- (CASO-) Bouillon (Merck KGaA, D-64271 Darmstadt)

-CASO-Blutagar-Platten (heipha Dr. Müller GmbH)

-Natrium-Chlorid-(NaCl-) Lösung (Delta Select GmbH, D-72793 Pfullingen)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der Antiseptika-haltigen Zementplättchen

Unter sterilen Bedingungen und Raumtemperatur wurden im Verhältnis zum Palacospulver in unterschiedlichen Versuchsreihen 1- 4 % Octenidinpulver (0,2- 0,8 g á 20 g) mit einer Präzisionswaage abgewogen und dem Polymerisat unter guter Durchmischung beigefügt. Anschließend wurde nach Herstellerangaben das Pulvergemisch mit der Monomerflüssigkeit zusammengeschüttet und der Zement angerührt. Dabei waren das Pulvergemisch sowie die Monomerflüssigkeit vorher über mindestens 6 Stunden gut gekühlt worden, um die anfängliche niedrigvisköse Phase bei der Polymerisation möglichst lange zu erhalten [82]. So konnte eine Bildung von Luftblasen bei der weiteren Verwendung und damit eine Fehlerquelle weitestgehend vermieden werden.

Die entstandene Masse wurde in zwei speziell erstellte Aluminiumformen (Abbildung 1) gegossen, die je 18 Löcher identischer Größe enthielten (10 mm Durchschnitt, 5 mm Dicke). So entstanden nach Aushärtung des Zements jeweils 36 gleich große Zementplättchen (Abbildung 2), die dann aus den Aluminiumformen herausgelöst werden konnten. Zur Überprüfung der Standardisierung wurden diese einzeln abgewogen, mehr als 5 % vom Mittelgewicht abweichende Plättchen wurden aussortiert. Somit konnte eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden.

Bis zu ihrer Verwendung lagerten die Plättchen kühl und dunkel in sterilen Behältern.

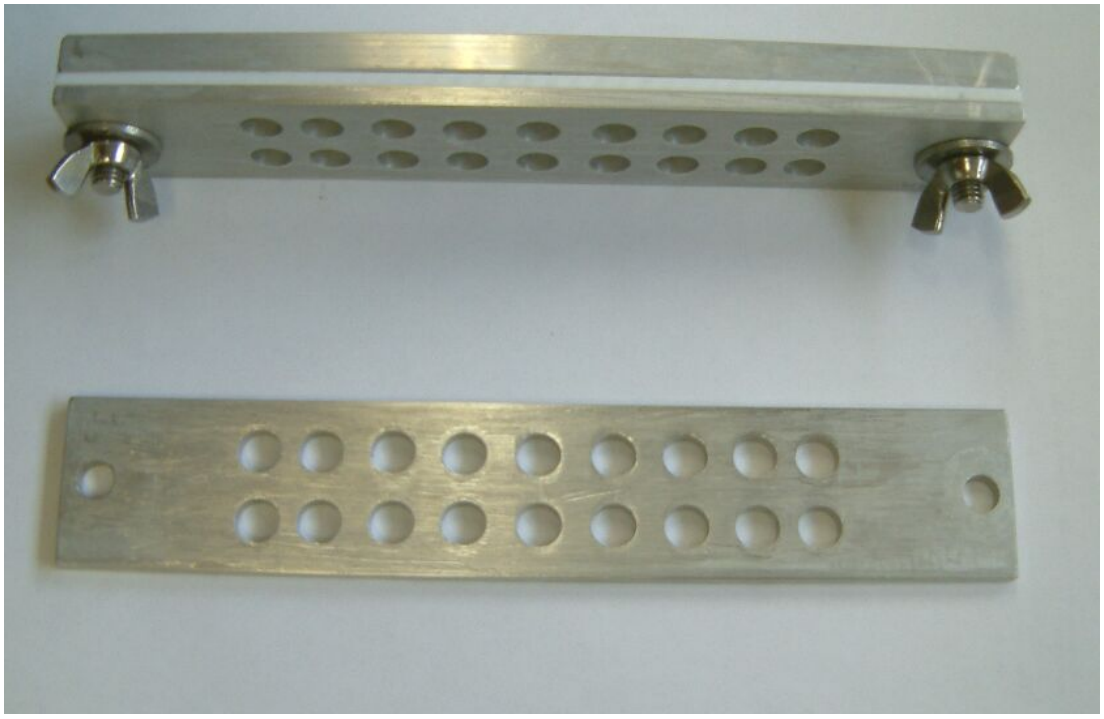


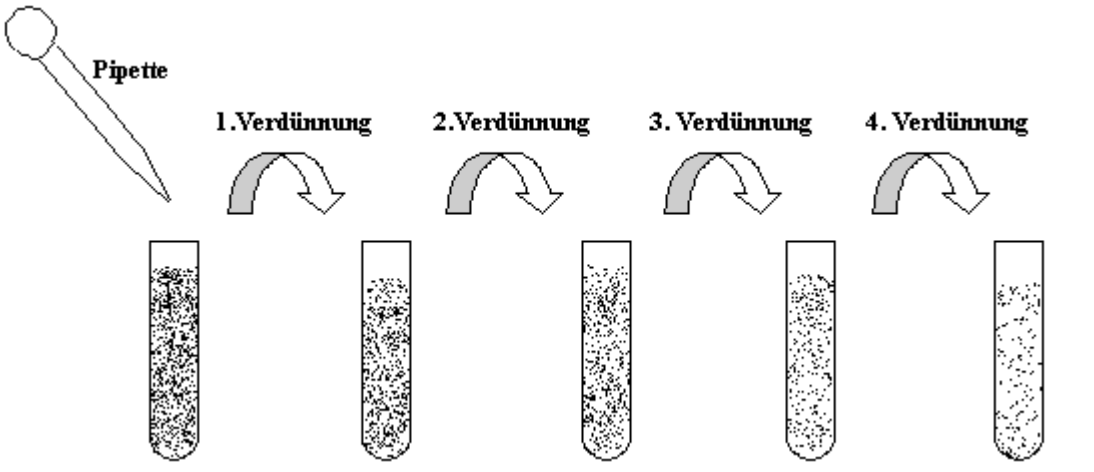
Abbildung 1: Aluminiumform zur Herstellung standardisierter Zementplättchen



Abbildung 2: Fertige Zementplättchen neben der Aluminiumform

2.2.3 Herstellung der Bakteriensuspensionen

Es wurden mit *Staphylococcus aureus, Streptococcus mitis, Staphylococcus epidermidis* Bakterien ausgewählt, die zu den hauptsächlichen Erregern für Endoprotheseninfekionen zählen [29]. Zudem wurde noch *Pseudomonas aeruginosa* als Problemkeim mit in die Versuche aufgenommen. Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurde zuerst eine Ausgangssuspension mit einer optischen Dichte (OD) nach dem McFarland Standard 0,5 in 0,9 %iger NaCl-Lösung mit Hilfe eines Spektral-Photometers hergestellt. Dazu wurden mit einer sterilen Öse einzelne Kolonien von den täglich frisch angezüchteten Bakterienkulturen aufgenommen, in sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung eingerieben und auf dem Vibrationsschüttler vermischt. Als Zielmenge waren 10^6 KBE/ml NaCl angestrebt, wobei laut Literaturangaben eine Zahl von 10^5 Keimen pro mm^3 Gewebe als Richtlinie für eine therapiebedürftige Infektion gelten kann [75]. Als Kontrolle der eingestellten OD dienten verdünnte Ausstriche der frisch angesetzten Suspensionen. Hierzu wurden jeweils 100 µl der Bakterienlösung entnommen und mit 900 µl sterilem 0,9 %igen NaCl vermischt, was einer Verdünnung um den Faktor 10 entspricht. Nach 3 weiteren Verdünnungsreihen war die Kontrolle dann so weit verdünnt, dass 100 µl der letzten Verdünnungsreihe 10 KBE enthalten sollten (Abbildung 3).



Legende: KBE: Kolonie bildende Einheit
ml: Milliliter

Abbildung 3: Verdünnungsreihe zur Herstellung der Bakteriensuspension

Die angestrebte Zielmenge wurde also soweit verdünnt, dass sich je Verdünnungsreihe die angestrebten 10^6 KBE/ml der Ausgangssuspension um eine Potenz verringerten.

Zur Überprüfung wurden dann je 100 µl der letzten und vorletzten Verdünnungsreihe auf einer Blut-CASO-Platte ausgestrichen und für 24 h bei 36° C bebrütet. Eine Anzahl von 100 KBE in der 3., eine Anzahl von 10 KBE in der 4. Verdünnungsreihe entsprach dann der angestrebten Zielmenge von 10^6 KBE/ml NaCl.
Die so erstellte Ausgangssuspension musste nun in die Trägerlösung, eine CASO-Bouillon, eingebracht werden. Wieder galt als Zielgröße 10^6 KBE/ml Bouillon, also mussten pro 10 ml Bouillon 100 µl der angesetzten Ausgangssuspension zugefügt werden.
Die Bouillon wurde dann mittels des Vibrationsschüttlers gut vermischt, um eine homogene Verteilung der Bakterien zu erreichen.
Jeden Tag wurde zu Anfang der neuen Tagesmessungen die Ausgangssuspension und CASO-Bouillon frisch zubereitet, um eine Kontamination zu verhindern.

2.2.4 Herstellung und Verwendung des Phosphatpuffers

Zum messbaren Nachweis der Elution des Octenidin aus dem Knochenzement wurden Zementplättchen jeder Konzentration in Phosphatpuffer gelegt.
Dazu wurde 0,1 molarer Phosphatpuffer mit einem pH von 7,4 verwendet, der zuvor aus Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 angerührt wurde. Na_2HPO_4 besitzt ein Molekulargewicht von 141,96, NaH_2PO_4 von 137,99. Für eine 0,1 molare Lösung werden also 14,2 g Na_2HPO_4 und 13,1 g NaH_2PO_4 auf 1l Wasser benötigt.
Bei einer Vermischung der beiden Lösungen im Verhältnis von ca. 9:1 (Na_2HPO_4 : NaH_2PO_4) entsteht dann ein physiologischer pH von 7,4.

2.2.5 Agardiffusions-Test

In Anlehnung an die bereits durchgeführten Studien über die Abgabe unterschiedlicher Antibiotika aus verschiedenen Knochenzementarten und deren antibakterielle Wirkung wurde anfänglich das dort beschriebene Agardiffusions-Testkonzept übernommen.
Dabei wurden 100µl einer vorher angefertigten standardisierten Bakteriensuspension (10^6 KBE/ml Suspension) auf CASO-Blutplatten so ausgestrichen, dass sich ein dünner Bakterienfilm an der Oberfläche bildete. Verwendet wurden die Bakterienstämme *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Streptococcus mitis* (ATCC 47456), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) sowie *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Die vorher hergestellten Zementplättchen mit unterschiedlichen Octenidinkonzentrationen

wurden direkt anschließend zentral auf diese CASO-Blutplatten gelegt und über Nacht für 24 h bei 36° C bebrütet.
Nach dem gleichen Schema wurde zum Vergleich auch handelsüblicher Palacos® R mit Refobacin-Zusatz der Firma Biomet Merck, Darmstadt, verwendet.

2.2.6 Bioassay

Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mitis* und *Pseudomonas aeruginosa* in Abhängigkeit von der Versuchsdauer und der Wirkstoffkonzentration

Zu Anfang wurden je 5 ml von der frisch vorbereiteten Bakterienbouillon in Reagenzgläser pipettiert, in die dann im Doppelansatz einzelne Zementplättchen mit Wirkstoff-konzentrationen von 1 % bis 4 % kamen (Abbildung 4).

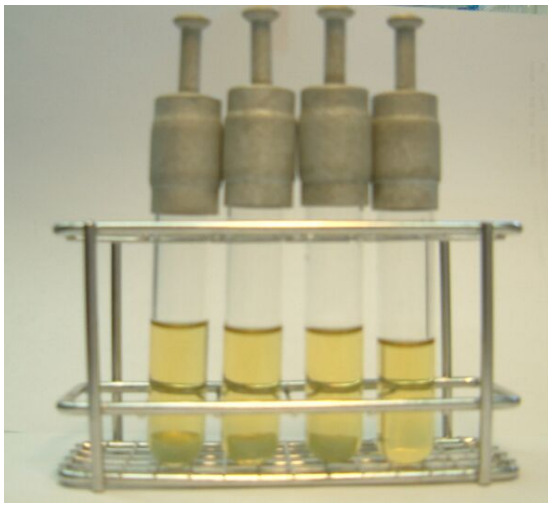


Abbildung 4: Zementpellets in Reagenzgläsern mit Bakterienbouillon

Zudem wurden reine Bakteriensuspensionen ohne den Zusatz von Zementplättchen angesetzt. Die bei der Auswertung gemessenen Bakterienkonzentrationen entsprachen also dem ungehemmten Wachstum der Bakterien in der reinen Suspension. Diese Ansätze waren die Positivproben. Des Weiteren wurden Ansätze mit der Bakteriensuspension mit Zementplättchen ohne Wirkstoffgehalt gemacht. Diese als Nullproben gekennzeichneten Ansätze dienten dem Nachweis, dass von dem reinen Knochenzement selber keine antibakterielle Wirkung ausgeht und entsprachen in der gemessenen Bakterien-

konzentration den Positivproben. Als Negativproben wurden reine CASO-Bouillon-Ansätze bezeichnet, die weder Bakterien noch Zementplättchen beinhalteten und eine eventuelle Verunreinigung der Ausgangsbouillon anzeigen sollten. Alle Proben standen jeweils für 24 h bei 36° C im Brutschrank, ehe sie am folgenden Tag weiterverarbeitet oder ausgewertet wurden.

Die Zementpellets mit Wirkstoff wurden mit sterilen Pinzetten aus den Reagenzgläsern genommen und mit sterilem NaCl kurz von eventuellen Bakterienrückständen freigespült. Dann wurde nach dem schon beschriebenen Schema eine frische Bakteriensuspension hergestellt, in neue Reagenzgläser gefüllt, mit den gespülten Pellets versehen und erneut für 24 h bei 36° C bebrütet. So wurde über einen Zeitraum von 6 Tagen verfahren, wodurch ein Verlauf der Wirksamkeit des Octenidinzusatzes festgestellt werden konnte.

Von den bereits bebrüteten Bakterienbouillons wurden nach Entnahme der Zementplättchen jeweils Proben entnommen, deren optische Dichte im Vergleich zur Negativprobe bestimmt und in Tabellen festgehalten.

Aus allen bebrüteten Proben wurden nach Durchmischung auf dem Vibrationsschüttler je 100 µl als Kontrolle entnommen und auf CASO-Agar mit sterilen Spateln ausgestrichen, wobei eine erhöhte optische Dichte eine eventuell nötige Verdünnung der Proben vorher anzeigte. Die Ausstriche der einzelnen Bakterienlösungen wurden wiederum für 24 h bei 36° C bebrütet und am nächsten Tag ausgezählt. Im Verhältnis zur Verdünnung konnte so die Anzahl der in den Bouillons gewachsenen KBE errechnet werden.

Das jeweilige Bakterienwachstum, abhängig von Zeit und Octenidinkonzentration, ist in den Ergebnisstabellen im Anhang dargestellt.

Als Bakterien wurden die Stämme *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Streptococcus mitis* (ATCC 47456), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), die den Großteil der intra- und postoperativen Infektionserreger darstellen, und als Problemkeim der *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) gewählt.

2.2.7 High Performance Liquid Chromatography

Prinzip der Methode:

Die HPLC (zu Deutsch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie) ist 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 (Trennsäule) transportiert wird. Je nach Art der Wechselwirkung zwischen stationärer Phase, 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 Probensubstanzen voneinander getrennt.

Bei der Verteilungschromatographie nutzt man die unterschiedliche Löslichkeit der zu trennenden Substanzen in den beiden Phasen aus. In der Normalphasen-Verteilungs-Chromatographie ist die stationäre Phase polarer als die mobile Phase, in der Reversed-Phase (RP-Umkehrphase)-Chromatographie ist die mobile Phase polarer als die stationäre Phase. 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 angewendet.

Durchführung der Methode:

Dieser Versuchsteil ermöglichte die quantitative Messung der Freisetzung von Octenidin-dihydrochlorid aus dem Knochenzement Palacos® in Pufferlösung mittels HPLC.

Dazu wurde der Phosphatpuffer nach der Herstellung autoklaviert und dann zu je 5 ml auf Reagenzgläser verteilt. In diese wurden anschließend im Doppelansatz die Zement-plättchen der unterschiedlichen Konzentrationen gelegt.

Zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb von drei Wochen wurden die Plättchen wieder entnommen und die Phosphatpufferlösungen wurden bis zu ihrer Untersuchung bei -20° C gelagert. So konnte eine Elution des Wirkstoffs abhängig von Konzentration und Einwirk-dauer untersucht werden und die Frage der Wirkstoffabgabe beantwortet werden. Dabei

wurde vor allem die Elution in den ersten Stunden näher untersucht, da es in der peri-operativen Phase am häufigsten zur bakteriellen Kontaminierung der Wunde kommt.
Dieser Teil der Versuchsreihe wurde im Labor der Klinikhygiene der Universität Ulm, 89075 Ulm durchgeführt.
Da hier ein High Performance Liquid Chromatograph nicht verfügbar war, fanden die anschließenden Untersuchungen der Phosphatpufferproben im Labor der Firma Schülke & Mayr, 22840 Norderstedt, statt.

2.3 Statistik:

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Mittelwerte gemessen. Außerdem wurde die Reduktion der Testkeime bei unterschiedlichen Antiseptikakonzentrationen in log-Stufen angegeben. Statistische Verfahren kamen hier nicht zu Anwendung.

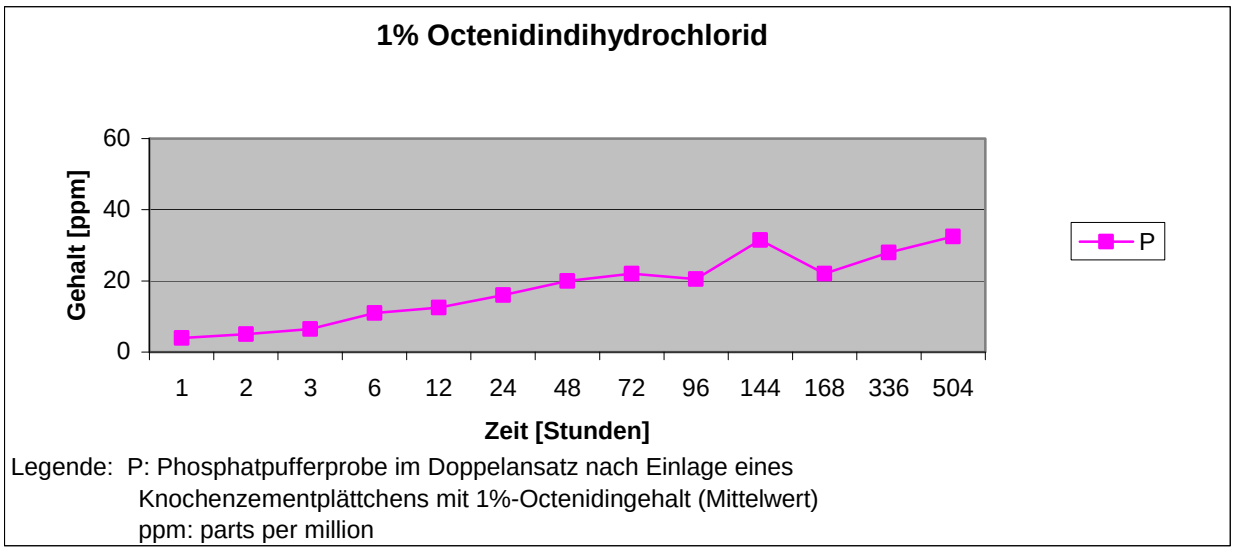
3. Ergebnisse

3.1 High Performance Liquid Chromatography

Quantitative Messung der Freisetzung von Octenidindihydrochlorid aus dem Knochenzement Palacos® in Pufferlösung mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Messeinheit: parts per million (ppm).

3.1.1 Ergebnisse der Untersuchung der 1 %-haltigen Octenidin-Zementplättchen in Pufferlösung

In der ersten Stunde erfolgte die höchste Wirkstoffabgabe aus dem Zementverbund (4 ppm in beiden Ansätzen). In den folgenden Stunden löste sich weiterhin Octenidin aus den Palacosplättchen, jedoch auf die Zeit umgerechnet, trat weniger Wirkstoff pro Stunde frei als in der ersten Stunde. Anhand der Ergebnisse war ebenfalls zu sehen, dass die Abgabe des Wirkstoffes mit der Einlagerungszeit in der Pufferlösung korrelierte. So zeigte sich nach 3 Wochen = 504 Stunden Einwirkzeit mit 28 ppm bzw. 37 ppm ein höherer Wirkstoffgehalt in der Pufferlösung als nach 2 Wochen = 336 Stunden (22 ppm bzw. 34 ppm).
Die in Abbildung 5 dargestellten Mittelwerte verdeutlichen die zunehmende Wirkstoffabgabe grafisch.

