

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Histologischer Score zur Schweregradeinteilung der implantatassoziierten Osteitis in der Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Michael Hambüchen
2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Timm J. Filler

Zusammenfassung

Implantassozierte Infektionen des Knochens nach einer Frakturstabilisierung können die Frakturheilung stark beeinträchtigen. Die Abschätzung des Progresses einer Infektion intra- und extraossär sowie deren Einfluss auf die Frakturheilung bestimmen den Therapiealgorithmus. Ziel dieser Arbeit war es, einen histologischen Score zu etablieren, anhand dessen man den Ausprägungsgrad einer Osteitis im Mausmodell evaluieren kann.

Für die Untersuchung standen Femura von insgesamt 35 Mäusen zur Verfügung. Bei n=27 Mäusen wurde eine implantatassozierte Infektion mit *Staphylococcus aureus* nach Osteotomie und winkelstabiler Plattenosteosynthese induziert. Als Kontrollgruppe dienten n=8 Mäuse ohne Infektion. Nach 7, 14 und 28 Tagen wurden die Femura histologisch aufgearbeitet und die Schnitte mittels der Hämatoxylin/Eosin- (HE-) und Giemsa-Methode gefärbt. Es wurden die Parameter 1. Kallusbildung, 2. Frakturkonsolidierung, 3. Markraumveränderungen und 4. Bakterienanzahl bestimmt. Zur Berechnung des Gesamtscores wurden die Parameter gemäß ihrer Bedeutung innerhalb des Krankheitsprozesses unterschiedlich gewichtet. In der Summe konnten Punktzahlen zwischen 4 und 27 Punkten erreicht werden, wobei eine hohe Punktzahl gegen und eine niedrige Punktzahl für eine Osteitis spricht.

Unabhängig vom Zeitpunkt lag der Mittelwert der Osteitisgruppe mit $10,3 \pm 4,6$ Punkten signifikant niedriger als der Mittelwert der Kontrollgruppe mit $20,0 \pm 2,35$ Punkten ($p < 0,0001$). Auch in der Analyse zu den verschiedenen Zeitpunkten unterschieden sich die Mittelwerte zwischen Osteitis- und Kontrollgruppe deutlich. Bei einem Grenzwert von 15 Punkten bestanden eine Spezifität von 1,00, eine Sensitivität von 0,852, ein negativer prädiktiver Wert von 0,67 und ein positiver prädiktiver Wert von 1,00.

Durch den dargelegten histologischen Score besteht eine gute Möglichkeit, den Ausprägungsgrad und Progress der Osteitis unabhängig vom Zeitpunkt der Infektion abzuschätzen. Die Anwendung des Scores ist allerdings beschränkt auf tierexperimentelle Studien.

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Anatomische Grundlagen des Knochens.....	1
1.2	Knochenbruchheilung	3
1.3	Osteitis: Definition und Klassifikation	4
1.4	Epidemiologie	6
1.5	Erregerspektrum	6
1.6	Pathophysiologie.....	7
1.7	Diagnostik und Krankheitsverlauf.....	8
1.7.1	Anamnese.....	9
1.7.2	Klinik	9
1.7.3	Radiologische Untersuchungen	10
1.7.4	Mikrobiologische Untersuchung.....	12
1.7.5	Histologische Untersuchung	13
1.8	Grundsätze der Therapie	14
1.9	Existierende Scores zur Einteilung der Osteitis	15
1.10	Existierende Tiermodelle der Osteitis	16
1.11	Besonderheiten der Osteitis an der Maus.....	17
1.12	Zielsetzung der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Materialien	18
2.1.1	Geräte.....	18
2.1.2	Mäuse.....	18
2.2	Tierversuchsmodell.....	18
2.2.1	Versuchstiere	18
2.2.2	Ablauf der operativen Erstbehandlung der Mäuse.....	19
2.2.3	Postoperative Behandlung der Mäuse	19
2.2.4	Ablauf des Zweiteingriffes und Euthanasie	20
2.3	Aufarbeitung der Femura	20
2.4	Histologischer Score	21
2.4.1	Bestimmung des Ausmaßes der Kallusbildung.....	21
2.4.2	Bestimmung des Grades der Frakturkonsolidierung.....	23
2.4.3	Bestimmung der Strukturveränderungen des Markraumes.....	24
2.4.4	Bestimmung der Bakterienzahl	25
2.4.5	Errechnung der Gesamtpunktzahl und deren Wertung.....	26
2.5	Statistik	28
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Kallusbildung.....	30
3.2	Frakturkonsolidierung	31
3.3	Strukturveränderungen im Markraum	32
3.4	Bakterienzahl	33
3.5	Gesamtpunktzahl in Abhängigkeit vom Zeitpunkt	34
3.6	Gesamtpunktzahl unabhängig vom Zeitpunkt.....	35
3.7	Diagnostischer Wert.....	36

4	Diskussion.....	38
4.1	Tierversuche	38
4.2	Methodenkritik.....	40
4.3	Score	40
4.3.1	Kallusbildung.....	40
4.3.2	Frakturkonsolidierung	41
4.3.3	Markraumveränderungen.....	43
4.3.4	Bakterienanzahl	43
4.3.5	Gesamtpunktzahl	44
4.4	Diagnostischer Wert.....	46
4.5	Auswertung.....	47
5	Schlussfolgerung.....	48
6	Literatur	49

1 Einleitung

The bone heals, because it is broken – dieses Zitat von A. Apley beschreibt vereinfacht das hohe Heilungspotential von Knochen [1]. Im Gegensatz zu der Mehrzahl anderer Strukturen und Gewebe des Körpers ist verletzter Knochen in der Lage, ohne Narbenbildung auszuheilen. Der Prozess der Knochenbruchheilung unterliegt vier Phasen [2]. 1. Entzündungsphase, 2. Bildung eines Weichgewebeskallus, 3. Bildung des knöchernen Kallus und 4. Knochenumbau. Der Heilungsverlauf kann durch verschiedene Faktoren positiv und negativ beeinflusst werden. Für die Bruchheilung negative Faktoren sind unter anderem eine mangelnde Durchblutung, eine Instabilität und eine Infektion. Insbesondere eine implantatassoziierte Infektion des Knochens (Osteitis) nach einer Frakturstabilisierung ist häufig mit der Bildung einer Infektpseudarthrose verbunden. Die Abschätzung einer Osteitis erfolgt auf der Basis unterschiedlicher Kriterien, wobei hier zumeist eine qualitative Beurteilung erfolgt. Ziel dieser Arbeit war es, anhand histologischer Analysen den Progress der implantatassoziierten Osteitis quantitativ zu evaluieren.

1.1 Anatomische Grundlagen des Knochens

Der Röhrenknochen besteht aus je einer Epiphyse am proximalen und distalen Knochenende, sowie der Diaphyse im mittleren Knochenabschnitt. Das Femur ist der größte Röhrenknochen des Skelettes.

In der grundsätzlichen Struktur des Knochens unterscheidet man Faser- und Geflechtknochen vom Lamellenknochen. Diese unterscheiden sich in der Art und Weise wann und wie sie gebildet werden sowie in ihrer strukturellen Beschaffenheit [3, 4]. Lamellenknochen ist das typische Knochengewebe des Erwachsenen.

Der Geflechtknochen (synonym Faserknochen) entsteht im Rahmen der Knochenneubildung. Dies kann bei der natürlichen Knochenentstehung als auch der Frakturheilung der Fall sein [3, 5]. Charakteristisch sind die zufälligen Anordnungen der Kollagenfasern des Knochens und ein relativ geringer Mineralsalzgehalt. Physiologisch kommt er beim Erwachsenen in den Suturen der Schädelkalotte vor [3].