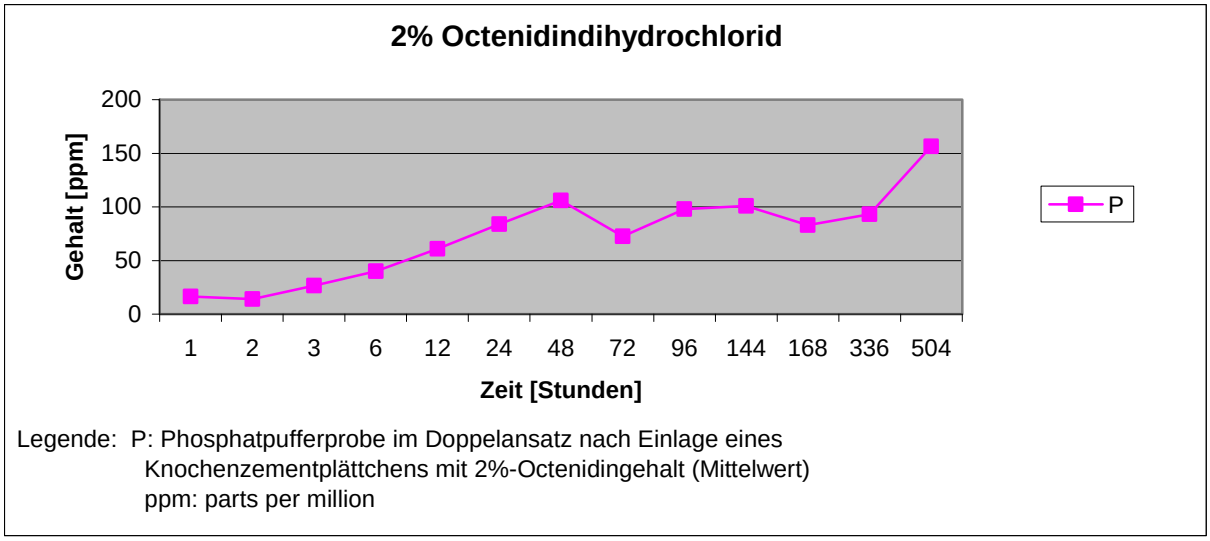


Legende: P: Phosphatpufferprobe im Doppelansatz nach Einlage eines Knochenzementplättchens mit 1%-Octenidingehalt (Mittelwert)
ppm: parts per million

Abbildung 5: Freisetzung des Wirkstoffes Octenidin aus Knochenzement in Pufferlösung über einen Zeitraum von 504 Stunden (= 3 Wochen)

3.1.2 Ergebnisse der Untersuchung der 2 %-haltigen Octenidin-Zementplättchen in Pufferlösung

Auch hier wurde in der ersten Stunde mit 15 ppm und 18 ppm die höchste Menge freigesetzt, im Vergleich zu den 1 %-haltigen Zementplättchen also eine viermal höhere Wirkstoffmenge. In den darauf folgenden Stunden kam es in Relation zur Einlagerungszeit zu geringerer Freisetzung des Wirkstoffes. Auch in dieser Versuchsreihe war zu erkennen, dass es auch nach Wochen noch zur Elution des Wirkstoffes aus dem Palacos® kam. Nach 3 Wochen hatte die Pufferlösung ein Octenidingehalt von 153 ppm bzw. 160 ppm, auch hier mehr als eine Vervierfachung der freigesetzten Menge gegenüber den Ergebnissen aus dem Versuch mit 1 %-Octenidingehalt. Wie die Abbildung 6 anhand der Mittelwerte zeigt, ist gerade am Anfang eine fast lineare Abgabe zu beobachten.

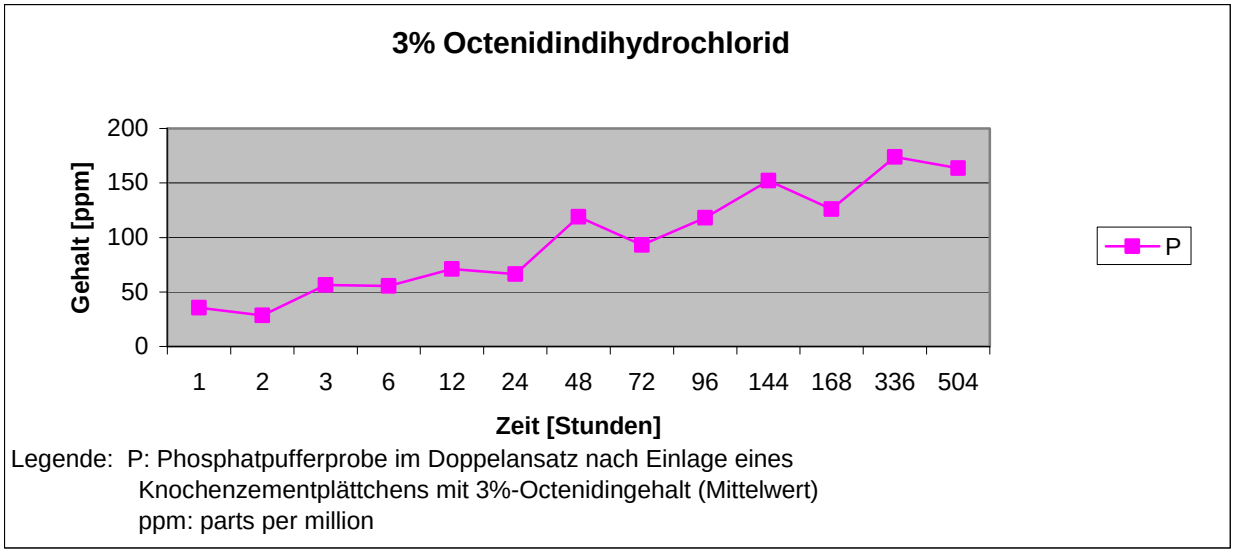


Legende: P: Phosphatpufferprobe im Doppelansatz nach Einlage eines Knochenzementplättchens mit 2%-Octenidingehalt (Mittelwert)
ppm: parts per million

Abbildung 6: Freisetzung des Wirkstoffes Octenidin aus Knochenzement in Pufferlösung über einen Zeitraum von 504 Stunden (= 3 Wochen)

3.1.3 Ergebnisse der Untersuchung der 3 %-haltigen Octenidin-Zementplättchen in Pufferlösung

Wie zu erwarten, löste sich auch in diesem Teilversuch die größte Menge des Octenidins innerhalb der ersten Stunde aus dem Zementverbund. Mit 37 ppm bzw. 34 ppm war hier eine Verdopplung der freigesetzten Menge im Vergleich zu den Zementpellets mit 2 % Wirkstoffgehalt zu finden. Im weiteren zeitlichen Verlauf war zu erkennen, dass die Pufferlösung mit den 3 %-haltigen Zementplättchen zwar höhere Octenidingehaltwerte als die Pufferlösung mit 2 %-haltigen Pellets aufwies, doch war der Unterschied nicht so groß wie zwischen der 1 %-haltigen und 2 %-haltigen Versuchsreihe. Im Endeffekt konnte aber auch hier, anhand der Abbildung 7 gut zu sehen, festgestellt werden, dass mit zunehmender Einlagerungszeit im Phosphatpuffer sich auch mehr Octenidin aus dem Palacos® löste. Die dargestellten Mittelwerte zeigen die zunehmende Abgabe des Wirkstoffes.

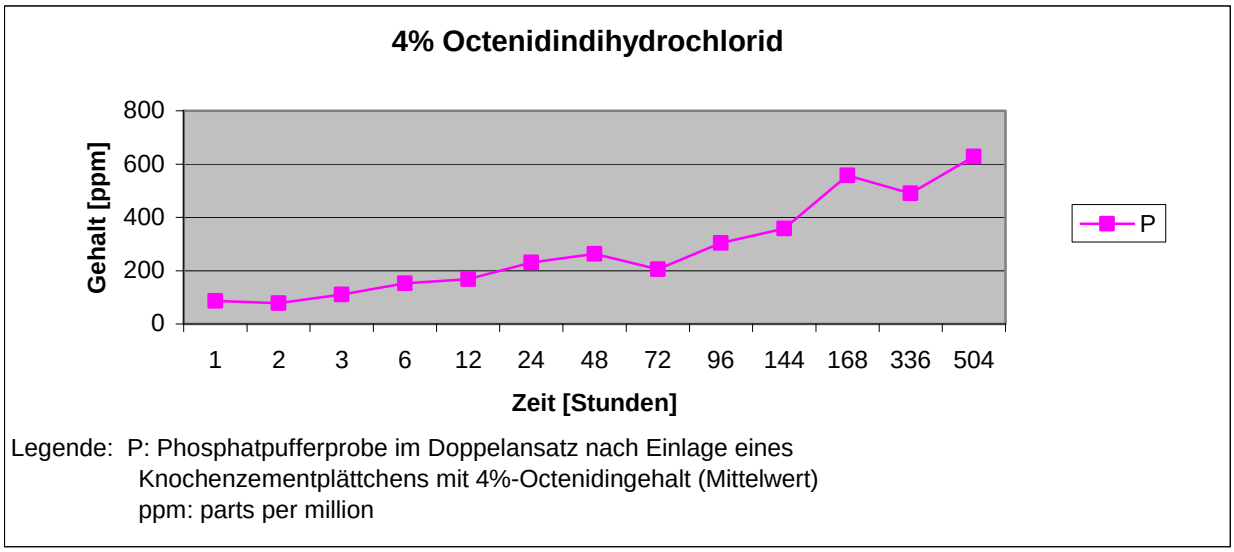


Legende: P: Phosphatpufferprobe im Doppelansatz nach Einlage eines Knochenzementplättchens mit 3%-Octenidingehalt (Mittelwert)
ppm: parts per million

Abbildung 7: Freisetzung des Wirkstoffes Octenidin aus Knochenzement in Pufferlösung über einen Zeitraum von 504 Stunden (= 3 Wochen)

3.1.4 Ergebnisse der Untersuchung der 4 %-haltigen Octenidin-Zementplättchen in Pufferlösung

Hier fand gleich in der ersten Stunde eine Freisetzung von 62 ppm bzw. 110 ppm, was einer Verdopplung bzw. Verdreifachung der Höchstwerte aus der Versuchsreihe mit 1 %-haltigen Zementplättchen entspricht. In den folgenden Stunden wurde umgerechnet deutlich weniger pro Stunde freigesetzt. Nach einer Einlage von 2 bis 3 Wochen zeigte sich in dem Phosphatpuffer ein Octenidingehalt von 336 ppm bis 785 ppm, was eine lokale zeitabhängige Ausschwemmung des Wirkstoffes auch nach Wochen gut verdeutlicht. In der Abbildung sind die Mittelwerte dargestellt.



Legende: P: Phosphatpufferprobe im Doppelansatz nach Einlage eines Knochenzementplättchens mit 4%-Octenidingehalt (Mittelwert)
ppm: parts per million

Abbildung 8: Freisetzung des Wirkstoffes Octenidin aus Knochenzement in Pufferlösung über einen Zeitraum von 504 Stunden (= 3 Wochen)

3.2 Agardiffusions-Test

Die Auswertung des Agardiffusionstest zeigte in keinem Versuchsansatz mit Antiseptikazusatz eine Hemmung des Bakterienwachstums, unabhängig von Bakterienspezies und Wirkkonzentration im Knochenzement (Abbildung 9).



Abbildung 9: Nicht vorhandene Hemmwirkung des Octenidinhaltigen Zementplättchens am Beispiel von *Staphyolcoccus epidermidis* im Agardiffusions-Test

Die parallel durchgeführte Versuchsreihe mit Palacos® R mit Refobacin-Zusatz zeigte die in der Literatur häufig beschriebene Hemmung des Bakterienwachstums mit dem deutlich erkennbaren Hemmhof (Abbildung 10).

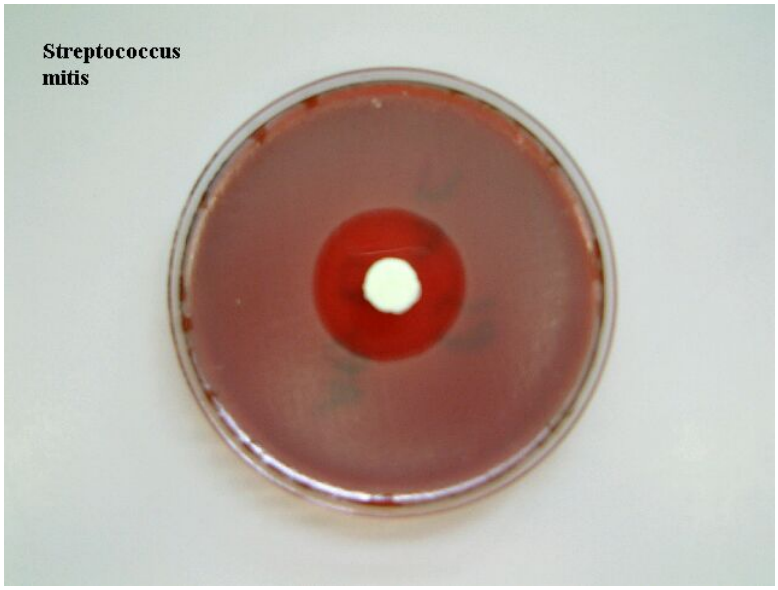


Abbildung 10: Typischer Hemmhof bei Verwendung von Refobacin-Palacos® am Beispiel von *Streptococcus mitis* im Agardiffusions-Test

Diese Vorversuche zeigten, dass CASO-Blutplatten allein nicht zur Visualisierung der Hemmwirkung von Octenidin-haltigem Knochenzement geeignet sind. Eine mögliche Erklärung ist eine andere Art der Abgabe des Wirkstoffs Octenidin aus dem Palacos-zement im Vergleich zu Antibiotika, die mit der unterschiedlichen Polarität der Wirkstoffe zusammenhängen mag.

Zudem liegt bei dem Konzept des Agardiffusionstest der Zementkörper nur mit einer Seite auf der mit Bakterien bestrichenen Oberfläche der CASO-Blutplatte, womit eine gleichmäßige Wirkstoffabgabe nicht gewährleistet ist. Im menschlichen Körper aber ist der Zement auf allen Seiten umgeben von Flüssigkeiten, in denen sich die Keime verbreiten können.

Es war nun die Frage, welches Testkonzept sich zur Überprüfung der Wirksamkeit eignete und gleichzeitig die biologischen Gegebenheiten im menschlichen Körper widerspiegelt.

Die Überlegungen führten zu dem Testkonzept eines Bioassays, bei dem die Trägerlösung die Zementpellets als flüssiges Medium umgibt. Hierbei ist der Zementkörper ständig von der Suspension umgeben und kann den enthaltenen Wirkstoff gleichmäßig abgeben. Als Trägerlösung wurde CASO-Bouillon gewählt, in welcher Bakterien ähnliche Fortpflanzungsbedingungen wie auf den bereits etablierten CASO-Blutplatten haben.

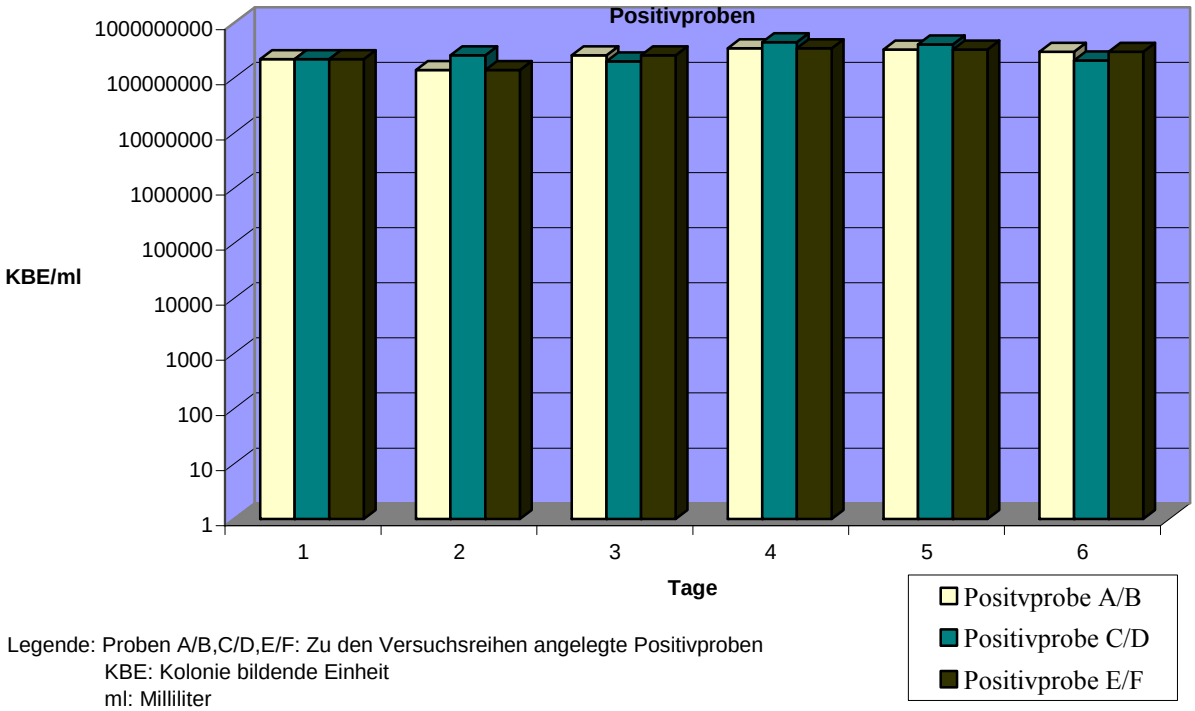
Das im Weiteren beschriebene und weiter oben schon vorgestellte Testkonzept mit CASO-Bouillon als Trägerlösung stellte sich nach zahlreichen Testversuchen als geeignet heraus. Zudem entspricht es den biologischen Gegebenheiten im Körper eher als das Agardiffusions-Testkonzept.

Als Testkeime wurden repräsentativ grampositive und gramnegative Erreger gewählt, die häufige Protheseninfektionen auslösen. Außerdem wurde der anfänglich verwendete *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) durch *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ersetzt, der aufgrund vieler bekannter Antibiotikaresistenzen als Problemkeim gilt.

3.3 Bioassay

Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Staphylococcus aureus* , *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus mitis* und *Pseudomonas aeruginosa* in Abhängigkeit von der Versuchsdauer und der Wirkstoffkonzentration

In den Abbildungen 11 und 12 ist am Beispiel der Versuchsreihe mit dem Bakterium *Staphylococcus aureus* das Bakterienwachstum in der Positivprobe und Negativprobe dargestellt. Zu erkennen ist in der Positivprobe das ungehemmte Bakterienwachstum mit einer Anzahl $>10^8$ KBE. In der Negativprobe ist wie erwünscht kein Wachstum erfolgt, was die Sterilität der verwendeten CASO-Bouillon vor dem Zufügen der Bakterien bestätigt. Diese Untersuchung wurde vor jeder Versuchsreihe neu überprüft und zeigte in allen Versuchsreihen gleiche Ergebnisse. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird auf die Darstellung der Positivproben- und Negativprobenergebnisse vor den einzelnen Versuchsreihen verzichtet und an dieser Stelle exemplarisch dargestellt.