Der im Körper im Wesentlichen vorhandene Knochen ist der Lamellenknochen. Der Knochen ist außen von einer Knochenhaut (Periost) umgeben. Im Periost geführte Blutgefäße und Nerven tragen einen wesentlichen Anteil an der Durchblutung und Ernährung des Knochens bei. Unter dem Periost befindet sich der Rindenbereich des Knochens (*Substantia Compacta*). Diese ist eine kräftige Struktur, die den formgebenden äußeren Mantel des Knochens selbst bildet [3]. Die Struktur dieses Gewebes ist durch Osteone, Speziallamellen und *Havers-Kanäle* sowie den dazwischenliegenden Schaltlamellen gekennzeichnet. Die Lamellen sind von außen und innen von einer Generallamelle umgeben. Unabhängig von der Lamellenstruktur verlaufen quer die *Volkman-Kanäle*, die kleine Blutgefäße vom Periost zu den *Havers-Kanälen* führen und zur Ernährung des Knochens beitragen [3]. Unterhalb der inneren Generallamelle schließt das Endost die Kortikalis ab. Im Zentrum des Knochens befindet sich *Substantia Spongiosa*, eine schwammartige Knochenstruktur bestehend aus feinen Knochenbälkchen. Im Zwischenraum der Knochenbälkchen befindet sich das zellreiche Knochenmark [3].

Im Knochenmark befinden sich Zellen, die der Erythrozytopoese und der Bildung von Thrombozyten dienen, dem Immunsystem zugeordnete Zellen (Monozyten, Granulozyten und deren Vorläufer) und Zellen, die sich später zu den o. g. Zellen des Knochens differenzieren [6].

Am zellulären Aufbau des Knochens beteiligt sind in erster Linie Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten [4, 7].

Osteozyten sind Zellen, die von fester Knochensubstanz umgeben sind und sich potentiell zu Osteoblasten differenzieren können. Die Funktion dieser Zellart ist umstritten. Es wird vermutet, dass sie für Matrixbildung und Knochenstoffwechsel von Bedeutung sind [8].

Knochen unterliegt einem permanenten physiologischen Auf- und Abbau der Strukturen. Während Osteoblasten in erster Linie Knochen aufbauen, sind Osteoklasten am Abbau beteiligt. In einem gesunden Knochen besteht ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Auf- und Abbau [4, 5, 9].

Osteoblasten sind in der Lage, alle Bestandteile der ossären Interzellulärschubstanz zu bilden. Hingegen dienen Osteoklasten dem Abbau von Knochensubstanz. Sie entstehen aus Monozyten. Die Bildung von Osteoklasten

unterliegt unterschiedlichen Regulationsmechanismen, unter anderem verschiedenen Hormonen und Wachstumsfaktoren. Durch Ihre Aktivität und den Abbau von Knochensubstanz wird Kalzium freigesetzt [4, 7].

Die Funktionen des Knochens sind neben seiner Eigenschaft als Schutz- und Stützgewebe des Körpers auch die Hämatopoese und Stoffaustausch, z. B. im Mineralstoffwechsel. Hierbei spielt ein komplexer Regelmechanismus aus hormoneller und enzymatischer Steuerung im Zusammenspiel mit den Zellarten des Knochens eine Rolle [7]. Durch den gezielten Um-, Ab- und Aufbau von mineralsalzhaltiger Knochensubstanz nimmt der Knochen somit aktiv am Körperstoffwechsel teil [3].

1.2 Knochenbruchheilung

Die Frakturheilung wird unterteilt in direkte und indirekte Heilung. Voraussetzung für eine direkte Knochenheilung sind intaktes Periost und eine stabile Fraktursituation mit nur kleinem Frakturspalt. Unter dieser Voraussetzung kann der Knochen ohne Kallusbildung heilen. Häufiger kommt nach Frakturen die indirekte Kallusbildung vor. Hierbei heilt die Fraktur nach einer primären Inflammationsphase über Bildung eines Kallus und anschließendes Remodelling [1, 9-11].

Die in 4 Phasen eingeteilte Knochenbruchheilung geht insbesondere vom Periost aus [11]. 1. Im Rahmen des zur Fraktur führenden Traumas werden Periost und Blutgefäße zerrissen und es entsteht ein Frakturhämatom. Im Hämatom befinden sich Zellen und Faktoren, die die Knochenbruchheilung fördern [5]. 2. Es sprossen bald neue Blutgefäße ein, Fibroblasten sammeln sich an und es entsteht zunächst bindegewebiges Granulationsgewebe, der sog. weiche Kallus. In diesem bilden sich Zellen mit osteogener und chondrogener Potenz. 3. Durch die eingewanderten Zellen mit osteogener Potenz erfolgt die Bildung des harten Kallus. Dieser erhält durch Einlagerung von Kalksalzen eine feste Struktur. 4. Letztendlich kommt es durch die Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten zum Remodelling. Über Umbauvorgänge des gebildeten Kallus wird eine der ursprünglichen Knochenkonfiguration entsprechende Form erreicht [3, 5].

1.3 Osteitis: Definition und Klassifikation

Die Osteitis ist definiert als eine Entzündung des Knochens. Hierbei können alle Anteile des Knochens betroffen sein. Der Begriff Osteomyelitis wird insbesondere in den USA häufig synonym verwendet [12]. In Europa beschreibt die Osteomyelitis eine Infektion des Knochenmarkes aufgrund hämatogener Streuung ohne Vorliegen einer ossären Verletzung oder einliegenden Implantates [13, 14]. In der Arbeit wird einheitlich der Begriff Osteitis verwendet.

In der Literatur existieren unterschiedliche klinische Einteilungssysteme für die Osteitis. Wesentlich ist die Unterscheidung zwischen akuter und chronischer Osteitis. Die Grenzen zwischen diesen beiden Stadien werden in der Literatur unterschiedlich nach einem Intervall von 4 Wochen bis 8 Wochen definiert [13]. Klinisch etabliert ist eine Abgrenzung einer akuten von einer chronischen Osteitis nach einem Intervall von 4 Wochen nach Beginn einer Infektion [15]. Außerdem wird zwischen spezifischer und unspezifischer Osteitis unterschieden. Dies richtet sich nach der Ätiologie der Erkrankung. Zu den unspezifischen Osteitiden gehören eine posttraumatische, hämatogene, plasmazelluläre, primär chronisch sklerosierende Entstehung, eine Infektion *per continuitatem* oder ein Brodie-Abszess. Spezifische Osteitiden haben spezifische Erreger als Ursache [16]. Eine Untergruppierung der unspezifischen

Unspezifische Osteomyelitis	
Akut:	Endogene hämatogene Osteomyelitis Exogene, posttraumatische Osteitis
Primär chronisch:	Brodie-Abszess Plasmazelluläre oder sklerosierende Osteomyelitis
Sekundär chronisch:	Aus einer akuten Form hervorgegangene Chronifizierung
Spezifische Osteomyelitis	
Osteitis infolge	<ul style="list-style-type: none"> - Mycobact. Tuberculosis - Salmonella Typhi - Treponema Pallidum - Mykosen

Tabelle 1. Einteilung der Osteomyelitis nach Niethard [17]

Osteitiden in akute primär chronische und sekundär chronische Formen ist in Tabelle 1 nach Niethard erfolgt [17]. Die in dieser Arbeit untersuchte Entität ist die akute posttraumatische Osteitis.

Im klinischen Alltag hat sich die Einteilung nach Cierny/Mader etabliert [18] (Tabelle 2). Grundlage der Einteilung nach Cierny und Mader ist die anatomische Ausbreitung des Infektes in Zusammenschau mit potenziell den Krankheitsverlauf des Patienten beeinflussenden individuellen Faktoren des Patienten.