Legende: Proben A/B,C/D,E/F: Zu den Versuchsreihen angelegte Positivproben
KBE: Kolonie bildende Einheit
ml: Milliliter

Abbildung 11: Dargestellt ist am Beispiel von *Staphylococcus aureus* das ungehemmte Bakterienwachstum in der Positivprobe, welche vor jeder Versuchsreihe neu angesetzt wurde

Tabelle 3: Kultivierungsergebnis der Negativprobe, welche zur Überprüfung der Sterilität der Trägerlösung vor jeder Versuchsreihe neu angesetzt wurde (am Beispiel der Versuchsreihe *Staphylococcus aureus*)

Negativproben zur Versuchsreihe *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

Teilversuch A/B		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

Teilversuch A/B		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

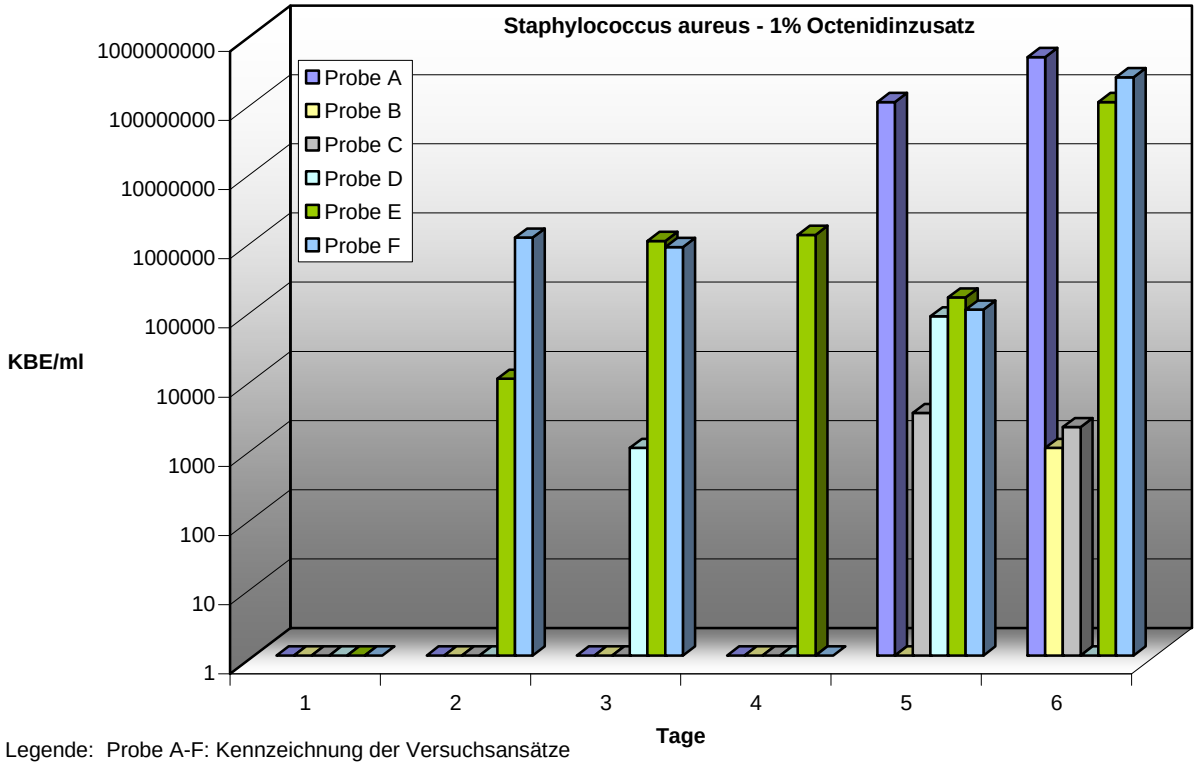
Teilversuch A/B		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

Versuchsreihe A/B vom 07.-13.7., C/D vom 25.-31.08., E/F vom 06.-13.09.2003
OD: Optische Dichte im Spektralphotometer
KBE/ml: Koloniebildende Einheiten pro Milliliter Bakteriensuspension
ATCC: American Type Culture Collection

3.3.1 *Stapyhlococcus aureus* -Wachstum bei 1 % Octenidingehalt

Von den Probenansätzen mit 1 % Octenidin-Zusatz wurde in 5 von 6 Proben am ersten Tag das Bakterienwachstum komplett gehemmt. In einem Ansatz hatten sich die Staphylokokken-Spezies nahezu ungehemmt vermehrt, so dass ein Auszählen der KBE nicht möglich war. An den folgenden Tagen wurde das Wachstum der Bakterien deutlich weniger gehemmt. Es zeigten sich immer wieder komplette Wachstumshemmungen, doch in der Mehrzahl kam es nur zu einer deutlichen Reduzierung des Bakterienwachstums im Vergleich zu den Positivproben.

Am letzten Tag waren insgesamt 3 Lösungen dabei, bei denen im Vergleich zur Positivprobe nur ein leichter bis kein wachstumshemmender Einfluss auf die Staphylokokken nachgewiesen werden konnte. Die anderen 3 zeigten kein oder reduziertes Wachstum. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 veranschaulicht.

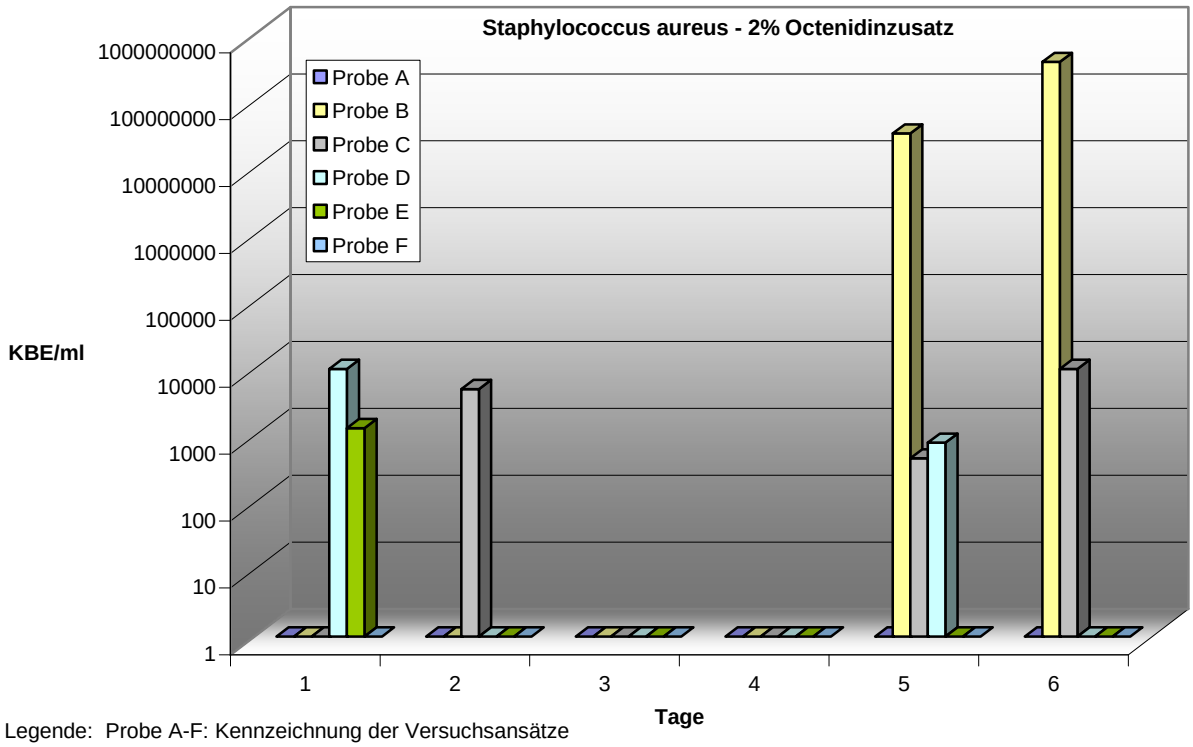


Legende: Probe A-F: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 12: Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) bei einem Octenidinanteil von 1 % über einen Zeitraum von 6 Tagen

3.3.2 *Stapyhlococcus aureus* -Wachstum bei 2 % Octenidingehalt

Bei den Knochenzementplättchen mit 2 % Octenidin-Zusatz waren am 1.Tag zwei Ausreißer mit nur zur Hälfte gehemmtem Bakterienwachstum, am 2.Tag war noch einmal eine Probe mit einer Reduktion nur um $\log^5$ Stufen aufgetreten. Am 3. und 4. Tag war in allen 6 Proben eine komplette Wachstumsunterdrückung zu verzeichnen. An den Tagen 5 und 6 wurde in einigen Proben zum Teil reduziertes Wachstum festgestellt, der Großteil der Versuchsansätze zeigte aber eine vollständige Abtötung der Bakterien.
Wie auch in der Abbildung 13 zu erkennen, zeigt sich im Vergleich zu den Proben mit 1 % Octenidingehalt insgesamt eine deutlich größere Hemmung des Bakterienwachstums.

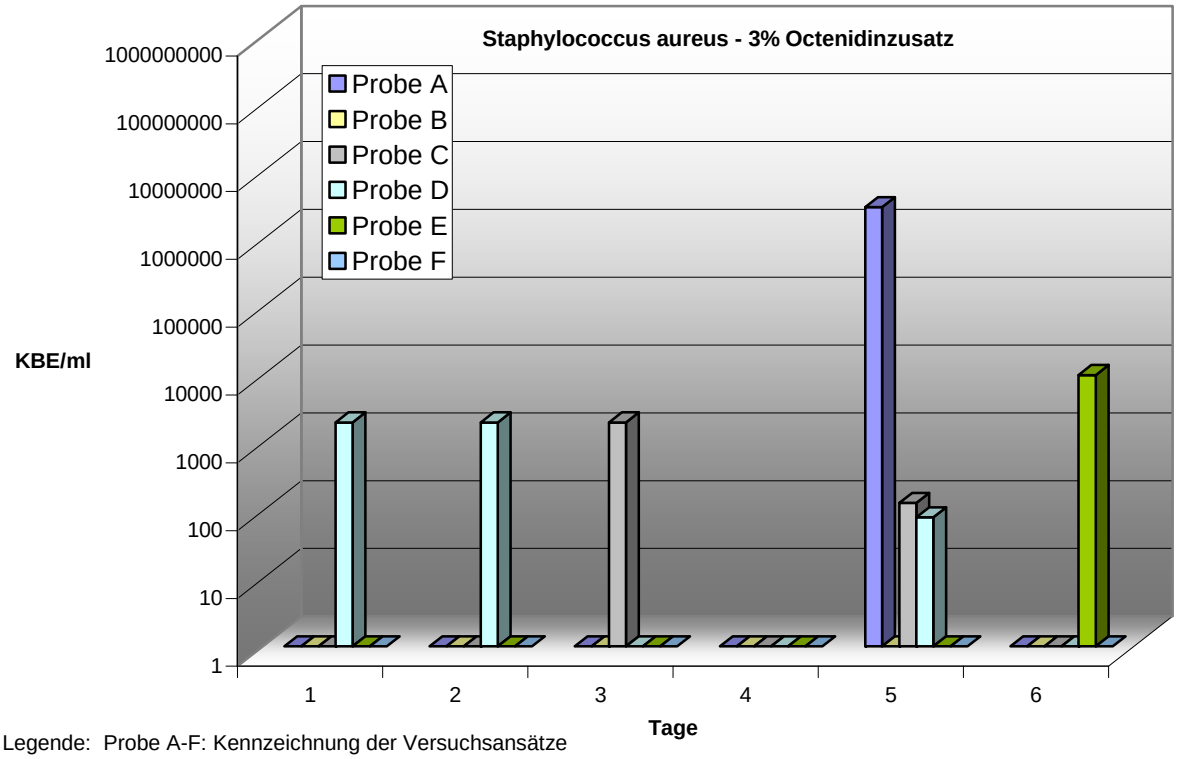


Legende: Probe A-F: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 13: Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) bei einem Octenidinanteil von 2 % über einen Zeitraum von 6 Tagen

3.3.3 *Stapyhlococcus aureus* -Wachstum bei 3 % Octenidingehalt

Bei Zugabe von 3 % Wirkstoff zum Knochenzement Palacos® konnte in 2 von 6 Proben über die gesamte Versuchsdauer von 6 Tagen ein Wachstum des *Staphylococcus aureus* unterdrückt werden, in 2 weiteren Proben fand nur einmal am 5. und am 6. Tag ein reduziertes Wachstum von 10^4 KBE/ml und 10^6 KBE/ml (Positivprobe 10^8 KBE/ml) statt. In den anderen Ansätzen war nur eine inkomplette Wachstumshemmung zu finden.
Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 14 zusammengefasst dargestellt.

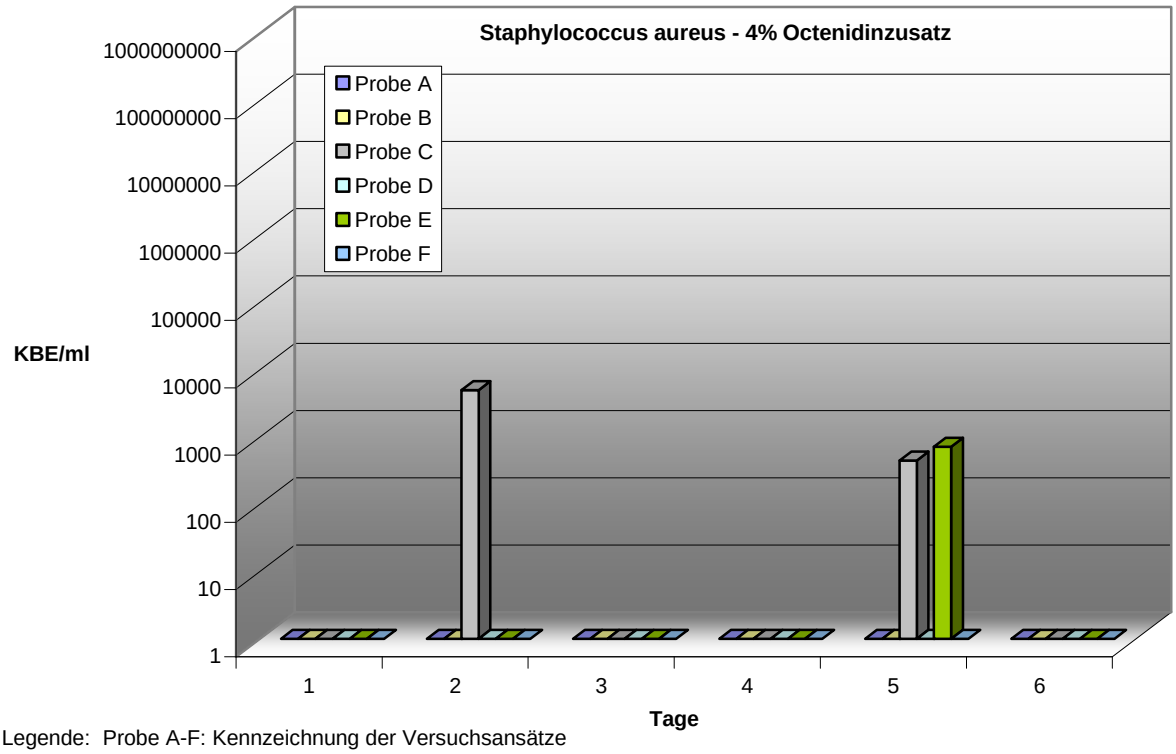


Legende: Probe A-F: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 14: Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) bei einem Octenidinanteil von 3 % über einen Zeitraum von 6 Tagen

3.3.4 *Stapyhlococcus aureus* -Wachstum bei 4 % Octenidingehalt

In der Versuchsreihe mit 4 %-haltigen Zementplättchen konnte in 4 von 6 Proben an allen 6 Tagen eine komplette Wachstumshemmung der Staphylokokken-Spezies erreicht werden. Nur in einer Probe fand sich am 2. und 5. Tag ein Bakterienwachstum von 10^3 KBE/ml und 10^4 KBE/ml, in einer weiteren Probe am 5. Tag ein Wachstum von 10^2 KBE/ml. Das bedeutete im Vergleich zur Positivprobe ohne Hemmung der Bakterienvermehrung eine Reduktion um $\log^6$ Stufen. Wie auch in Abbildung 15 zu sehen, erzielt die höhere Wirkstoffkonzentration von 4 % eine fast vollständige Hemmwirkung auf das Bakterienwachstum.

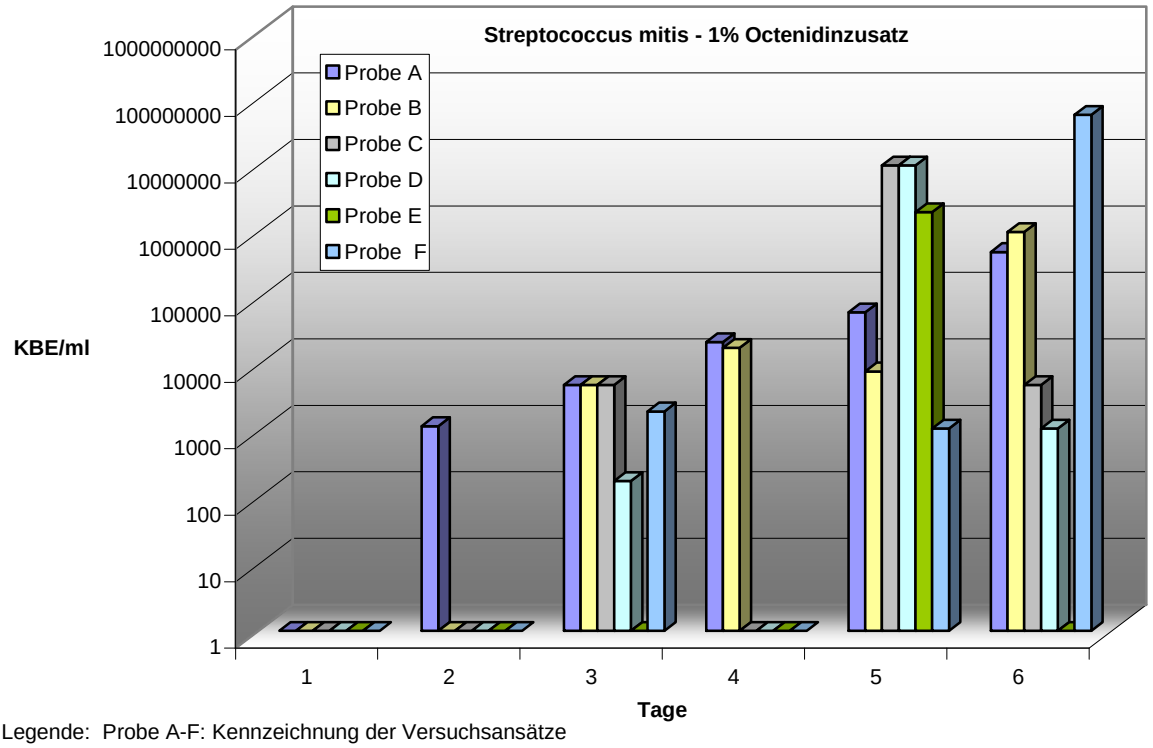


Legende: Probe A-F: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 15: Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) bei einem Octenidinanteil von 4 % über einen Zeitraum von 6 Tagen

3.3.5 *Streptococcus mitis* -Wachstum bei 1 % Octenidingehalt

Von allen Probeansätzen der Versuchsreihe wurde das Bakterienwachstum der Streptokokken-Spezies am ersten Tag komplett gehemmt.
Am 2. Tag wurden noch in 5 der 6 Ansätze alle Bakterien abgetötet, in einer Probe kam es zu einer Reduktion um $\log^3$ Stufen. An den folgenden Versuchstagen kam es zunehmend zu einer Bakterienbesiedlung der Proben, in den meisten Fällen konnte aber noch eine deutliche Hemmung im Vergleich zu der unbeeinträchtigt wachsenden Positivprobe verzeichnet werden. An den letzten 2 Tagen zeigten dennoch fast alle Proben hohes Bakterienwachstum (siehe Abbildung 16).

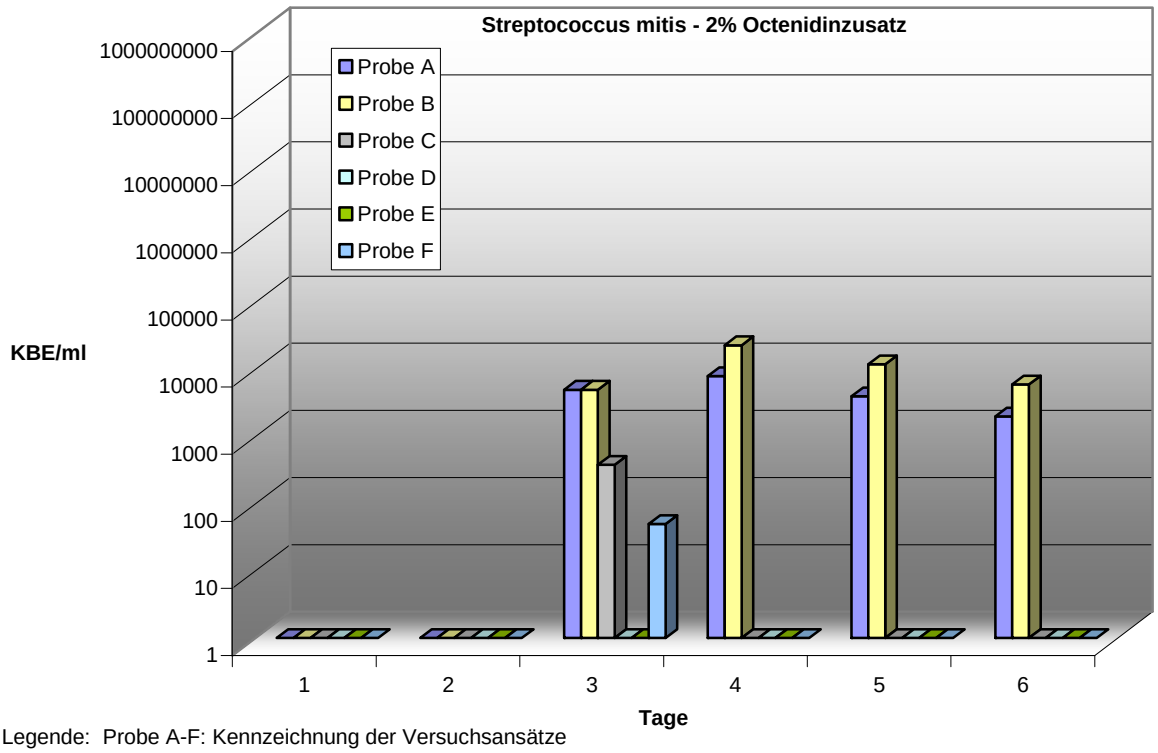


Legende: Probe A-F: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 16: Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Streptococcus mitis* (ATCC 47456) bei einem Octenidinanteil von 1 % über einen Zeitraum von 6 Tagen

3.3.6 *Streptococcus mitis* -Wachstum bei 2 % Octenidingehalt

Bei Zusatz von 2 %-Octenidin konnte in 4 Proben beinahe die gesamte Versuchsdauer hindurch das Wachstum der Streptokokken komplett gehemmt werden. Lediglich 2 Ausreißer am 3. Tag zeigten ein geringes Wachstum der Streptokokken. In den beiden restlichen Ansätzen war vom 3. Tag an nur ein um $\log^3$-bis $\log^4$-Stufen reduziertes Bakterienwachstum festzustellen.

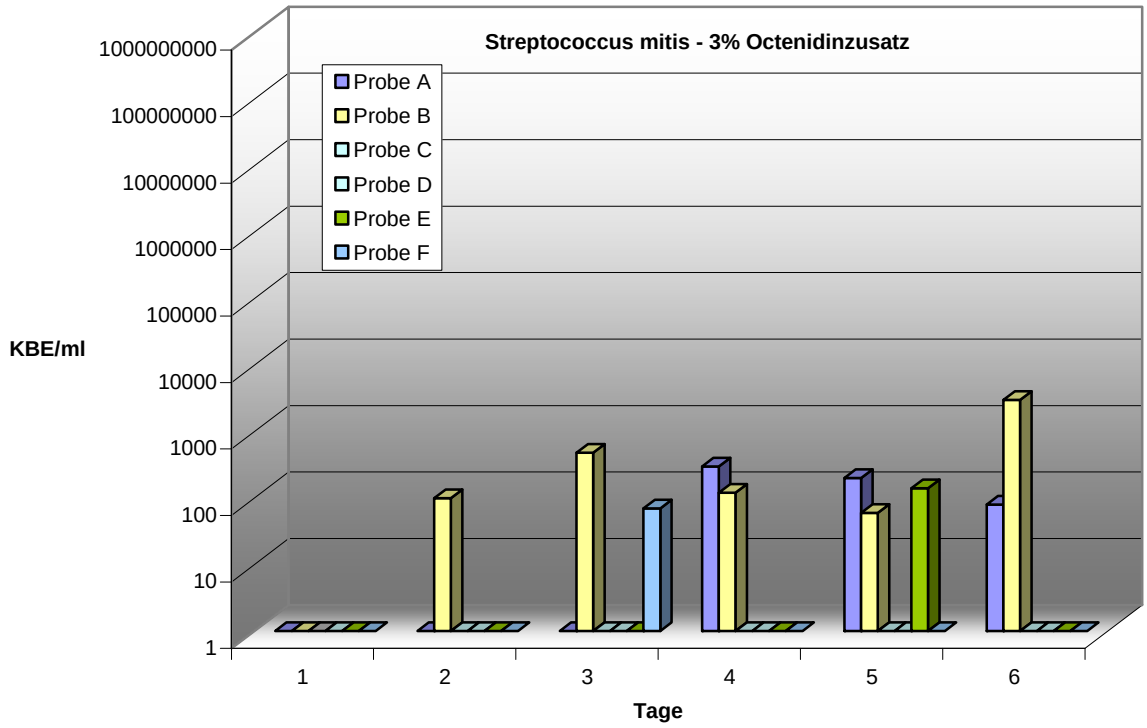


Legende: Probe A-F: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 17: Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Streptococcus mitis* (ATCC 47456) bei einem Octenidinanteil von 2 % über einen Zeitraum von 6 Tagen

3.3.7 *Streptococcus mitis* -Wachstum bei 3 % Octenidingehalt

Ähnlich war es bei Zusatz von 3 % Octenidin zum Knochenzement. In 4 Versuchsreihen waren während der 6 Tage fast alle Proben komplett keimfrei. Lediglich 2 Ausreißer mit Bakterienwachstum von 10^1 KBE/ml bis 10^2 KBE/ml waren zu finden. In den anderen beiden Versuchsansätzen wurde das Wachstum auf ca. 10^2 KBE/ml, am letzten Tag nur auf 10^3 KBE/ml reduziert. Dies entsprach im Vergleich zur Positivprobe mit 10^7 KBE/ml einer Reduktion um $\log^5$-Stufen und zeigte zumindest einen deutlichen Hemmeffekt auf das Bakterienwachstum.



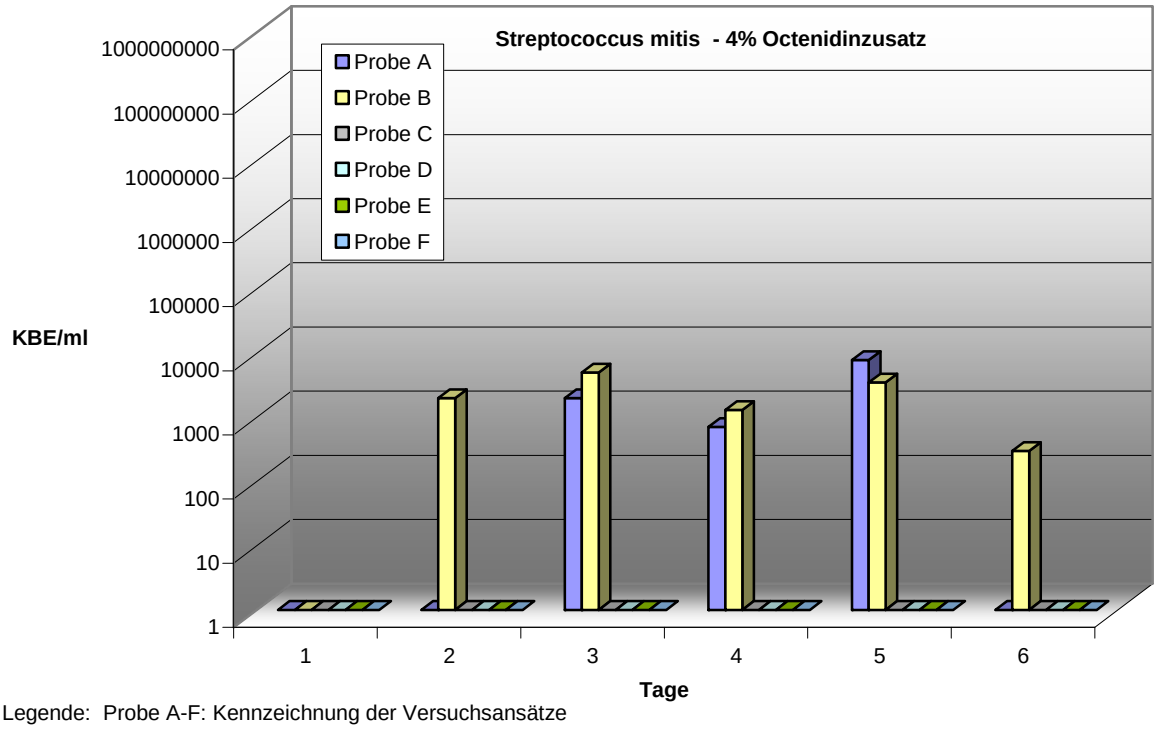
Legende: Probe A-F: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 18: Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Streptococcus mitis* (ATCC 47456) bei einem Octenidinanteil von 3 % über einen Zeitraum von 6 Tagen

3.3.8 *Streptococcus mitis* -Wachstum bei 4 % Octenidingehalt

Die Zementplättchen mit 4 % Anteil des Antiseptikums hemmten in 4 der 6 Versuchsansätzen über die komplette Versuchsdauer jegliches Streptokokkenwachstum, in den 2 anderen Versuchsreihen kam es ab dem 2. und 3. Tag zu deutlich reduziertem Wachstum.

Insgesamt wurde also bei Zusatz von 2 % oder mehr des Wirkstoffes Octenidin zu Palacos® in 4 von 6 Versuchsreihen bis auf wenige Ausnahmen das Wachstum der Streptokokken-Spezies erfolgreich unterdrückt.

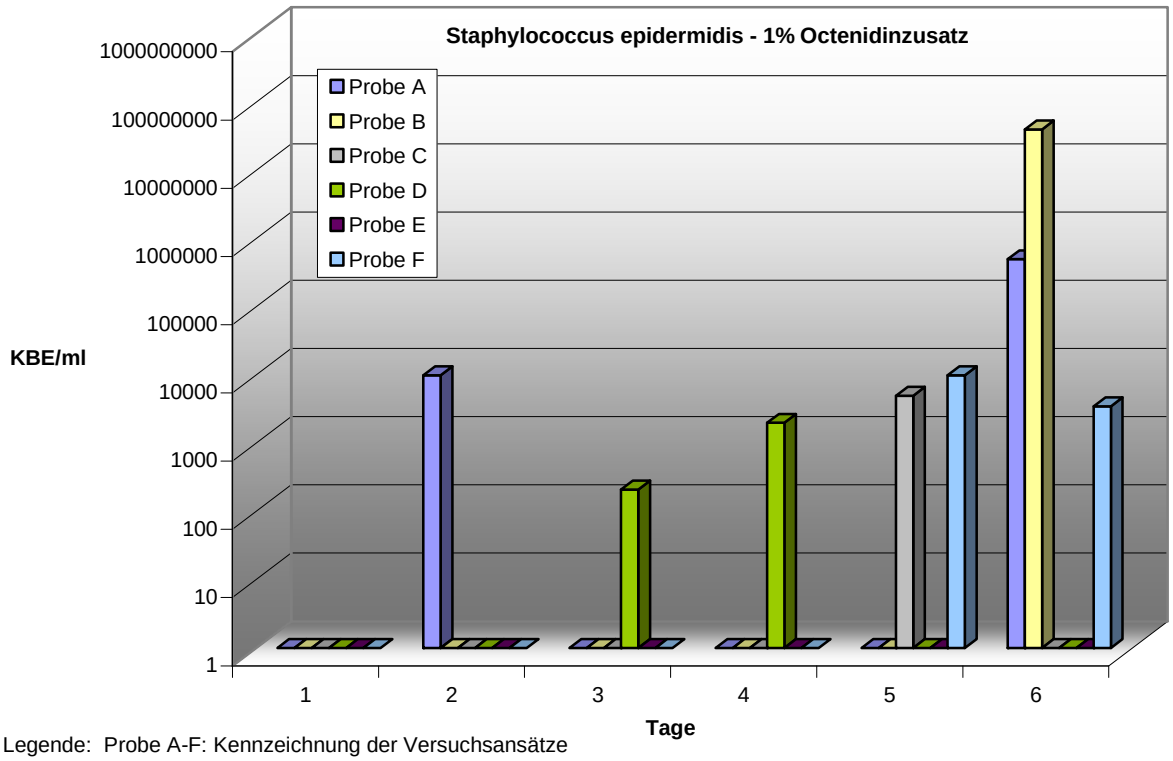


Legende: Probe A-F: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 19: Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Streptococcus mitis* (ATCC 47456) bei einem Octenidinanteil von 4 % über einen Zeitraum von 6 Tagen

3.3.9 *Staphylococcus epidermidis* -Wachstum bei 1 % Octenidingehalt

In der Versuchsreihe mit 1%-Octenidingehalt in den Zementplättchen zeigte sich nach dem ersten Tag in keiner der 6 Probenansätze ein Bakterienwachstum, am 2. Tag nur in einer Probe ein reduziertes Wachstum von 10^4 KBE/ml. Gleichzeitig waren in der Positivprobe 10^8 KBE/ml der Streptokokken gewachsen. Auch an den folgenden Tagen kam es nur zu vereinzeltem Wachstum in den Proben. Erst zum Ende der Versuchsdauer zeigte sich zwar in fast der Hälfte eine Bakterienbesiedlung, jedoch immer noch deutlich reduziert im Vergleich zu dem ungehemmten Wachstum in der Positivprobe.

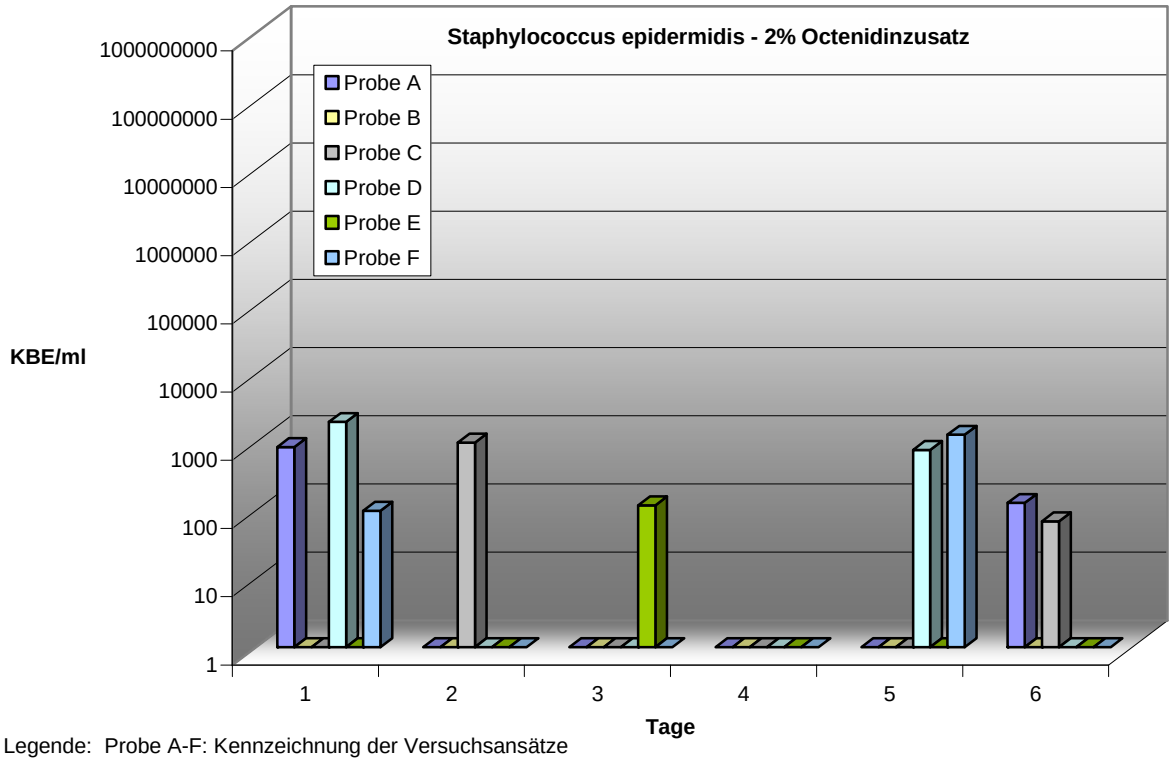


Legende: Probe A-F: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 20: Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) bei einem Octenidinanteil von 1 % über einen Zeitraum von 6 Tagen

3.3.10 *Staphylococcus epidermidis* -Wachstum bei 2 % Octenidingehalt

Bei der Versuchsreihe mit 2 % Wirkstoffgehalt fand am ersten Tag in 3 von 6 Reagenzgläsern eine Reduktion um $\log^5$-Stufen bzw. $\log^6$-Stufen statt, in dem Rest eine komplette Wachstumshemmung. Am 2. und 3. Tag war in je einer Probe ein reduziertes Bakterienwachstum zu finden, am 4. Tag wurde in allen Ansätzen eine vollständige Abtötung erreicht. An den letzten Tagen kam es in jeweils 2 unterschiedlichen Proben zu einem stark reduzierten Wachstum, alle anderen Reagenzgläser waren keimfrei.

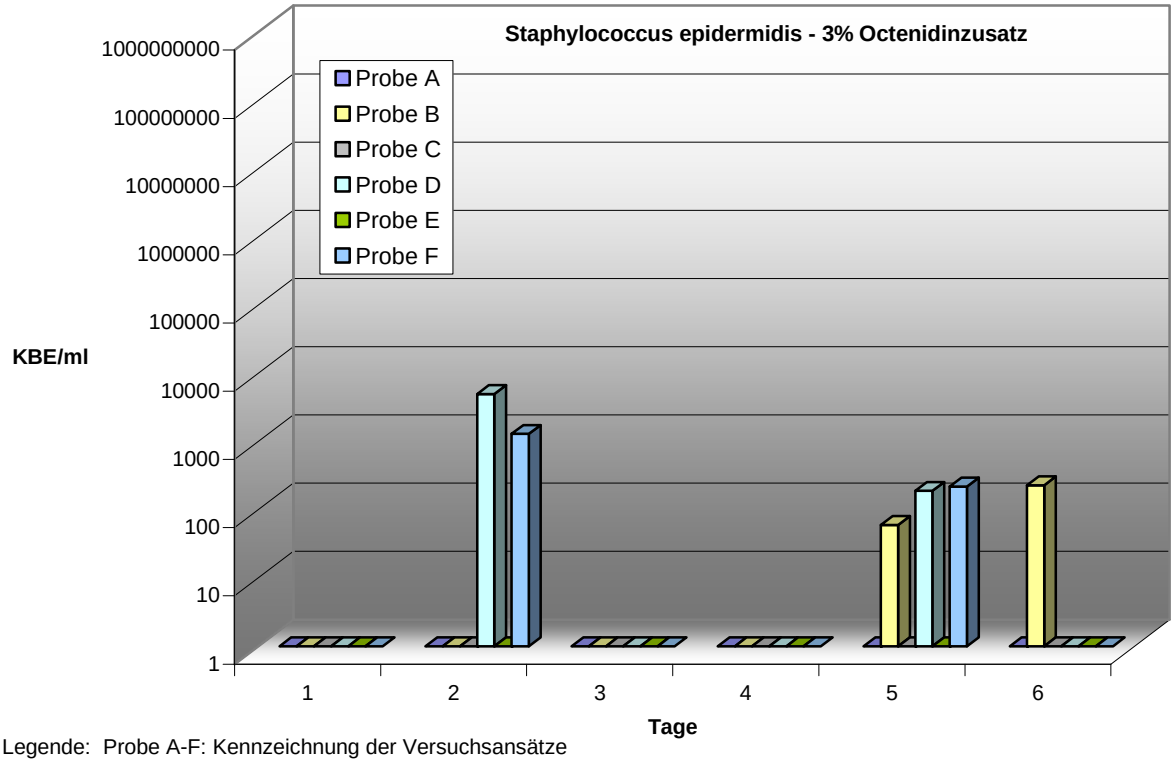


Legende: Probe A-F: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 21: Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) bei einem Octenidinanteil von 2 % über einen Zeitraum von 6 Tagen

3.3.11 *Staphylococcus epidermidis* -Wachstum bei 3 % Octenidingehalt

Bei Zusatz von 3 % Octenidin zum Knochenzement gab es während der ersten 4 Tage insgesamt 2 Proben am 2. Tag mit Bakterienwachstum, in allen anderen Ansätzen wurde die Bakterienvermehrung komplett gehemmt. Am 5. Tag kam es in 3 Ansätzen zu einem Wachstum zwischen 10^1 KBE/ml und 10^2 KBE/ml, was einer Reduzierung zur Positivprobe um $\log^6$ bzw. $\log^7$ bedeutet. Am letzten Tag war eine Probe mit 10^2 KBE/ml leicht bewachsen, die anderen 5 waren frei von Bakterien.

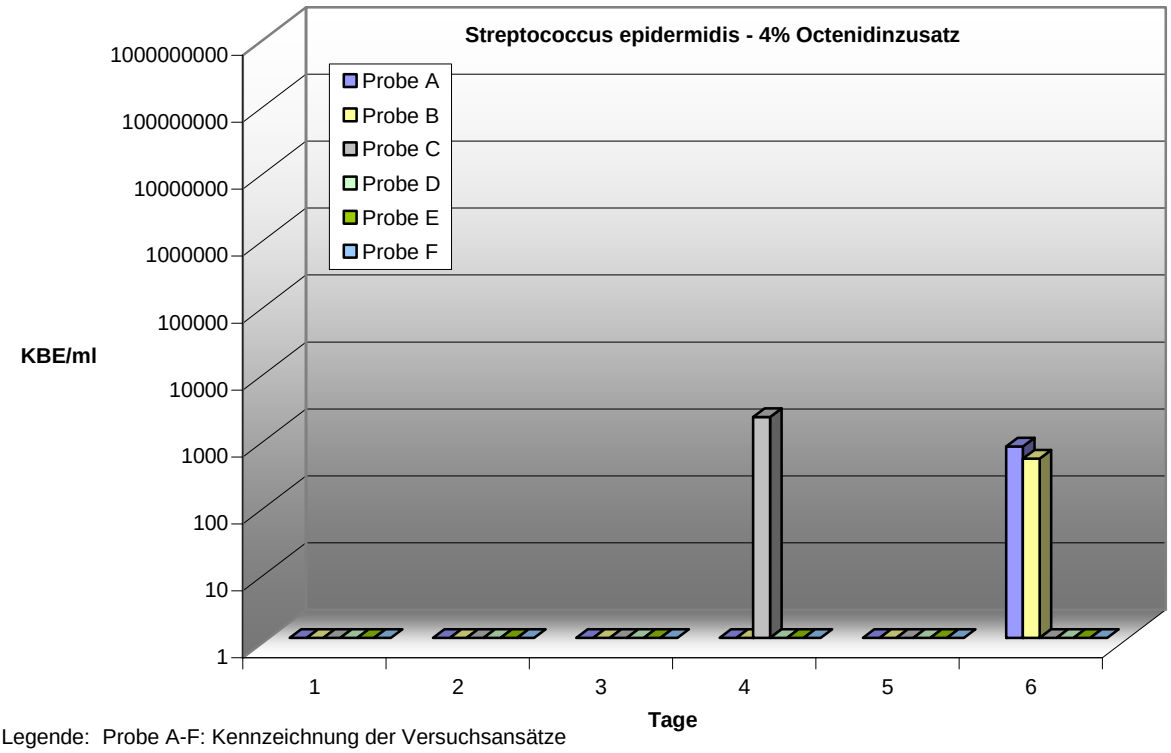


Legende: Probe A-F: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 22: Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) bei einem Octenidinanteil von 3 % über einen Zeitraum von 6 Tagen

3.3.12 *Staphylococcus epidermidis* -Wachstum bei 4 % Octenidingehalt

Bei der Versuchreihe mit Zementplättchen mit 4 % Wirkstoffgehalt wurde in der Hälfte aller Proben über die gesamte Versuchsdauer eine komplette Wachstumshemmung erreicht, in der anderen Hälfte waren insgesamt 3 Proben mit Bakterienwachstum vorhanden (am 4. Tag einmal 10^3 KBE/ml, am 6. Tag zweimal 10^2 KBE/ml).
Es zeigte sich auch in dieser Versuchsreihe, dass mit steigender Wirkstoffkonzentration im Palacos® das Bakterienwachstum zunehmend gehemmt wurde.