Anatomische Ausdehnung der Infektion	
Stadium 1: medulläre Osteitis	Nekrose auf Mark und endostale Oberfläche beschränkt Ursache: Marknagelinfekt oder hämatogene Osteitis
Stadium 2: oberflächliche Osteitis	Nekrose auf Kortikalis beschränkt Ursache: Infektion von benachbartem Infektherd oder tiefer Wunde
Stadium 3: lokalisierte Osteitis	Kombination von Stadium 1 und 2, lokalisiert und mechanisch stabil Ursache: Operation, Trauma oder fortgeschrittenes Stadium 1 oder 2
Stadium 4: diffuse Osteitis	Infekt/Nekrose umfasst die ganze Zirkumferenz, mechanisch instabil Ursache: Operation, Trauma oder fortgeschrittenes Stadium 3
Physiologischer Zustand des Patienten	
A-Patient	Keine Komorbidität
B-Patient	Systemische Risikofaktoren (Bs) Lokalisierte Risikofaktoren (Bl) Systemisch und lokalisierte Risikofaktoren (Bsl)
C-Patient	Behandlung belastender als Krankheit

Tabelle 2. Einteilung der Osteomyelitis nach Cierny / Mader [18]

Darüber hinaus kann eine Einteilung anhand der Infektionsausbreitung vorgenommen werden, von der lokalisierten Osteitis bis hin zur Sepsis [19]. Eine solche Einteilung findet sich im *University of Texas Medical Branch Staging System* und unterscheidet die Osteitis des Markraumes von der Osteitis des äußeren Knochens, einer lokalisierten und einer generalisierten Osteitis [19].

Allen bisherigen Einteilungen ist gemein, dass sie zum einen nur einen geringen Beitrag zur Festlegung eines Behandlungsalgorithmus darstellen. Zum anderen ist eine Abschätzung des Krankheitsverlaufes nicht möglich.

1.4 Epidemiologie

Die Osteitis, speziell die posttraumatische Osteitis, stellt eine der schwersten Komplikationen nach Frakturen dar. Die posttraumatische Osteitis macht etwa 80% aller Knocheninfektionen aus [20]. In einer Studie wurden Häufigkeiten von Knochenbrüchen über ein großes Kollektiv an Patienten untersucht [21]. In einer Gruppe von 25- bis 74-jährigen wird die altersstandardisierte Prävalenz für Extremitätenfrakturen von 45,1% bei Männern und 31,0% bei Frauen angegeben [21]. Die Inzidenz der posttraumatischen Osteitis ist eng an die der Knochenbrüche gekoppelt. Die Häufigkeitsangaben zur Osteitis schwanken in der Literatur sehr stark und werden nach elektiven Eingriffen mit 0,1% - 1,7%, nach Versorgung geschlossener Frakturen mit 1% - 8,1% und bei versorgten offenen Frakturen verschiedener Schweregrade mit 2,7% - 43% [22, 23] angegeben.

Ein hohes Risiko für die Entstehung einer Osteitis liegt insbesondere bei mittels Implantaten versorgten Frakturen vor [24-26]. Nach der akuten Osteitis kommt es in 10% - 30% der Fälle zur Ausbildung einer chronischen Osteitis [23]. Die Häufigkeit hämatogener Osteitiden bei Kindern wird mit sinkender Inzidenz in neueren Arbeiten mit 1 pro 5000 Kinder angegeben [23]. Die am häufigsten betroffenen Knochen sind die Tibia, das Femur und der Humerus in ähnlicher Häufigkeit [27].

1.5 Erregerspektrum

Eine Osteitis wird durch eine nicht erfolgreiche Immunabwehr auf in das Gewebe eingedrungene Bakterien verursacht. Das Spektrum der Auslöser insgesamt ist breit. Bei offenen Verletzungen hängt dies davon ab, welche Bakterien von außen in die Wunde eindringen und sich erfolgreich im Milieu der Verletzung etablieren. Am häufigsten ursächlich für eine Osteitis nach Durchführung einer Frakturbehandlung mittels Osteosynthese sind insgesamt nosokomial eingebrachte Erreger [28].