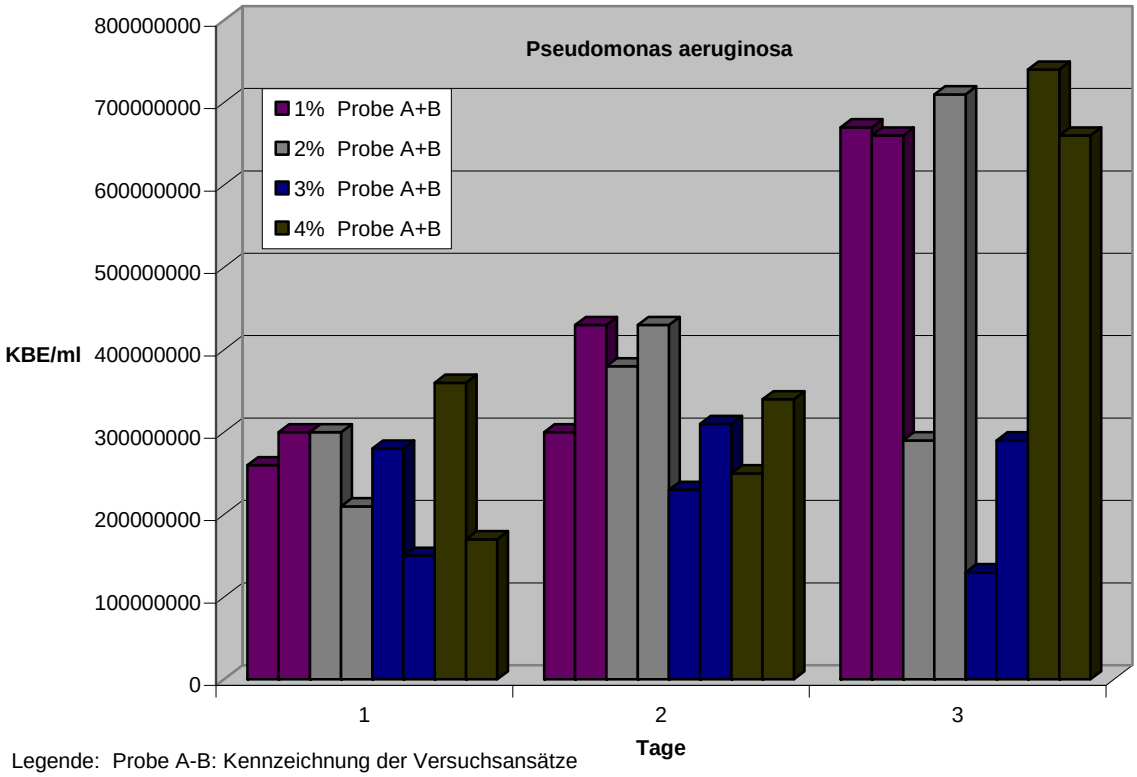


Legende: Probe A-F: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 23: Auswirkung des Zusatzes von Octenidin zu dem Knochenzement Palacos® auf die Bakterienspezies *Staphylococcus epidermidis (ATCC 12228)* bei einem Octenidinanteil von 4 % über einen Zeitraum von 6 Tagen

3.3.15 *Pseudomonas aeruginosa* –Wachstum bei 1-4 % Octenidingehalt

In diesen Versuchsreihen war in keinem Ansatz ein relevant hemmender Effekt auf das Wachstum der Pseudomonas-Spezies festzustellen, unabhängig von der Höhe der beigemischten Wirkstoffkonzentration. So fanden sich vom ersten Tag an in allen Reagenzgläsern in etwa gleich hohe Bakterienanzahlen (10^8 KBE/ml). Im Vergleich zur Positivprobe fand keine signifikante Reduktion des Bakterienwachstums statt.
Nach dem 3. Tag wurde daher das Experiment mit *Pseudomonas aeruginosa* abgebrochen.



Legende: Probe A-B: Kennzeichnung der Versuchsansätze
KBE: Kolonie bildende Einheiten
ml: Milliliter

Abbildung 24: *Pseudomonas aeruginosas* -Wachstum bei 1-4 % Octenidingehalt

Bei allen Versuchsansätzen war die Negativprobe zur Überprüfung der Sterilität der Trägerbouillon negativ, die Ausgangsbakteriensuspensionen befanden sich alle im Bereich von 10^6 KBE/ml. Alle Daten sind den Tabellen im Anhang zu entnehmen.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den Messungen der HPLC zeigte sich, dass es zu einer deutlich messbaren Ausscheidung des Wirkstoffes Octenidin aus dem Knochenzement Palacos® kommt.
Dabei zeigte sich in den ersten Stunden quantitativ eine höhere Wirkstoffabgabe. Die Höhe der ausgeschiedenen Menge war dabei von der Wirkstoffkonzentration im Knochenzement abhängig. Auch nach längerer Zeit fand noch eine gut messbare Ausscheidung des Wirkstoffs aus dem Zementverbund statt.
Analog dazu zeigte sich im Bioassay bei den Bakterienstämmen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* und *Streptococcus mitis* vor allem in den ersten Tagen und bei Verwendung höherer Octenidinkonzentrationen eine sehr gute bakterizide Wirkung, zum Teil über die gesamte Dauer der Versuchreihe.
Auf das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* konnte keine deutliche Hemmwirkung festgestellt werden.

4. Diskussion

4.1 Fehlerdiskussion

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten eine eindeutige Ausscheidung des Wirkstoffes Octenidin aus dem Knochenzement Palacos®. Auch die bakterizide Wirkung auf *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis* und *Staphylococcus epidermidis* ließ sich bei hohen Wirkstoffkonzentrationen eindeutig nachweisen. Auf *Pseudomonas aeruginosa* war nur eine geringe Wachstumshemmung festzustellen.

Trotz standardisierter Untersuchungsmethoden gab es in verschiedenen Messreihen einige Ausreißer in der Auswertung. So ließ sich in der HPLC-Untersuchung zwar eine eindeutige Tendenz erkennen, bei der die Wirkstoffausscheidung mit Einliegezeit und Wirkstoffkonzentration korreliert, doch fanden sich immer wieder Ergebnisse, die nicht in den Verlauf der Ausscheidung passten. Sicherlich ist die Ausscheidung des Octenidin aus dem Knochenzement Palacos® von mehreren Faktoren abhängig. Falsche oder unzureichende Vermischung des Zementpulvers mit dem Octenidinpulver hat eine inhomogene Verteilung im Zementverbund und somit eine unterschiedliche Ausscheidung des Wirkstoffes zur Folge. Auch Lufteinschlüsse oder Verformungen der Zementpellets haben Auswirkungen auf das Ausscheidungsmuster. Dies sollte jedoch durch Aussortieren von Zementplättchen, die in Form oder in Gewicht um mehr als 5 % abwichen, vermieden werden. Obwohl die HPLC-Messungen extern durchgeführt wurden, sind Messfehler zwar nicht anzunehmen, aber letztendlich nicht auszuschließen. Eine unbekannte Variable ist der bisher nicht eindeutig geklärte Ausscheidungsmechanismus.

Auch bei den Bioassay-Untersuchungen fanden sich in einigen Fällen Ausreißer. So kam es in manchen Proben mal zu fast ungehemmtem Bakterienwachstum, dann am Folgetag aber bei gleichem Zementplättchen und gleicher Keimkonzentration in der Bakteriensuspension zu teilweise komplettem Abtöten der Bakterien. Grund für diese Fehlmessungen könnte unsteriles Arbeiten oder Probenverwechslung gewesen sein. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass in den Ausreißerfällen sich in einem Teil des Reagenzglases ein Bakteriensediment gebildet hat, welches von der antibakteriellen Wirkung des Zementplättchens unberührt blieb. Erst bei der Durchmischung auf dem Vibrationsschüttler kann es dann zur Verteilung der Bakterien gekommen sein und zur anschließenden Fehlmessung in der Auszählung der kultivierten Probe. Eine Kontamination mit Fremdkeimen fand in keiner Versuchsreihe statt, ebenso wenig waren

in allen Versuchsreihen weder die Positiv- noch die Negativproben durch falsches Wachstum auffällig.

4.2 Ergebnisdiskussion

In beinahe allen Versuchen des Bioassays gelang eine vollständige Abtötung der Kokkenstämme innerhalb des ersten Untersuchungstages, unabhängig von der Wirkstoffkonzentration. Im weiteren zeitlichen Verlauf konnte bei niedrigerem Octenidingehalt (1-2 %) eine Wachstumshemmung der Bakterien festgestellt werden. Bei 3-4 %igem Anteil des Antiseptikums wurde bis auf wenige Ausnahmen über die gesamte Versuchsdauer von 7 Tagen eine vollständige Abtötung der Kokken erreicht. In einzelnen Versuchsansätzen wurde auch bei den niedrigeren Konzentrationen über die gesamte Dauer eine konstante bakterizide Wirkung erreicht. In abnehmender Reihenfolge war die Wirkung auf die grampositiven Erreger am besten auf *Staphylococcus epidermidis* > *Staphylococcus aureus* > *Streptococcus mitis*.

Bei den Pseudomonaden konnte nur eine Reduzierung des Wachstums erreicht werden. Im Vergleich zu der Positivprobe mit ca. $8x10^8$ KBE/ml, bei der die Bakterien ungehemmt wachsen konnten, fanden sich bei den Proben mit Octenidin-haltigen Zementplättchen ca. $1\text{-}3x10^8$ KBE/ml. In den folgenden Tagen war dann fast kein Unterschied mehr festzustellen. Die Pseudomonaden wuchsen am 3. Tag in allen Proben in ähnlichen Größenordnungen, unabhängig davon, ob Wirkstoff beigefügt war oder nicht. Es bestand also konzentrationsabhängig eine gute Wirkung auf Staphylokokken und Streptokokken, aber eine schlechte Wirkung auf die Pseudomonaden. Ein solches gemischtes Wirkprofil des Antiseptikums Octenidin konnte auch in einer anderen Studie gezeigt werden: Die Zugabe von Octenidin in Form von Octenisept® auf verschiedene Wundauflagen wirkte sich in einem Agardiffusionstest auf *Staphylococcus aureus* in allen Fällen bakteriostatisch, aber nur in der Hälfte der Versuche bakterizid aus. Die Wirkung auf *Pseudomonas aeruginosa* beschränkte sich auf eine Bakteriostase in der Hälfte der Fälle, eine Bakterizidie konnte in keinem Versuch nachgewiesen werden. Dabei korrelierte die antibakterielle Wirkung des Antiseptikums mit der Höhe der Freisetzung aus den Wundauflagen sowie mit der Höhe der Octenidinkonzentration [13].

Eine weitergehende Studie darüber, ob höhere Konzentrationen von Octenidin im Palacos® eine bessere Wirkung auf die Pseudomonaden-Spezies erzielen, war Gegenstand

einer Studie von Weckbach. Doch auch hier zeigten höhere Wirkstoffkonzentrationen keine bessere Wirkung auf *Pseudomonas aeruginosa*.

Die Ergebnisse der HPLC-Messung bestätigten ebenfalls eine deutlich messbare Ausscheidung des Octenidins. Bei allen 4 Konzentrationen war dabei die Freisetzung innerhalb der ersten Stunde in Relation zur Einlegedauer in die Phosphatpufferlösung am höchsten. Dies entspricht der im Bioassay gemachten Beobachtung, dass auch bei niedrigem Wirkstoffgehalt die Abgabe beim ersten Kontakt mit der Bakteriensuspension so hoch ist, dass am ersten Versuchstag bis auf wenige Ausnahmen fast alle Kokkenstämme abgetötet wurden. Dies ist in der praktischen Anwendung von großer Bedeutung, da dieser Zeitraum gerade auf die perioperative Phase fällt. Durch die offene Wunde während der Operation ist das Risiko einer Bakterienkontamination am größten. Bei Revisionsoperationen ist durch die längere OP-Dauer das Risiko dabei entsprechend höher. Es ist daher sehr wichtig, dass es gerade in dieser Phase zu der höchsten Ausscheidung des antibakteriellen Wirkstoffs kommt und mögliche Erreger sofort eliminiert werden.

Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigte sich in der HPLC-Untersuchung, dass nach der initialen hohen Abgabe eine deutlich langsamere Ausscheidung stattfindet. So ließ sich auch nach 504 Stunden = 3 Wochen noch immer eine Steigerung der Abgabe feststellen. Dabei war die Steigerung bei den niedrigen Octenidin-Konzentrationen jedoch deutlich geringer. Die Höchstwerte der Ausscheidung nach 504 Stunden bei den 1 %-haltigen Zementplättchen waren geringer als die 1-Stunden-Werte der 4 %-haltigen Zementkörper. Damit bestätigte sich, dass ein höherer Wirkstoffgehalt mit einer höheren Wirkstoffabgabe korreliert.

4.3 Ausscheidungskinetik des Wirkstoffes

Diese Art der Abgabekinetik wurde auch in anderen Studien herausgestellt. Trompa erkannte 1981 in ihrer Arbeit „Über die Ausscheidung verschiedener Antibiotika- einzeln und in Kombination- aus dem Knochenzement Palacos®“ ein typisches Ausscheidungsmuster: Nachdem am ersten Tag hohe Konzentrationen im Eluat gemessen wurden, sanken diese in den folgenden Tagen sehr schnell auf niedrige Werte ab [104]. Diese Aussage stützt sich neben ihren Ergebnissen auf zahlreiche andere Versuche mit antibiotikabeladenem Zement [18, 19, 74, 103, 114]. Auch in diesen Studien erfolgt die höchste Freisetzung aus dem PMMA-Verbund innerhalb der ersten Stunden, gefolgt von einer langsamen, aber stetigen Abgabe kleinerer Wirkstoffmengen. Dabei ist der

Mechanismus der Abgabe nicht gänzlich geklärt. Es existieren im Wesentlichen zwei Theorien über den Freisetzungsmechanismus: einige Forscher beschreiben eine Form der Oberflächenausschüttung, bei der der zugesetzte Wirkstoff nur aus den obersten 50-100µm der Polymermatrix eluiert [69]. Eine Studie von Schurmann et al. unterstützt diese Theorie, da bei Zementstücken mit einer Dicke bis 100 µm alles enthaltene Antibiotikum freigesetzt wurde, über 100 µm hinaus jedoch die Freisetzung unabhängig von der Dicke war [94]. Eine andere Theorie vertritt das Diffusionsmodell, bei der die Porösität des Zements verantwortlich ist für die Freisetzung. Diese Meinung untermauern Studien, bei der die Zugabe von löslicher Dextrane, Lactose oder eines weiteren Antibiotikums zum Knochenzement zu einer höheren Antibiotikaelution führten [57, 79, 111]. Letztendlich wurde in einer Studie von van de Belt et al. die Abgabekinetik als eine Kombination aus Oberflächenbeschaffenheit und Porösität beschrieben, die auch den biphasischen, anfangs hohen, gefolgt von stetig-niedrigem Verlauf der Wirkstoffabgabe erklärt. Zahlreiche *in vivo* Studien konnte diese langsame Ausscheidung über Wochen bis Monate nachweisen [20, 25, 44, 68, 114], manche auch über Jahre [64].

4.4 Protheseninfektionen

Die Implantation von Prothesen gehört zu den häufigsten orthopädischen Operationen. Komplikationen wie die Infektion einer Prothese führen zu Funktionseinbußen und Schmerzen [22]. Die zu Beginn der Prothesenversorgung hohe Morbidität von 16 % bei Protheseninfektionen ist zwar Vergangenheit [45], doch auch die heutigen Infektionsraten von 0,1-3 % [1, 5, 8, 42] erfordern weiteres Handeln. Denn immer noch bedeutet die Diagnose einer infizierten Endoprothese ein schwerwiegendes Problem, das neben häufigen Revisionen, langen Liegezeiten, Dauerantibiotikabehandlungen und hohen Kosten auch eine Amputation oder den Tod des Patienten zur Folge haben kann [7, 85, 117]. Auch die weitaus häufigere Diagnose einer Prothesenlockerung, die ebenfalls Grund für eine Revision ist, steht in Zusammenhang mit Infektionen. Es wurde festgestellt, dass perioperative Maßnahmen gegen eine Infektion nicht nur zu einer Reduktion der Infektionsrate führten, sondern dass auch die Zahl der aseptischen Lockerung sank [23, 49]. Daher wurde 1979 vorgeschlagen, dass jede gelockerte Prothese bis zum Beweis des Gegenteils als infiziert angesehen werden sollte [46].

Seitdem Buchholz et al. 1970 zum ersten Mal Antibiotika zu Knochenzement hinzugefügt haben und erfolgreich eine Freisetzung antibakteriell wirksamer Substanzen nachweisen

konnten, wurden zahlreichen Studien über die Abgabe von Antibiotika aus PMMA durchgeführt. Dabei konnte eine Freisetzung der beigemischten Wirkstoffe in verschieden langer Dauer und Intensität nachgewiesen werden, jeweils in Abhängigkeit vom Knochenzement und Antibiotikum [64]. In vielen Studien wurde dabei das bereits beschriebene Agardiffusionstest-Konzept zur Überprüfung der antimikrobiellen Wirkung angewendet. In der vorliegenden Studie ließ sich mittels des Agardiffussionstests kein antimikrobieller Effekt des Antiseptikums nachweisen. In den eigenen Untersuchungen mit Einsatz des Agardiffusionstest war unabhängig von Bakterienspezies und Wirkstoffkonzentration kein Hemmhof erkennbar (siehe Abbildung 9, Seite 22). Eine mögliche Erklärung ist eine andere Art der Freisetzung des Antiseptikums aus dem Knochenzement oder eine fehlende Wirkung von Octenidin gegen die gewählten Erreger auf CASO-Blutagar.

Die Ergebnisse des durchgeführten Bioassays zeigten jedoch, dass der Wirkstoff Octenidin sich aus dem Knochenzement löst und vorhandene Bakterien abtötet oder zumindest in ihrem Wachstum hemmt. Eine besonders gute Wirkung entfaltet der freigegebene Wirkstoff dabei auf die drei untersuchten Bakterienspezies *Staphylococcus aureus, Streptococcus mitis* und *Staphylococcus epidermidis*. Diese gehören nach Untersuchungen von Dickinson et al. zu den Haupterregern von Protheseninfektionen [29]. Deutlich seltener (10-20 %) sind gramnegative Keime, z.B. aus dem Harntrakt, oder Mischinfektionen. Noch seltener sind endogene Infektionen, die durch hämatogene Streuung von anderen Fremdkörpern (z.B. Herzschrittmachern) oder anderen Infektionsherden (Ulcera, Kiefernabzsesse etc.) ausgehen können. Eine 1999 erschienene Studie von LaPorte et al. betonte allerdings auch, dass Protheseninfektionen nach Zahnbehandlungen häufiger aufträten als bisher angenommen [59]. Lange Zeit wurde daher auch Patienten mit implantierten Endoprothesen bei Zahnbehandlungen eine Antibiotikaprophylaxe empfohlen, ähnlich der Endokarditisprophylaxe bei kardialen Risikopatienten. Mehrere Studien zeigten aber in der Vergangenheit, dass diese Art der Prophylaxe nur in seltenen Fällen angezeigt ist und eine generelle Prophylaxe nicht nötig ist [88].

4.5 Die Verwendung von PMMA mit Antibiotika

Um die anfänglich hohen Infektionsraten zu senken, begannen nach den in der Literatur beschriebenen positiven Ergebnissen einige Kliniken mit der prophylaktischen Anwendung von antibiotisch wirkendem Knochenzement bei Erstimplantationen von Prothesen. Erste

Studien mit größeren Fallzahlen Ende der Siebziger Jahre bestätigten auch den Erfolg dieser Vorgehensweise. So haben Thierse, Wannske und Tscherne sowie Joseffson bei Verwendung von antibiotikabeladenem Zement eine deutliche Reduktion der Infektionsraten herausgefunden, eine 1997 von Espehaug et al. herausgebrachte Studie mit einer deutlich höheren Fallzahl und längerer Beobachtungszeit konnte dies aber nicht bestätigen [33, 49, 102, 118]. Die Untersuchungen von Pfarr und Burri ergaben in keiner der untersuchten Gruppen Infektionen [81] (siehe auch Tabelle 2, Seite 4).

Der prophylaktische Gebrauch von Knochenzement mit Antibiotika beinhaltet ebenfalls die Gefahr der Entstehung von Resistenzen. Die stetige, aber mit der Zeit abfallende Abgabe des Antibiotikums aus dem Zement erhöht die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung resistenter Erregerstämme [105, 108]. Einige Studien zeigten bereits das Wachstum von Bakterien auf antibiotikahaltigem Knochenzement [53]. In einer Untersuchung von Neut et al. fanden sich bei 3 von 12 Patienten mit einer Protheseninfektion resistente Subpopulationen auf Gentamicin-haltigem Knochenzement mit extrem hohen Gentamicin-MHK-Werten (MHK= minimale Hemmkonzentration) [73]. Zudem kann die prophylaktische Anwendung von Knochenzement mit Antibiotika zu einer Fehldiagnose in Bakterienkulturen nach Revisionen führen. Nach Powles et al. kommt es durch die Aufspaltung des Knochenzements während eines Prothesenwechsels zu einer erneuten Wirkstoffabgabe, die vorhandene Bakterien abtötet. Bei einer anschließenden Labordiagnostik würden diese Keime nicht erkannt und dies könnte zu einer Fehldiagnose führen [86]. Dass ein großer Teil der beigemischten Antibiotika im PMMA-Verbund eingeschlossen bleibt, bestätigen auch andere *in vitro* und *in vivo* Studien. Die Größenordnung der gemessenen freigesetzten Wirkstoffmenge variiert von 5-18 % [19, 25, 44, 78, 83, 103, 110], der Rest bleibt im PMMA eingeschlossen.

Auch sterile Kultivierungsergebnisse von Aspirationsproben und Gewebebiopsien aus Gelenken vor einer Revisionsoperation schließen eine Protheseninfektion nicht aus [6, 61]. Dies liegt daran, dass Mikroorganismen wie Bakterien in der Lage sind, auf jeglicher Art von Fremdmaterial im menschlichen Körper einen schleimähnlichen Biofilm zu produzieren. Grundlage sind körpereigene Makromoleküle, die sich auf der Fremdkörperoberfläche ablagern und den Oberflächenfilm, so genannten „conditioning film“, bilden. Die Bakterien nutzen diese Grundlage, um sich zu verankern und einen Verbund zu schaffen, der sie vor dem Immunsystem und systemisch zugeführten Antibiotika schützt [15, 37, 48, 101, 119]. Hier wachsen die Mikroben zwar nicht exponentiell, aber sie existieren über lange Zeit und vermehren sich langsam [27, 54]. Der Biofilm erschwert dabei auch die Diagnostik im Routinelabor [54], so dass Infektionen

übersehen werden und entweder als aseptische Lockerung therapiert werden oder unbehandelt bleiben [73]. Die Entstehung eines solchen Biofilms ist von verschiedenen Faktoren der Fremdkörperoberfläche abhängig: Oberflächenbeschaffenheit, Hydrophilie/-phobie und elektrische Ladung. Eine hydrophile, positiv geladene, glatte Oberfläche neigt weniger zur Bildung eines Biofilms [36, 87]. Die Entstehung eines solchen Biofilms ist für einige Forscher auch die Erklärung der späten, endogenen Infektionen. In einigen Fällen nach Urogenitalinfektionen oder Zahnbehandlungen finden Mikroorganismen durch den Blutkreislauf den Weg zu dem Oberflächenfilm des implantierten Fremdkörpers. Besiedlung und weitere Vermehrung führen dann zu einer späten Infektion [62, 100].

Folge einer Infektion ist damals wie heute in fast allen Fällen ein Wechsel der Prothese, unabhängig davon, ob die Prothese unzementiert oder zementiert, mit oder ohne Antibiotikazusatz eingesetzt wurde.

Bleibt die prophylaktische Verwendung antibiotischer Knochenzemente auch weiter strittig, so wird der therapeutische Nutzen weitestgehend positiv in der Literatur bewertet. Nach der Entfernung der Prothese samt Biofilm durch sorgfältiges Debridement sind hohe lokale Antibiotikaspiegel nötig, um die Infektion zu heilen. *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass zur Eradikation von Mikroorganismen, die eine Kunststoffoberfläche kolonisieren, 50-100 fach höhere Wirkstoffkonzentrationen erforderlich sind, als man nach der traditionellen Empfindlichkeitsprüfung durch die Bestimmung der MHK erwarten würde. Eingebrachter Knochenzement mit Antibiotika erreicht dabei den geforderten hohen lokalen Wirkspiegel, ohne die hohe systemische Belastung im Vergleich zu systemisch zugeführten Antibiotika [14, 60]. Auch wenn es kleine Unterschiede in den Erfolgsquoten der verschiedenen Therapieformen (Single-Stage- oder Multi-Stage-Revision) gibt, bezeugen viele Studien insgesamt dem therapeutischen Einsatz von Antibiotika-haltigen Knochenzementen eine sehr gute Effizienz [10, 12, 21, 30, 55, 72, 113, 115, 116]. Jedoch ist auch hierbei die Gefahr der erneuten Besiedlung mit Bakterien und die Ausbildung von Resistenzen gegeben und darf nicht unterschätzt werden [120]. Der Knochenzement verbleibt als Fremdkörper im Patienten und birgt ebenso die Gefahr der Biofilm-Ausbildung. Daher ist ein anderer Ansatz der Infektheilung die Verwendung von resorbierbaren Wirkstoffträgern. Mittels spezieller Imprägnierungsmethoden kann allogener oder xenogener Knochen direkt mit Antibiotika beladen werden [121]. Mit einem solchen Verbund ist die belastungsabhängige Auffüllung von infizierten Knochenhöhlen möglich, wobei durch die osteokonduktive Wirkung des Trägers auch die Neubildung des eigenen Knochens angeregt wird. Diese Transplantate produzieren deutlich höhere und länger anhaltende Wirkspiegel am Ort der Infektion als beispielsweise Knochenzement

[121, 122]. Eine neuerliche Revision mit der Reimplantation einer Prothese kann sich dadurch problemloser gestalten, verbunden mit verbesserten knöchernen Verhältnissen. Klinische Studien bestätigten eine gute klinische Wirksamkeit, Langzeitbeobachtungen in randomisierten Vergleichsstudien sind in Vorbereitung. Auch andere resorbierbare Materialien mit zum Teil besseren Freisetzungseigenschaften als PMMA sind in der Erforschung [63, 66].

Trotz aller Fortschritte in der Behandlung einer infizierten Prothese ist dennoch, nach wie vor, die beste Behandlung die Prävention einer Infektion.

Von einigen Autoren wird daher auch seit einigen Jahren die perioperative Infektionsprophylaxe in Form einer einmaligen Gabe eines Breitbandantibiotikums empfohlen [76, 106]. Verschiedene Studien belegen eine Reduktion der durchschnittlichen Infektionsrate von Protheseninfektionen durch einmalige systemische Gabe von Antibiotika [50, 52]. Laut der NIDEP-Studie aus dem Jahr 1996 wird diese Form der Prophylaxe von 80 % der Operateure in Deutschland durchgeführt [43]. Andere Untersuchungen konnten eine eindeutige Wirksamkeit dieser Prophylaxe nicht bestätigen [80]. In einer groß angelegten Studie in Skandinavien mit 22.170 Erstimplantationen von Hüftprothesen wurde über einen Zeitraum von 14 Jahren der Effekt von einer Antibiotikaprophylaxe untersucht. Ergebnis war, dass die besten Ergebnisse bei einer Kombination von systemischer und lokaler Antibiotikagabe in Knochenzement erreicht wurden. Bei alleiniger systemische Gabe besteht nach den Studienergebnissen ein insgesamt höheres Risiko sowohl für aseptische Lockerung als auch für die Infektion der Prothese [31].

Manche Autoren lasten den Studien, die eine routinemäßige Antibiotika-Prophylaxe bei Hüftgelenk-Endoprothesen empfehlen, an, dass die ohne Prophylaxe nachgewiesenen Infektionsraten inakzeptabel hoch sind und erst andere Wege gefunden werden müssten, die Infektionsrate zu senken [40].

Die Erforschung neuer Biomaterialien mit antimikrobiellen Eigenschaften hat in den USA allein ein jährliches Aufkommen von über USD 430 Millionen erreicht [65]. Ziel ist unter anderem die Entwicklung neuer Oberflächen, deren Beschaffenheit eine gute Verträglichkeit, Belastbarkeit und Gewebeintegration mit einer hemmenden Eigenschaft gegenüber Bakterienbesiedlung und Entzündungen verbindet.

Einen solchen Ansatz verfolgen auch die Studien von Alt et al. über den Zusatz von nanopartikulärem Silber zu Knochenzement [3]. Die ersten *in vitro* Studien mit 1 %-haltigem Knochenzement ergaben eine gute Wirksamkeit vor allem gegen multiresistente Keime wie MRSA und MRSE bei einer guten Biokompatibilität. In einem Teilversuch mit

humanen Osteoblasten konnte keine Zytotoxizität im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gefunden werden. Daneben konnte in einer Studie von Guggenbichler et al. mit nanopartikulärem Silber imprägnierten Kathetern eine gute antimikrobielle Wirksamkeit und Hämokompatibilität bei gleichzeitigem Fehlen jeglicher Zytotoxizität oder Thrombogenität nachgewiesen werden [38]. Ein weiterer Vorteil des nanopartikulären Silbers ist, dass bislang kein Nachweis über Resistenzen vorliegt.

Auch gegen Antiseptika vom Biguanidtyp wie Octenidin sind in der Literatur keine Hinweise für Resistenzen bei grampositiven Bakterien wie Stapylokokken und Streptokokken zu finden. Der Zellwandaufbau bei diesen häufigen Erregern von Protheseninfektionen ist derart strukturiert, dass er keine effektive Barriere gegen die meisten Antiseptika darstellt. Dies mag die Empfindlichkeit dieser Bakterien auf Wirkstoffe wie Octenidin erklären [89-91].

In verschiedenen Studien wurde lediglich für die Pseudomonas-Spezies eine geringere Empfindlichkeit auf Chlorhexidin, das am weitesten verbreitete Biguanid, festgestellt [98, 99]. Es zeigten sich insgesamt höhere MHK-Werte als bei anderen untersuchten Antiseptika. Durch die andere Zusammensetzung der Außenmembran bei gramnegativen Bakterien findet sich laut verschiedener Untersuchungen generell eine geringere Empfindlichkeit auf antibakterielle Substanzen [39, 92, 98, 107]. Untersuchungen über die Wirksamkeit gegenüber polyresistenten Erregerstämmen wie Methicillin-resistente-Staphylococcus-aureus (MRSA) und Vancomycin-resistente Enterokokken zeigten zwar eine geringere, aber immer noch gute Empfindlichkeit auf das Biguanid Chlorhexidin [2, 4, 16, 26, 47]. Auch hier ist eine ebenso gute Wirksamkeit von Octenidin zu vermuten, erste Vorversuche in unserem Labor zeigten erfolgsversprechende Ergebnisse.

Ein weiterer Vorteil einer Prophylaxe mit Antiseptika liegt in der nicht zu erwartenden Ausbildung von Kreuzresistenzen mit Antibiotika. Auch wenn seit Jahren weltweit Antiseptika zur Oberflächenreinigung, Desinfektion, Wundbehandlung etc. eingesetzt werden, findet sich in der Literatur kein signifikanter Nachweis über einen klinischen Zusammenhang mit Antibiotikaresistenzen [11, 34]. Stehen bei einer Protheseninfektion trotz Gentamicin-haltigen Knochenzements nur noch wenige andere Antibiotika zur Therapie zur Verfügung, wäre das noch offene Therapiespektrum bei Versagen einer Antiseptikaprophylaxe deutlich größer.

Die vorliegende Studie konnte erstmalig zeigen, dass mit Octenidin ein Wirkstoff gefunden werden, der sich sehr gut als Zusatz zu Knochenzement eignet- sowohl in der prophylaktischen wie auch in der therapeutischen Infektbehandlung. Es wurde ein Testverfahren entwickelt und evaluiert, welches die Ausscheidung des Wirkstoffes

quantitativ und qualitativ nachweisen konnte. Die schnelle bakterienabtötende Wirkung wird weder durch die anderen chemischen Bestandteile, noch durch die bei der Polymerisation entstehende Hitze des Palacos®- Knochenzements aufgehoben. Zudem ist nicht mit einer Ausbildung von Resistenzen zu rechnen, welches eine prophylaktische Anwendung bei jedem Eingriff mit Verwendung von Knochenzement ermöglichen könnte. Die Tabelle 3 zeigt eine Zusammenfassung der Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Präventionsmöglichkeiten.

Tabelle 3: Vor- und Nachteile verschiedener Prophylaxeformen in der Endoprothetik

Prophylaxeform	Vorteile	Nachteile	Literaturangaben
Antibiotika-haltiger Knochenzement	- über 30 Jahre Erfahrung - gute Anwendbarkeit -hoher lokaler Wirkspiegel	- Ausbildung von Resistenzen - Wirksamkeit als Prophylaxe umstritten - ständiger Fremdkörper	[14, 33, 49, 53, 60, 73, 102, 105, 108, 118]
Perioperative Antibiotikagabe	- einfache Anwendbarkeit - kostengünstig	- Wirksamkeit umstritten -Ausbildung von Resistenzen	[31, 50, 52, 80]
Nanopartikulärer Silberknochenzement	- gute Wirksamkeit auch gegen MRSA und MRSE - bisher keine Resistenzen	- keine klinische Erfahrung - teuer - ständiger Fremdkörper	[3, 38]
Antiseptika-haltiger Knochenzement	- keine Resistenzen - kostengünstig - hoher lokaler Wirkspiegel	- wenig klinische Erfahrung - ständiger Fremdkörper	[11, 34, 89-91, 98, 99]

Lassen sich die Ergebnisse dieser Studie in einem nächsten Schritt *in vivo* bestätigen, steht mit Octenidin-haltigem Knochenzement vielleicht eine neue Alternative zur Vermeidung und Behandlung von Infektionen in der Endoprothetik zur Verfügung.

5. Zusammenfassung:

Der künstliche Ersatz großer Gelenke durch Endoprothesen ist ein sehr häufig durchgeführter Eingriff in der operativen Orthopädie und nimmt aufgrund der demographischen Entwicklung unserer Gesellschaft ständig zu.

Als eine der gefürchtetsten Komplikationen gilt die bakterielle Infektion einer Endoprothese, in deren Folge es häufig zu Revisionsoperationen mit Prothesenwechsel, lang andauernder Antibiotikabehandlung und verlängertem Krankenhausaufenthalt des Patienten kommt.

Zahlreiche Untersuchungen zeigten eine Senkung der Infektionsrate durch Beimischung von Antibiotika zu Knochenzement. Aufgetretene Resistenzen und Wirksamkeitsverluste führten jedoch zunehmend zu Diskussionen über die Risiken der prophylaktischen Anwendung des antibiotisch beladenen Knochenzements.

In anderen Bereichen der Wund- oder Fremdkörperinfektion kommen neu entwickelte Wirkstoffe zum Einsatz, allen voran Antiseptika. Viele dieser Präparate besitzen ein breites antibakterielles Wirkspektrum ohne auftretende Resistenzen, eine geringe systemische Toxizität und sie haben sich in anderen medizinischen Gebieten bereits bewährt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob der Zusatz des Antiseptikums Octenidin zu handelsüblichem Knochenzement (Palacos®) eine antibakterielle Wirkung auf häufige Verursacher von Endoprotheseninfekten hat. Es sollte untersucht werden, ob und in welcher Größenordnung das Antiseptikum Octenidin aus dem Zementverbund wieder freigesetzt wird, und ob die antibakterielle Wirksamkeit erhalten bleibt.

Dazu wurden zunächst unter standardisierten Bedingungen Zementplättchen mit unterschiedlich hoher Wirkstoffkonzentration (1-4 %) hergestellt.

Im ersten Versuchsteil wurden Knochenzementplättchen mit verschieden hohen Wirkstoffkonzentrationen in Phosphatpufferlösungen gelegt. Nach unterschiedlich langer Einliegezeit wurde die Wirkstoffabgabe mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) gemessen. Die Ergebnisse der HPLC-Messung zeigten eine deutliche Wirkstoffabgabe innerhalb der ersten Stunden, wobei die Höhe mit der Octenidin-Konzentration in den Zementplättchen korrelierte. Die Abgabe nahm im zeitlichen Verlauf relativ gesehen ab, doch auch nach drei Wochen war eine Wirkstoffabgabe noch eindeutig messbar.

Im zweiten Versuchsteil wurde in einem Bioassay die antibakterielle Wirkung der Zementplättchen auf die häufigsten grampositiven Erreger von Endoprotheseninfektionen

(*Staphylococcus aureus, Streptococcus mitis, Staphylococcus epidermidis*) sowie auf das gramnegative nosokomiale Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* untersucht.

Die Ergebnisse des Bioassays verdeutlichten ebenfalls den Zusammenhang von Wirkstoffkonzentration und Wirksamkeit. Es zeigte sich bei höheren Wirkstoffkonzentrationen bei den Bakterienstämmen *Staphylococcus aureus, Streptococcus mitis* und *Staphylococcus epidermidis* eine fast vollständige Abtötung, teilweise über die gesamte Versuchsdauer von 7 Tagen.

Die Freisetzung des Wirkstoffes und damit die antibakterielle Wirkung waren gerade in den ersten Stunden am höchsten, entsprechend der perioperativen Phase in der klinischen Anwendung. In dieser Zeit besteht durch die offene Wunde die größte Gefahr der bakteriellen Kontamination der Prothese.

Auf *Pseudomonas aeruginosa* ließ sich ein schlechteres Wirkungsprofil feststellen.

Es konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass mit Octenidin ein Wirkstoff gefunden wurde, der die Polymerisation des Palacos® übersteht, nach Aushärten des Zements aus dem Verbund heraus diffundiert und seine antibakterielle Wirkung behält. Problematisch erscheint die verminderte Wirksamkeit des Octenidin auf *Pseudomonas aeruginosa*.

Sollten sich die Ergebnisse in weiterführenden *in vivo* Studien bestätigen, steht möglicherweise mit dem Zusatz von Octenidin zu Knochenzement eine neue Form der Infektionsprophylaxe und -behandlung in der Endoprothetik zur Verfügung.