In Zusammenschau aller auftretenden Knocheninfekte zeigt sich als häufigster Keim *Staphylococcus aureus*, der ca. 50-70% aller Osteitiden verursacht [29-

32]. Andere Keime spielen in Abhängigkeit der Patienten und Traumaereigenschaften eine große Rolle. Häufig ist zudem *Staphylococcus epidermidis* mit 30% Beteiligung an Osteitiden insgesamt. Pseudomonaden spielen besonders bei Verletzungen der Füße eine Rolle [33]. Nach offenen Frakturen tritt häufig die Pathogenität anaerober Erreger in Erscheinung. Bei Kindern spielen *Streptococci der Gruppe B* und *Hämophilus influenzae* eine wichtigere Rolle. Ein erweitertes Keimspektrum kommt bei Patienten unter Immunsuppression und bei Problemwunden wie diabetischen Füßen zum Tragen. In vielen dieser Fälle kommen Mischinfektionen verschiedener Keimspezies und häufig gramnegative Keime. Die häufigsten Vertreter dieser Art sind *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* [32-37].

1.6 Pathophysiologie

Die Entstehung einer Osteitis beruht auf der Störung eines Gleichgewichtes der Wirt – Bakterien – Beziehung [38]. Das bedeutet, dass die Osteitis Folge des Eindringens von Bakterien einerseits und der verletzungsbedingten Störung des Immunsystems des Infizierten andererseits ist [39].

Bestehen die oben genannten Voraussetzungen, kommt es zu einer unverhältnismäßigen Ansiedlung von Bakterien im entsprechenden Areal. In einem großen Teil der Fälle sind die Verursacher *Staphylococcus aureus* oder Mischinfektionen, in denen ebenfalls *Staphylococcus aureus* oder *Staphylococcus epidermidis* eine Rolle spielen [20, 40].

Die mitunter großen Oberflächen der eingesetzten Implantate zur Bruchheilung stellen einen großen Risikofaktor dar. Bakterien haben die Eigenschaft, dass sie bei im Gewebe vorliegenden Fremdkörpern, insbesondere bei Kontakt mit Implantaten, sogenannten *Biofilm* bilden können [41]. Hierbei handelt es sich um feste Bakterienverbände, die mittels Bildung von *Adhesinen* anheften, sich mit einer Polysaccharidhülle umgeben und sich so vor äußeren Einflüssen, wie etwa Antibiotika oder Abwehrzellen des Immunsystems schützen [33, 42-44]. Es herrschen innerhalb dieser Verbände Mechanismen, die mittels *Quorum sensing*, das heißt durch verschiedene chemotaktische Signalwege und Gentransfer zu einer artinternen und sogar artübergreifenden Reaktion auf äußere Einflüsse führt und hierdurch zusätzlich eine Behandlung von außen erschwert [45].

Infolge der bakteriellen Besiedelung kommt es zu einer Entzündungsreaktion mit Aktivierung des spezifischen und unspezifischen Immunsystems. Durch Einwanderung von immunkompetenten Zellen kommt es zu strukturellen Veränderungen des umliegenden Gewebes. Es werden Immunzellen und Immundefaktoren herbeigerufen und die entsprechenden Abwehrmechanismen beginnen [46]. Unter anderem neutrophile Granulozyten und Makrophagen häufen sich im infizierten Areal an. Verschiedene Entzündungsmediatoren, insbesondere Interleukine aber auch Tumornekrosefaktor- α (TNF α) werden ausgeschüttet und T-Helferzellen aktiviert [47]. Mehrheitlich kann der Infektionsherd durch die Aktivierung des Immunsystems lokal begrenzt werden. Systemische Infektzeichen sind daher selten. Allerdings ist eine vollständige Infektabwehr durch das Immunsystem ebenfalls oft nicht möglich [48]. Wesentliche Gründe hierfür sind die strukturellen Eigenschaften des Knochens und die Biofilmbildung auf Implantaten. Die Chronifizierung des Infektes ist häufig Folge [25, 49].