6. Literatur:

1. Ahnelt L HP, Malchau H, Andersson GB: Prognosis of total hip replacement. A swedish multicenter study of 4664 revisions. Acta Orthop Scand Suppl 238: 1-26 (1990)
2. Alqurashi AM, Day MJ, Russell AD: Susceptibility of some strains of enterococci and streptococci to antibiotics and biocides. J Antimicrob Chemother 38: 745-747 (1996)
3. Alt V, Bechert T, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Scheddin D, Domann E, Schnettler R: Nanoparticulate silver. A new antimicrobial substance for bone cement. Orthopäde 33: 885-892 (2004)
4. Anderson RL, Carr JH, Bond WW, Favero MS: Susceptibility of vancomycin-resistant enterococci to environmental disinfectants. Infect Control Hosp Epidemiol 18: 195-199 (1997)
5. Antti-Poika I JG, Konttinen Y, Lidgren L, Santavirta S, Sanzen L: Hip arthoplasty infection. Current concepts. Acta Orthop Scand Suppl 61: 163-169 (1990)
6. Bauer TW, Schils J: The pathology of total joint arthroplasty.II. Mechanisms of implant failure. Skeletal Radiol 28: 483-497 (1999)
7. Bengtson S, Blomgren G, Knutson K, Wigren A, Lidgren L: Hematogenous infection after knee arthroplasty. Acta Orthop Scand 58: 529-534 (1987)
8. Berbari EF, Hanssen AD, Duffy MC, Steckelberg JM, Ilstrup DM, Harmsen WS, Osmon DR: Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. Clin Infect Dis 27: 1247-1254 (1998)
9. Bernard L, Hoffmeyer P, Assal M, Vaudaux P, Schrenzel J, Lew D: Trends in the treatment of orthopaedic prosthetic infections. J Antimicrob Chemother 53: 127-129 (2004)
10. Blaha JD, Nelson CL, Frevert LF, Henry SL, Seligson D, Esterhai JL, Jr., Heppenstal RB, Calhoun J, Cobos J, Mader J: The use of septopal (polymethylmethacrylate beads with gentamicin) in the treatment of chronic osteomyelitis. Instr Course Lect 39: 509-514 (1990)
11. Bloomfield SF: Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments. Symp Ser Soc Appl Microbiol 144-157 (2002)
12. Booth RE, Jr., Lotke PA: The results of spacer block technique in revision of infected total knee arthroplasty. Clin Orthop Relat Res 57-60 (1989)
13. Braunwarth, W: Octenisept als Wundauflage, S&M Forschung Norderstedt, 5-14 (2004)
14. Brien WW, Salvati EA, Klein R, Brause B, Stern S: Antibiotic impregnated bone cement in total hip arthroplasty. An in vivo comparison of the elution properties of tobramycin and vancomycin. Clin Orthop Relat Res 242-248 (1993)
15. Brown MR, Allison DG, Gilbert P: Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? J Antimicrob Chemother 22: 777-780 (1988)
16. Brumfitt W, Dixson S, Hamilton-Miller JM: Resistance to antiseptics in methicillin and gentamicin resistant Staphylococcus aureus. Lancet 1: 1442-1443 (1985)
17. Buchholz HW Engelbrecht H: Über die Depotwirkung einiger Antibiotika bei Vermischung mit dem Kunstharz Palacos. Chirurg 41: 511-515 (1970)
18. Buchholz HW, Engelbrecht H: Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. Chirurg 42: 51-55 (1972)
19. Bunetel L, Segui A, Cormier M, Percheron E, Langlais F: Release of gentamicin from acrylic bone cement. Clin Pharmacokinet 17: 291-297 (1989)
20. Bunetel L, Segui A, Langlais F, Cormier M: Osseous concentrations of gentamicin after implantation of acrylic bone cement in sheep femora. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 19: 99-105 (1994)
21. Calton TF, Fehring TK, Griffin WL: Bone loss associated with the use of spacer blocks in infected total knee arthroplasty. Clin Orthop Relat Res 148-154 (1997)
22. Charnley J: Postoperative infection after total hip replacement with special reference to air contamination in the operating room. Clin Orthop Relat Res 87: 167-187 (1972)
23. Charnley J, Eftekhar N: Postoperative infection in total prosthetic replacement arthroplasty of the hip-joint. With special reference to the bacterial content of the air of the operating room. Br J Surg 56: 641-649 (1969)
24. Charnley J, Follacci FM, Hammond BT: The long-term reaction of bone to self-curing acrylic cement. J Bone Joint Surg Br 50: 822-829 (1968)
25. Chohfi M, Langlais F, Fourastier J, Minet J, Thomazeau H, Cormier M: Pharmacokinetics, uses, and limitations of vancomycin-loaded bone cement. Int Orthop 22: 171-177 (1998)
26. Cookson BD, Bolton MC, Platt JH: Chlorhexidine resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus or just an elevated MIC? An in vitro and in vivo assessment. Antimicrob Agents Chemother 35: 1997-2002 (1991)

27. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284: 1318-1322 (1999)
28. Cramer J EA, Ostermann P: Die infizierte Endoprothese am Beispiel der Hüftendoprothese. ZaeFQ 95: 195-201 (2001)
29. Dickinson GM, Bisno AL: Infections associated with indwelling devices: infections related to extravascular devices. Antimicrob Agents Chemother 33: 602-607 (1989)
30. Duncan CP, Beauchamp C: A temporary antibiotic-loaded joint replacement system for management of complex infections involving the hip. Orthop Clin North Am 24: 751-759 (1993)
31. Engesaeter LB, Lie SA, Espehaug B, Furnes O, Vollset SE, Havelin LI: Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. Acta Orthop Scand 74: 644-651 (2003)
32. Enzelsberger H, Eppel W, Dorninger G, Wewalka G: Efficacy of various methods for preoperative vaginal antisepsis. Geburtshilfe Frauenheilkd 55: 707-710 (1995)
33. Espehaug B, Engesaeter LB, Vollset SE, Havelin LI, Langeland N: Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Review of 10,905 primary cemented total hip replacements reported to the Norwegian arthroplasty register, 1987 to 1995. J Bone Joint Surg Br 79: 590-595 (1997)
34. Gilbert P, McBain AJ: Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev 16: 189-208 (2003)
35. Goroncy-Bermes H: In: Untersuchug über die Wirkung von Octenisept gegen Mikroorganismen der Vaginalflora, S&M Forschung Norderstedt, 33-42 (1990)
36. Gottenbos B, Grijpma DW, van der Mei HC, Feijen J, Busscher HJ: Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 48: 7-13 (2001)
37. Goulet JA, Pellicci PM, Brause BD, Salvati EM: Prolonged suppression of infection in total hip arthroplasty. J Arthroplasty 3: 109-116 (1988)
38. Guggenbichler JP, Boswald M, Lugauer S, Krall T: A new technology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity in central venous catheters. Infection 27 Suppl 1: 16-23 (1999)
39. Hancock RE: Alterations in outer membrane permeability. Annu Rev Microbiol 38: 237-264 (1984)
40. Hansis M, Arens S: Prophylactic and therapeutic use of antibiotics in trauma surgery. Unfallchirurg 99: 316-322 (1996)
41. Harke A: Einfluß von Octenisept auf immunmodulatorische Reaktionen. S & M Forschung Nordestedt: 12-15 (1997)
42. Harris WH, Sledge CB: Total hip and total knee replacement (2). N Engl J Med 323: 801-807 (1990)
43. Hauer T, Lacour M, Gastmeier P, Schulgen G, Schumacher M, Ruden H, Daschner F: Nosocomial infections in Germany. Microbiological diagnosis, preventive antibiotics and antibiotic therapy. Med Klin (Munich) 91: 681-686 (1996)
44. Hoff SF, Fitzgerald RH, Jr., Kelly PJ: The depot administration of penicillin G and gentamicin in acrylic bone cement. J Bone Joint Surg Am 63: 798-804 (1981)
45. Hunter G, Dandy D: The natural history of the patient with an infected total hip replacement. J Bone Joint Surg Br 59: 293-297 (1977)
46. Hunter GA, Welsh RP, Cameron HU, Bailey WH: The results of revision of total hip arthroplasty. J Bone Joint Surg Br 61-B: 419-421 (1979)
47. Irizarry L, Merlin T, Rupp J, Griffith J: Reduced susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to cetylpyridinium chloride and chlorhexidine. Chemotherapy 42: 248-252 (1996)
48. Isiklar ZU, Darouiche RO, Landon GC, Beck T: Efficacy of antibiotics alone for orthopaedic device related infections. Clin Orthop Relat Res 184-189 (1996)
49. Josefsson G, Gudmundsson G, Kolmert L, Wijkstrom S: Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. A five-year survey of 1688 hips. Clin Orthop Relat Res 173-178 (1990)
50. Kaiser W, Gulielmos V, Hausmann H, Ghalehasadi S: Results before and after introduction of perioperative antibiotic prophylaxis in hip joint prostheses treatment of geriatric patients. Unfallchirurgie 22: 153-159 (1996)
51. Kalteis T, Luring C, Schaumburger J, Perlick L, Bathis H, Grifka J: Tissue toxicity of antiseptics. Z Orthop Ihre Grenzgeb 141: 233-238 (2003)
52. Katzer A, Wening JV, Kupka P, Meenen NM, Jungbluth KH: Perioperative antibiotic prophylaxis in hip operations. Penetration into bone, capsule tissue and cartilage exemplified by cefuroxime. Unfallchirurgie 23: 161-170 (1997)

53. Kendall RW, Duncan CP, Smith JA, Ngui-Yen JH: Persistence of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots. A reason for caution. Clin Orthop Relat Res 273-280 (1996)
54. Khoury AE, Lam K, Ellis B, Costerton JW: Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. Asaio J 38: 174-178 (1992)
55. Klemm KW: Antibiotic bead chains. Clin Orthop Relat Res 63-76 (1993)
56. Kreutzer J, Schneider M, Schlegel U, Ewerbeck V, Breusch SJ: Cemented total hip arthroplasty in Germany-an update. Z Orthop Ihre Grenzgeb 143: 48-55 (2005)
57. Kuechle DK, Landon GC, Musher DM, Noble PC: Elution of vancomycin, daptomycin, and amikacin from acrylic bone cement. Clin Orthop Relat Res 302-308 (1991)
58. Kuehn KD, Ege W, Gopp U: Acrylic bone cements: composition and properties. Orthop Clin North Am 36: 17-28 (2005)
59. LaPorte DM, Waldman BJ, Mont MA, Hungerford DS: Infections associated with dental procedures in total hip arthroplasty. J Bone Joint Surg Br 81: 56-59 (1999)
60. Leunig M, Chosa E, Speck M, Ganz R: A cement spacer for two-stage revision of infected implants of the hip joint. Int Orthop 22: 209-214 (1998)
61. Levine SE, Esterhai JL, Jr., Heppenstall RB, Calhoun J, Mader JT: Diagnoses and staging. Osteomyelitis and prosthetic joint infections. Clin Orthop Relat Res 77-86 (1993)
62. Lindqvist C, Slatis P: Dental bacteremia-a neglected cause of arthroplasty infections? Three hip cases. Acta Orthop Scand 56: 506-508 (1985)
63. 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)
64. Lodenkamper H, Lodenkamper U, Trompa K: Elimination of antibiotics from Palacos bone cement (personal experience from a bacteriological viewpoint after 10-year application in joint replacement surgery). Z Orthop Ihre Grenzgeb 120: 801-805 (1982)
65. Lysaght MJ, Nguy NA, Sullivan K: An economic survey of the emerging tissue engineering industry. Tissue Eng 4: 231-238 (1998)
66. Mader JT, Calhoun J, Cobos J: In vitro evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads. Antimicrob Agents Chemother 41: 415-418 (1997)
67. Malchau H, Herberts P, Eisler T, Garellick G, Soderman P: The Swedish Total Hip Replacement Register. J Bone Joint Surg Am 84-A Suppl 2: 2-20 (2002)
68. Marks KE, Nelson CL, Lautenschlager EP: Antibiotic-impregnated acrylic bone cement. J Bone Joint Surg Am 58: 358-364 (1976)
69. Masri BA, Duncan CP, Beauchamp CP, Paris NJ, Arntorp J: Effect of varying surface patterns on antibiotic elution from antibiotic-loaded bone cement. J Arthroplasty 10: 453-459 (1995)
70. McGowan JE, Jr., Terry PM, Huang TS, Houk CL, Davies J: Nosocomial infections with gentamicin-resistant Staphylococcus aureus: plamid analysis as an epidemiologic tool. J Infect Dis 140: 864-872 (1979)
71. Nafziger DA SL: Infection in implanted prothetic devices. In: Wenzel RP: Prevention and control of nosocomial infections. 3rd edition: 889-923 (1997)
72. Nelson CL, Evans RP, Blaha JD, Calhoun J, Henry SL, Patzakis MJ: A comparison of gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate bead implantation to conventional parenteral antibiotic therapy in infected total hip and knee arthroplasty. Clin Orthop Relat Res 96-101 (1993)
73. Neut D, van de Belt H, Stokroos I, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ: Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. J Antimicrob Chemother 47: 885-891 (2001)
74. Neut D, van de Belt H, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ: The effect of mixing on gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements. Acta Orthop Scand 74: 670-676 (2003)
75. Niedner R, Schopf E: Clinical efficacy of topical glucocorticoid preparations and other types of dermatics in inflammatory diseases, particularly in atopic dermatitis. Curr Probl Dermatol 21: 157-169 (1993)
76. Oishi CS CW, Hoaglund FT: Use of parenteral prophylactic antibiotics in clean orthopaedic surgery. A review of the literature. Clin Orthop Relat Res. 296: 249-255 (1993)
77. Palmer SJ, Parker MJ, Hollingworth W: The cost and implications of reoperation after surgery for fracture of the hip. J Bone Joint Surg Br 82: 864-866 (2000)
78. 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)
79. Penner MJ, Masri BA, Duncan CP: Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. J Arthroplasty 11: 939-944 (1996)
80. Petty W, Spanier S, Shuster JJ: Prevention of infection after total joint replacement. Experiments with a canine model. J Bone Joint Surg Am 70: 536-539 (1988)

81. Pfarr B, Burri C: Prospective study on the effect of gentamycin-Palacos in 200 total hip prostheses. Aktuelle Probl Chir Orthop 207-210 (1979)
82. Pforringer W, Rosemeyer B, Wasmer G, Draenert K: Bone cements in surface replacement of the hip joint. Aktuelle Probl Chir Orthop 31: 282-288 (1987)
83. Picknell B, Mizen L, Sutherland R: Antibacterial activity of antibiotics in acrylic bone cement. J Bone Joint Surg Br 59: 302-307 (1977)
84. Pingsmann A, Muller RT, Goller A: Cost analysis for total hip arthroplasty by measurement of time and material expenditure. Arch Orthop Trauma Surg 117: 421-424 (1998)
85. Powers KA, Terpenning MS, Voice RA, Kauffman CA: Prosthetic joint infections in the elderly. Am J Med 88: 9-13 (1990)
86. Powles JW, Spencer RF, Lovering AM: Gentamicin release from old cement during revision hip arthroplasty. J Bone Joint Surg Br 80: 607-610 (1998)
87. Quirynen M, Bollen CM: The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. J Clin Periodontol 22: 1-14 (1995)
88. Rossi M ZW, Furrer H, Zanetti G, Mühlemann K: Antibiotika zur Prophylaxe hämatogener Spätinfektionen von Gelenkprothesen. Schweizer Ärztezeitung 85: 2083-2083 (2004)
89. Russell AD: Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. J Appl Bacteriol 71: 191-201 (1991)
90. Russell AD: Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. Lancet Infect Dis 3: 794-803 (2003)
91. Russell AD, Day MJ: Antibiotic and biocide resistance in bacteria. Microbios 85: 45-65 (1996)
92. Russell AD, Gould GW: Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 17: 167-195 (1988)
93. Schmidt J, Porsch M, Hackenbroch MH, Koebke J, Brimmers P: Modified intracorporeal lithotripsy for cement removal in hip prosthesis exchange operations - experimental principles. Z Orthop Ihre Grenzgeb 136: 44-49 (1998)
94. Schurman DJ, Trindade C, Hirshman HP, Moser K, Kajiyama G, Stevens P: Antibiotic-acrylic bone cement composites. Studies of gentamicin and Palacos. J Bone Joint Surg Am 60: 978-984 (1978)
95. Sculco TP: The economic impact of infected total joint arthroplasty. Instr Course Lect 42: 349-351 (1993)
96. Speller DC, Raghunath D, Stephens M, Viant AC, Reeves DS, Wilkinson PJ, Broughall JM, Holt HA: Epidemic infection by a gentamicin-resistant Staphylococcus aureus in three hospitals. Lancet 1: 464-466 (1976)
97. Stevens CM TK, Calhoun JH, Mader JT: An articulated antibiotic spacer used for infected total knee arthroplasty: a comparative in vitro elution study of Simplex and Palacos bone cements. J Orthop Res. 1: 27-33. (2005)
98. Stickler DJ, Thomas B: Sensitivity of Providence to antiseptics and disinfectants. J Clin Pathol 29: 815-823 (1976)
99. Stickler DJ, Thomas B: Antiseptic and antibiotic resistance in Gram-negative bacteria causing urinary tract infection. J Clin Pathol 33: 288-296 (1980)
100. Stinchfield FE, Bigliani LU, Neu HC, Goss TP, Foster CR: Late hematogenous infection of total joint replacement. J Bone Joint Surg Am 62: 1345-1350 (1980)
101. Sugarman B, Young EJ: Infections associated with prosthetic devices: magnitude of the problem. Infect Dis Clin North Am 3: 187-198 (1989)
102. Thierse L: Experiences with Refobacin-Palacos with regard to deep late infections following hip-joint endoprosthesis surgery. A 4-years' study. Z Orthop Ihre Grenzgeb 116: 847-852 (1978)
103. Torholm C, Lidgren L, Lindberg L, Kahlmeter G: Total hip joint arthroplasty with gentamicin-impregnated cement. A clinical study of gentamicin excretion kinetics. Clin Orthop Relat Res 99-106 (1983)
104. Trompa K: Über die Ausscheidung verschiedener Antibiotika - einzeln und in Kombination - aus dem Knochenzement Palacos R. Med. Dissertation, Universität Hamburg 13-26 (1981)
105. Tunney MM, Ramage G, Patrick S, Nixon JR, Murphy PG, Gorman SP: Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from orthopedic implants following revision hip surgery. Antimicrob Agents Chemother 42: 3002-3005 (1998)
106. Ullmann U: Infektionsprophylaxe bei Gelenkersatz in der Orthopädie. Chemother J 12: 57-60 (2003)
107. Vaara M: Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol Rev 56: 395-411 (1992)
108. van de Belt H ND, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ: Antibiotic resistance- to treat or not to treat? Nat Med 4: 358-359 (1999)

109. van de Belt H ND, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ: Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. Acta Orthop Scand. 72: 557-571 (2001)
110. van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ: Gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements and Staphylococcus aureus biofilm formation. Acta Orthop Scand 71: 625-629 (2000)
111. Virto MR, Frutos P, Torrado S, Frutos G: Gentamicin release from modified acrylic bone cements with lactose and hydroxypropylmethylcellulose. Biomaterials 24: 79-87 (2003)
112. von Eiff C, Kipp F, Peters G: Pathogenesis, diagnosis and prevention of implant-associated infection. Internist (Berl) 41: 1180-1182, 1184-1188 (2000)
113. Wahlig H, Dingeldein E: Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. Acta Orthop Scand 51: 49-56 (1980)
114. Wahlig H, Hameister W, Grieben A: Release of gentamicin from polymethyl methacrylate. I. Experimental *in vitro* tests. Langenbecks Arch Chir 331: 169-192 (1972)
115. Walenkamp GH, Kleijn LL, de Leeuw M: Osteomyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1-12 years. Acta Orthop Scand 69: 518-522 (1998)
116. Walenkamp GH, van Roermund PM, van Horn JR: One hundred years of orthopedics in the Netherlands. IX. The treatment of chronic osteomyelitis. Ned Tijdschr Geneeskd 142: 1124-1130 (1998)
117. Wang CJ, Huang TW, Wang JW, Chen HS: The often poor clinical outcome of infected total knee arthroplasty. J Arthroplasty 17: 608-614 (2002)
118. Wannske M TH: Results of prophylactic use of Refobacin-Palacos in implantation of endoprostheses of the hip joint in Hannover. Aktuelle Probl Chir Orthop. 12: 201-205 (1979)
119. Widmer AF: New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. Clin Infect Dis 33 Suppl 2: 94-106 (2001)
120. Wininger DA, Fass RJ: Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. Antimicrob Agents Chemother 40: 2675-2679 (1996)
121. Winkler H, Janata O, Berger C, Wein W, Georgopoulos A: In vitro release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts. J Antimicrob Chemother 46: 423-428 (2000)
122. Witso E, Persen L, Loseth K, Benum P, Bergh K: Cancellous bone as an antibiotic carrier. Acta Orthop Scand 71: 80-84 (2000)
123. Wyatt TD, Ferguson WP, Wilson TS, McCormick E: Gentamicin resistant Staphylococcus aureus associated with the use of topical gentamicin. J Antimicrob Chemother 3: 213-217 (1977)

7. Danksagung:

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Leuten bedanken, die mir in jeglicher Form bei dem Abschluss der vorliegenden Dissertation geholfen haben.

Vor allem Herrn Privatdozent Dr. med. Mark Bischoff, dessen Idee der Grundstein dieser Arbeit war und der mich von der Entstehung über die Durchführung bis zur Fertigstellung meiner Dissertation immer hilfreich begleitet hat, danke ich ganz herzlich.

Besonderer Dank gilt auch Frau PD Dr. med. Heike von Baum, die mit ihrer immer freundlichen und hervorragenden Betreuung sowie ihrem fundierten Wissen in der Mikrobiologie einen entscheidenden Teil an der Fertigstellung dieser Arbeit geleistet hat.

Ich danke auch den Mitarbeitern des Hygienelabors, ganz besonders Frau Angelika Mörike, die mich mit tatkräftiger Hilfe im Labor unterstützt und mit immer guten Ideen die experimentellen Untersuchungen vorangebracht hat.

Zudem danke ich Herrn Dr. Horst Braunwarth (Firma Schülke&Mayr) für die Bereitstellung des Octenidin sowie für die Ermöglichung der Chromatographie-Messungen.

Zu guter Letzt gilt der größte Dank meinen Eltern, Frau Urte und Herr Dr. med. Wolf Langhoff, für die immer großzügige und liebevolle Unterstützung in allen Bereichen sowie die Förderung meiner Ausbildung.

Ihnen und meinen Geschwistern Britta und Felix ist diese Arbeit mit Dank gewidmet.

8. Anhang:

Im Anhang sind alle erfassten Daten zu den oben aufgeführten Versuchen in Tabellenform zusammengefasst. Zudem zeigen die Tabellen 19-21 eine Übersicht der hergestellten Zementpellets und deren Gewicht in Gramm. Zementplättchen, deren Gewicht mehr als 5% vom Mittelwert abwichen, wurden nicht verwendet.

Tabelle 4: Versuchsdaten für *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

Bakterienwachstum nach Zusatz von 1% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B		C		D		E		F	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0	0	0	0	0	0	0,35	$1,3x10^{6}$	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	$5x10^{3}$	0	0	0	$1x10^{4}$	0,21	$1,1x10^{6}$
3	0	0	0	0	0	$1x10^{4}$	0	$1x10^{4}$	0,04	$9,8x10^{5}$	0	$8x10^{5}$
4	0,73	$3,7x10^{8}$	0	0	0	0	0	0	0,01	$1,2x10^{6}$	0	0
5	0,53	$1x10^{8}$	0	0	0	$3,2x10^{2}$	0.07	$8x10^{4}$	0	$1,5x10^{5}$	0	$1x10^{5}$
6	1,03	$4,5x10^{8}$	0	$1x10^{4}$	0	$2x10^{3}$	0	0	0,26	$1x10^{8}$	0,56	$2,3x10^{8}$

Bakterienwachstum nach Zusatz von 2% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B		C		D		E		F	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0	0	0	0	0	0	0	$1x10^{4}$	0	$1,3x10^{3}$	0	0
2	0	0	0	0	0	$5x10^{3}$	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0,49	$3,3x10^{7}$	0	$4,6x10^{2}$	0	$7,9x10^{2}$	0	0	0	0
6	0	0	1	$3,9x10^{8}$	0	$1x10^{4}$	0	0	0	0	0	0

Spalte A+B Versuchsreihe vom 06.07.-12.07.03, C+D vom 24.8.-30.8.03, E+F vom 06.09.-12.09.03
OD: Optische Dichte im Spektralphotometer
KBE/ml: Koloniebildende Einheiten pro Milliliter Bakteriensuspension

Tabelle 5: Versuchsdaten für *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

Bakterienwachstum nach Zusatz von 3% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B		C		D		E		F	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0,05	0	0,05	0	0	0	0,03	$2x10^{3}$	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	$2x10^{3}$	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	$2x10^{3}$	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,26	$3x10^{6}$	0	0	0	$1,3x10^{2}$	0.07	$8x10^{1}$	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$1x10^{4}$	0	0

Bakterienwachstum nach Zusatz von 4% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B		C		D		E		F	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0	0	0	0	0,13	0	0,09	0	0,08	0	0,22	0
2	0	0	0	0	0	$5x10^{3}$	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	$4,5x10^{2}$	0	0	0	$7,2x10^{2}$	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Spalte A+B Versuchsreihe vom 06.07.-12.07.03, C+D vom 24.8.-30.8.03, E+F vom 06.09.-12.09.03
OD: Optische Dichte im Spektralphotometer
KBE/ml: Koloniebildende Einheiten pro Milliliter Bakteriensuspension

Tabelle 6: Versuchsdaten für *Streptococcus epidermidis (*ATCC 12228)

Bakterienwachstum nach Zusatz von 1% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B		C		D		E		F	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	$1x10^{4}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	$2,1x10^{2}$	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	$2x10^{3}$	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	$5x10^{3}$	0	0	0	0	0	$1x10^{4}$
6	0	$5x10^{5}$	0,24	$4x10^{7}$	0	0	0	0	0	0	0	$3,5x10^{3}$

Bakterienwachstum nach Zusatz von 2% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B		C		D		E		F	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0	$8,6x10^{2}$	0	0	0	0	0	$2x10^{3}$	0	0	0	$1x10^{2}$
2	0	0	0	0	0	$1x10^{3}$	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$1,2x10^{2}$	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	$7,8x10^{2}$	0	0	0	$1,3x10^{3}$
6	0	$1,3x10^{2}$	0	0	0	$7x10^{1}$	0	0	0	0	0	0

Spalte A+B Versuchsreihe vom 17.07.-23.07.03, C+D vom 24.8.-30.8.03, E+F vom 06.09.-12.09.03
OD: Optische Dichte im Spektralphotometer
KBE/ml: Koloniebildende Einheiten pro Milliliter Bakteriensuspension

Tabelle 7: Versuchsdaten für *Streptococcus epidermidis* (ATCC 12228)

Bakterienwachstum nach Zusatz von 3% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B		C		D		E		F	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0,17	0	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	$5x10^{3}$	0	0	0	$1,3x10^{3}$
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	$6x10^{1}$	0	0	0	$1,9x10^{2}$	0	0	0	$2,2x10^{2}$
6	0	0	0	$2,3x10^{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0

Bakterienwachstum nach Zusatz von 4% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B		C		D		E		F	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0	0,18	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	$2x10^{3}$	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	$7,3x10^{2}$	0	$4,8x10^{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0

Spalte A+B Versuchsreihe vom 17.07.-23.07.03, C+D vom 24.8.-30.8.03, E+F vom 06.09.-12.09.03
OD: Optische Dichte im Spektralphotometer
KBE/ml: Koloniebildende Einheiten pro Milliliter Bakteriensuspension

Tabelle 8: Versuchsdaten für *Streptococcus mitis* (ATCC 47456)

Bakterienwachstum nach Zusatz von 1% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B		C		D		E		F	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	$1,2x10^{3}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	$5x10^{3}$	0	$5x10^{3}$	0	$5x10^{3}$	0	$1,8x10^{2}$	0	0	0	$2x10^{3}$
4	0	$2,2x10^{4}$	0	$1,8x10^{4}$	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	$6,2x10^{4}$	0	$8x10^{3}$	0,33	$1x10^{7}$	0,27	$1x10^{7}$	0,1	$2x10^{6}$	0,02	$1,1x10^{3}$
6	0	$5x10^{5}$	0,06	$1x10^{6}$	0	$5x10^{3}$	0	$1,1x10^{3}$	0	0	0,35	$5,8x10^{7}$

Bakterienwachstum nach Zusatz von 2% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B		C		D		E		F	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	$5x10^{3}$	0	$5x10^{3}$	0	$3,8x10^{2}$	0	0	0	0	0	$5x10^{1}$
4	0	$8x10^{3}$	0	$2,3x10^{4}$	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	$4x10^{3}$	0	$1,2x10^{4}$	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	$2x10^{3}$	0	$6x10^{3}$	0	0	0	0	0	0	0	0

Spalte A+B Versuchsreihe vom 12.07.-19.07.03, C+D vom 24.8.-30.8.03, E+F vom 01.09.-07.09.03
OD: Optische Dichte im Spektralphotometer
KBE/ml: Koloniebildende Einheiten pro Milliliter Bakteriensuspension

Tabelle 9: Versuchsdaten für *Streptococcus mitis* (ATCC 47456)

Bakterienwachstum nach Zusatz von 3% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B		C		D		E		F	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0,1	0	0,14	0	0,03	0	0,04	0	0	0	0,03	0
2	0	0	0	$1x10^{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	$4,8x10^{2}$	0	0	0	0	0	0	0	$7x10^{1}$
4	0	$3x10^{2}$	0	$1,2x10^{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	$2x10^{2}$	0	$6x10^{1}$	0	0	0	0	0	$1,4x10^{2}$	0	0
6	0	$8x10^{1}$	0	$3x10^{3}$	0	0	0	0	0	0	0	0

Bakterienwachstum nach Zusatz von 4% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B		C		D		E		F	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0,09	0	0,02	0	0,09	0	0,14	0	0	0	0,02	0
2	0	0	0	$2x10^{3}$	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	$2x10^{3}$	0	$5x10^{3}$	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	$7,1x10^{2}$	0	$1,3x10^{3}$	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	$7,8x10^{3}$	0	$3,5x10^{3}$	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	$3x10^{2}$	0	0	0	0	0	0	0	0

Spalte A+B Versuchsreihe vom 12.07.-19.07.03, C+D vom 24.8.-30.8.03, E+F vom 01.09.-07.09.03
OD: Optische Dichte im Spektralphotometer
KBE/ml: Koloniebildende Einheiten pro Milliliter Bakteriensuspension

Tabelle 10: Versuchsdaten für *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

Bakterienwachstum nach Zusatz von 1% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0,39	$2,6x10^{8}$	0,06	$2,2x10^{8}$
2	0,74	$3x10^{8}$	0,64	$4,3x10^{8}$
3	1,02	$6,7x10^{8}$	0,94	$6,6x10^{8}$
4				

Bakterienwachstum nach Zusatz von 2% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0,13	$3x10^{8}$	0,04	$2,1x10^{6}$
2	0,6	$3,8x10^{8}$	0,6	$4,3x10^{8}$
3	0,84	$2,9x10^{8}$	0,89	$7,1x10^{8}$
4				

Bakterienwachstum nach Zusatz von 3% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0,17	$2,8x10^{6}$	0,13	$1x10^{8}$
2	0,59	$2,3x10^{8}$	0,77	$3,1x10^{8}$
3	0,77	$1,3x10^{9}$	0,75	$2,9x10^{8}$
4				

Bakterienwachstum nach Zusatz von 4% Octenidin zu dem Knochenzement Palacos®

Tag	A		B	
	OD	KBE/ml	OD	KBE/ml
1	0,74	$3,6x10^{8}$	0,45	$1,7x10^{8}$
2	0,74	$2,5x10^{8}$	0,85	$3,4x10^{8}$
3	0,92	$7,4x10^{8}$	0,88	$6,6x10^{8}$
4				

Spalte A+B Versuchsreihe vom 27.07.-30.07.03., Versuchsabbruch am 31.07.2003
OD: Optische Dichte im Spektralphotometer
KBE/ml: Koloniebildende Einheiten pro Milliliter Bakteriensuspension

Tabelle 11: Negativproben zur Versuchsreihe *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

Teilversuch A/B		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

Teilversuch C/D		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

Teilversuch E/F		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

Tabelle 12: Negativproben zur Versuchsreihe *Streptococcus epidermidis* (ATCC 12228)

Teilversuch A/B		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

Teilversuch C/D		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

Teilversuch E/F		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

Versuchsreihe *Staphylococcus aureus*: A/B vom 18.07.-24.07.03, C+D vom 25.8.-31.8.03, E+F vom 06.09.-12.09.03
Versuchsreihe *Streptococcus epidermidis*: A/B vom 17.07.-23.07.03, C+D vom 24.8.-30.8.03, E+F vom 06.09.-12.09.03
OD: Optische Dichte im Spektralphotometer
KBE/ml: Koloniebildende Einheiten pro Milliliter Bakteriensuspension

Tabelle 13: Negativproben zur Versuchsreihe *Streptococcus mitis* (ATCC 47456)

Teilversuch A/B		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

Teilversuch C/D		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

Teilversuch E/F		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0

Tabelle 14: Negativproben zur Versuchsreihe *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

Teilversuch A/B		
Tag	OD	KBE/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0

Versuchsreihe *Streptococcus mitis*: A/B vom 12.07.-19.07.03, C+D vom 24.8.-30.8.03, E+F vom 01.09.-07.09.03
Versuchsreihe *Pseudomonas aeruginosa*: A/B vom 27.07.-30.07.03., Versuchsabbruch am 31.07.2003
OD: Optische Dichte im Spektralphotometer
KBE/ml: Koloniebildende Einheiten pro Milliliter Bakteriensuspension

Tabelle 15: Positivproben zur Versuchsreihe *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)

Teilversuch A/B			Teilversuch C/D			Teilversuch E/F		
Tag	OD	KBE/ml	Tag	OD	KBE/ml	Tag	OD	KBE/ml
1	1,07	$6{,}5\times10^{8}$	1	0,95	$2{,}2\times10^{8}$	1	0,92	$2{,}2\times10^{8}$
2	1	$4{,}4\times10^{8}$	2	0,97	$2{,}6\times10^{8}$	2	0,97	$1{,}4\times10^{8}$
3	1,05	$4{,}6\times10^{8}$	3	0,96	$2{,}4\times10^{8}$	3	1,05	$2{,}6\times10^{8}$
4	1,17	$4{,}8\times10^{8}$	4	0,98	$4{,}5\times10^{8}$	4	1,02	$3{,}5\times10^{8}$
5	1,11	$3{,}9\times10^{8}$	5	1,01	$4{,}1\times10^{8}$	5	1,04	$3{,}3\times10^{8}$
6	1,07	$3{,}2\times10^{8}$	6	1,02	$2{,}1\times10^{8}$	6	0,97	$3{,}0\times10^{8}$

Tabelle 16: Positivproben zur Versuchsreihe *Streptococcus epidermidis* (ATCC 12228)

Teilversuch A/B			Teilversuch C/D			Teilversuch E/F		
Tag	OD	KBE/ml	Tag	OD	KBE/ml	Tag	OD	KBE/ml
1	0,92	$4{,}2\times10^{8}$	1	0,96	$3{,}4\times10^{8}$	1	0,91	$4{,}6\times10^{8}$
2	0,9	4×10^{8}	2	0,99	$4{,}5\times10^{8}$	2	0,98	$3{,}3\times10^{8}$
3	0,98	$3{,}9\times10^{8}$	3	0,95	$4{,}8\times10^{8}$	3	0,97	$4{,}3\times10^{8}$
4	0,96	$3{,}2\times10^{8}$	4	0,96	$4{,}1\times10^{8}$	4	1,02	$3{,}5\times10^{8}$
5	1,08	$3{,}8\times10^{8}$	5	0,96	$3{,}1\times10^{8}$	5	0,95	$2{,}7\times10^{8}$
6	0,91	$3{,}8\times10^{8}$	6	0,93	$4{,}5\times10^{8}$	6	0,8	$3{,}7\times10^{8}$

Versuchsreihe *Staphylococcus aureus*: A/B vom 18.07.-24.07.03, C+D vom 25.8.-31.8.03, E+F vom 06.09.-12.09.03
Versuchsreihe *Streptococcus epidermidis*: A/B vom 17.07.-23.07.03, C+D vom 24.8.-30.8.03, E+F vom 06.09.-12.09.03
OD: Optische Dichte im Spektralphotometer
KBE/ml: Koloniebildende Einheiten pro Milliliter Bakteriensuspension

Tabelle 17: Positivproben zur Versuchsreihe *Streptococcus mitis* (ATCC 47456)

Teilversuch A/B		
Tag	OD	KBE/ml
1	0,89	$9,6x10^7$
2	1,01	$5x10^7$
3	0,89	$3,5x10^7$
4	0,92	$1,5x10^7$
5	0,91	$3,5x10^7$
6	0,93	$3x10^7$

Teilversuch C/D		
Tag	OD	KBE/ml
1	0,89	$4,8x10^7$
2	0,82	$1,8x10^7$
3	0,86	$1,3x10^7$
4	0,81	$1,2x10^7$
5	0,91	$1,3x10^7$
6	0,82	$2x10^7$

Teilversuch E/F		
Tag	OD	KBE/ml
1	0,9	$4,7x10^7$
2	0,83	$1,5x10^7$
3	0,87	$1,3x10^7$
4	0,84	$2,8x10^7$
5	0,88	$2,0x10^7$
6	0,89	$1,2x10^7$

Tabelle 18: Positivproben zur Versuchsreihe *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

Teilversuch A/B		
Tag	OD	KBE/ml
1	1,08	$7,8x10^8$
2	1,06	$8,7x10^8$
3	1,01	$7,5x10^8$
4		

Versuchsreihe *Streptococcus mitis*: A/B vom 12.07.-19.07.03, C+D vom 24.8.-30.8.03, E+F vom 01.09.-07.09.03
Versuchsreihe *Pseudomonas aeruginosa*: A/B vom 27.07.-30.07.03., Versuchsabbruch am 31.07.2003
OD: Optische Dichte im Spektralphotometer
KBE/ml: Koloniebildende Einheiten pro Milliliter Bakteriensuspension

Tabelle 19: Gewichte der verwendeten Zementplättchen in Milligramm

Übersicht der Versuchsreihen A und B

Herstellungsdatum	19.05.2003	26.05.2003	19.06.2003	20.05.2003	21.05.2003
Octenidingehalt	0%, 0g	1%, 0,2g	2%, 0,4g	3%, 0,6g	4%, 0,8g
Probennummer	Gewicht in mg				
1	4832	4578	4545	4542	4428
2	4643	4599	4590	4417	4440
3	4652	4593	4582	4504	4600
4	4747	---	4580	4550	4650
5	4860	4569	4574	4534	4667
6	4838	4529	4560	4572	4683
7	4681	4565	4583	4571	4662
8	4674	4520	4610	4526	4525
9	4634	4502	4562	4416	4468
10	4676	4541	4533	4490	4494
11	4680	4528	4578	4525	4496
12	4763	4565	4622	4477	4596
13	4815	4541	4523	4546	4601
14	4890	4555	4559	4542	4548
15	4804	4564	4612	4520	4590
16	4648	4550	4562	4523	4607
17	4765	4540	4630	---	4502
18	4604	4535	4640	4450	4545
19	4606	4645	4576	4449	4560
20	4703	4630	4627	4443	4620
21	4638	4558	4636	4482	4630
22	4600	4615	4579	4477	4650
23	4565	4620	4662	4499	4537
24	4653	4628	4686	4544	4558
25	4579	4660	4679	4538	4630
26	4655	4570	4632	---	4719
27	4621	4540	4500	4533	4683
28	4638	4617	4612	4520	4504
29	4573	4633	4586	4470	4431
30	4637	4587	4553	4477	4638
31	4579	4619	4590	4448	4583
32	4656	4599	4635	4488	4578
33	4603	4571	4617	4513	4562
34	4640	4566	4571	4528	4420
35	4629	4566	4590	4686	4458
36	4597	4521	4639	4598	4480
Mittelwert in mg	4677,2	4574,8	4594,9	4511,7	4565,1

Octenidingehalt in Prozent und Gramm (g)
(Prozentangabe in Bezug auf PMMA-Pulvergewicht)

Tabelle 20: Gewichte der verwendeten Zementplättchen in Milligramm

Übersicht der Versuchsreihen C und D

Herstellungsdatum	29.07.2003	20.08.2003	21.08.2003	22.08.2003	23.08.2003
Octenidingehalt	0%, 0g	1%, 0,2g	2%, 0,4g	3%, 0,6g	4%, 0,8g
Probennummer	Gewicht in mg				
1	4619	4716	4477	4542	4632
2	4649	4716	4547	---	4497
3	4597	4587	4519	4503	4580
4	4617	4688	4477	4494	4599
5	4639	4695	4583	4522	4619
6	4596	4685	4564	4501	4506
7	4624	4611	4589	4542	4490
8	4623	4505	4475	4540	4530
9	4593	4648	4523	4489	4470
10	4569	4682	4507	4550	4476
11	4575	4470	4453	4486	4482
12	4543	4676	4604	4487	4513
13	4530	4635	4504	4540	4465
14	4580	4652	4638	4523	4544
15	4583	4642	4588	4544	---
16	4587	4614	4634	4542	4467
17	4582	4588	4480	4587	4544
18	4571	4490	4596	---	4519
19	---	4674	4551	4530	4618
20	4647	4442	4539	4460	4608
21	4634	4478	4525	4416	4595
22	4645	4572	4559	4440	4588
23	4713	4541	4631	4440	4589
24	4644	4550	4643	4400	4580
25	4684	4530	4593	---	4583
26	4625	4622	4573	4580	4552
27	4707	4620	4563	4388	4471
28	4444	4382	4568	4429	---
29	4601	4384	4583	4548	4612
30	4606	4477	4573	4485	4595
31	4676	4456	4547	4479	4574
32	4702	4540	4583	4479	4640
33	4680	4547	4406	4512	4572
34	4666	4521	4575	4495	4543
35	4703	4623	4577	4605	4504
36	4646	4619	---	4678	---
Mittelwert in mg	4620,0	4579,9	4552,8	4507,8	4550,2

Octenidingehalt in Prozent und Gramm (g)
(Prozentangabe in Bezug auf PMMA-Pulvergewicht)

Tabelle 21: Gewichte der verwendeten Zementplättchen in Milligramm

Übersicht der Versuchsreihen E und F

Herstellungsdatum	25.08.2003	31.08.2003	31.08.2003	22.08.2003
Octenidingehalt	1%, 0,2g	2%, 0,4g	3%, 0,6g	4%, 0,8g
Probennummer	Gewicht in mg			
1	4620	4475	4500	4504
2	4628	4605	4540	4493
3	4638	4400	4470	4368
4	4676	4499	4439	4433
5	4645	4493	4541	4479
6	4663	4495	4502	---
7	4691	4455	4551	4402
8	4720	---	4520	4430
9	4634	4593	4477	4586
10	4605	4468	---	4464
11	4660	4465	4633	---
12	4599	4396	4604	4348
13	4613	4409	4571	4408
14	4623	4412	4562	4437
15	4652	4460	4561	4438
16	4691	4396	4510	4361
17	4666	4387	4505	4319
18	4646	---	4465	---
19	4485	4450	4516	4442
20	4670	4536	4478	4441
21	4564	4578	4420	4415
22	4611	4625	4453	4467
23	4650	4597	4436	4516
24	4597	4415	4485	4505
25	4607	4590	4462	4472
26	4450	4523	4505	4608
27	4597	4623	4460	4443
28	4566	4507	4506	4396
29	4580	4505	4554	---
30	4613	4546	4536	4327
31	4647	4564	4490	4522
32	4621	4600	4500	---
33	4570	4585	4460	4501
34	4557	4528	4452	4500
35	4602	4564	4440	---
36	4492	---	4454	4407
Mittelwert in mg	4615,3	4507,4	4501,7	4447,7

Octenidingehalt in Prozent und Gramm (g)
(Prozentangabe in Bezug auf PMMA-Pulvergewicht)