Eine Progression des Infektes kann durch verschiedene systemische Prädispositionen (Malnutrition, Leber- und Niereninsuffizienz, Diabetes Mellitus, respiratorische Insuffizienz, Immunstörungen, Malignome) oder auch durch lokale Faktoren (Ausmaß der Knochen- und Weichteilschädigung, Vorschäden, Verletzungslokalisation und Keimspezies) begünstigt werden. Auch therapieimmanente Faktoren wie Operationstechnik, Osteosynthesematerial und Hygiene spielen hier eine Rolle [13, 50]. Viele dieser verschlechternden Eigenschaften beruhen darauf, dass die Durchblutung kompromittiert wird [40]. Insbesondere ist es so, dass in nichtdurchbluteten Geweben wie avitalem Knochen oder Implantaten und Fremdkörpern keine Abwehrvorgänge stattfinden können. Nichtsdestotrotz ist die Ernährung für Bakterien nicht gestört [16].

1.7 Diagnostik und Krankheitsverlauf

Die Grundpfeiler der Diagnostik einer Osteitis werden von klinischen, radiologischen und mikrobiologischen Untersuchungen gebildet [10, 25, 31, 32, 35]. Die Abschätzung des Krankheitsverlaufes anhand klinischer und radiologischer Kriterien ist allerdings schwierig. Die klinischen und radiologischen Kriterien korrelieren nicht zwangsläufig mit dem Grad der Infektion. Insbesondere klinische Zeichen sind schwierig zu objektivieren und

zu messen. Gründe hierfür sind unter anderem fließende Übergänge zwischen akuten und chronischen Infektionen und eine individuelle Balance zwischen den verursachenden Bakterien und dem Immunsystem des Patienten.

1.1.1 Anamnese

Im Rahmen der Anamnese sollte insbesondere nach expositionellen und dispositionellen Risikofaktoren gefragt werden. Zu den expositionellen Risikofaktoren gehören zum Beispiel offene Frakturen höheren Grades, Trümmerfrakturen, multiple operative Eingriffe oder Wundheilungsstörungen. Dispositionelle Faktoren stellen unter anderem schwere Vorerkrankungen, auch Nikotin- oder Drogenabusus dar [51]. Auch Rezidive bei bereits stattgehabter Osteitis sind keine Rarität [12]. Für die Therapie von Relevanz ist zudem die detaillierte Erfassung des Behandlungsverlaufs zur Unterscheidung zwischen Früh- und Spätinfektion [35].

1.1.2 Klinik

Die klinischen Zeichen einer Osteitis sind mannigfaltig und sehr variabel. Die akute Osteitis zeigt häufig die klassischen Zeichen einer Infektion wie Fieber, Rötung und Überwärmung der Wunde [8], gegebenenfalls mit einer Wunddehiszenz, aus der vermehrt trübes bis eitriges Sekret abfließt [52, 53]. In der Regel kommt es im Abstand von 6-7 Tagen zu einer Erhöhung der Infektparameter in der laborchemischen Untersuchung des Patientenblutes. Die Bedeutsamsten sind sicherlich die Leukozytenzahl und das cytotreaktive Protein (CRP), jedoch existiert eine Anzahl weiterer Laborwerte, die in unterschiedlicher Sensibilität und Spezifität Hinweise auf eine Osteitis und deren Ausprägung geben können und im Verlauf zeigen, ob eine Verbesserung oder Verschlechterung stattfindet [13, 54, 55]. Hierzu zählen die Blutsenkungsgeschwindigkeit, das Procalcitonin (PCT), die Lactatkonzentration im Serum und die vermehrte Anzahl von spezifischen Abwehrzellen, beispielsweise Retikulozyten und neutrophile Granulozyten, im Differentialblutbild.

Während das CRP häufig nur in der akuten Phase einer Osteitis erhöht ist, weisen die Leukozytenzahlen in der Mehrzahl der Fälle auch längerfristig Werte oberhalb des Referenzbereiches auf [25, 31, 32, 35, 48, 56].

Bei der chronischen Osteitis sind die Befunde sehr unterschiedlich ausgeprägt. Als Leitsymptom kann man hier jedoch die Fistelbildung mit chronischer Eiterung bezeichnen. Eine Erhöhung der laborchemischen Infektparameter geht hiermit nicht zwingend einher [52].

1.1.3 Radiologische Untersuchungen

Ziel der radiologischen Untersuchungen ist es, das Ausmaß der Infektion im Knochen und eine Beteiligung des umliegenden Weichteilgewebes abzuschätzen. Insgesamt finden sich unterschiedliche Befunde nach angewandtem Verfahren. Es stehen zur Verfügung:

A) Sonografie

B) Projektionsradiografie (Röntgen)

C) Computertomografie (CT)

D) Magnetresonanztomografie (MRT)

E) Nuklearmedizinische Untersuchungen

A) Zur Abschätzung einer Weichteilaffektion ist die Sonografie eine kostengünstige und schonende Untersuchungsmethode. Zum direkten Nachweis einer Osteitis ist die Sonografie jedoch ungeeignet. Anhand der Sonografie können aber schnell, effektiv und nichtinvasiv z. B. Flüssigkeitsverhalte oder Abszesse erkannt werden [52, 57-60].

B) Eine wichtige Rolle steht der konventionellen Radiographie (Röntgen) zu. Es sollten immer 2 Röntgenaufnahmen des betroffenen Areals in möglichst 90° zueinander gemacht werden, um dem Untersucher so eine dreidimensionale Vorstellung zu ermöglichen. Sofern keine störenden Faktoren wie einliegendes Osteosynthesematerial, mangelnde Lagerungsfähigkeit des Patienten oder andere Überlagerungen durch röntgendichte Materialien vorliegen, sind Aussagen über verschiedene Strukturen möglich. Es kann eine eingeschränkte Aussage über den Weichteilmantel getroffen werden, einliegende röntgendichte Fremdkörper werden gesehen. Des Weiteren kann die Struktur des Knochens und der Gelenke dargestellt werden. Etwaige Auflockerungen, Frakturen oder Fortschritte in einer Frakturheilung können zudem beurteilt werden [52, 60]. Nativradiologische Zeichen einer floriden Osteitis sind Osteolysen und eine

ausbleibende Frakturheilung. Diese treten jedoch erst nach Ablauf einer gewissen Zeit in Erscheinung [57].

C) In der Computertomografie können Schichtaufnahmen und dreidimensionale Rekonstruktionen des betroffenen Areals hergestellt werden. Sie bietet eine hochauflösende Darstellung von röntgendichten Strukturen und im Vergleich zur normalen Röntgenaufnahme bereits einen deutlich höheren Weichteilkontrast. Osteolysen, Verkalkungen, Fremdkörper oder Sequester können hier deutlich besser gesehen werden, als in den nativradiologischen Aufnahmen. Auch hier ist zudem die Gabe von Kontrastmitteln möglich, die eine Beurteilung der Durchblutung des Knochens ermöglicht und Sequester darstellt [57-60].

D) Als relativ kostenintensive, jedoch insbesondere in Bezug auf Weichgewebeprozesse sehr hochwertige Untersuchung steht die Magnetresonanztomografie (MRT) mit Kontrastmittel zur Verfügung [61]. Die MRT ist zur bildgebenden Diagnostik der Osteitis die Modalität der Wahl. Das Vorliegen und der Grad der Ausbreitung einer Entzündung kann noch genauer als in der CT erfasst werden. Die Sensitivität der Untersuchung ist insgesamt sehr hoch. Die Spezifität ist etwas geringer, da auch Ödeme, Granulationsgewebe, Fibrosen und Kallusbildung ähnlich einem entzündlichen Prozess durch Signalanhebungen dargestellt werden und oft lange posttraumatisch bestehen [58]. Die Gabe von Kontrastmittel ist wichtig, da so die Durchblutung bestimmter Areale sichtbar gemacht werden kann. Es kann eine vermehrte Perfusion im Sinne einer Entzündungsreaktion dargestellt werden. Auch minderdurchblutete Gewebe können hierdurch identifiziert und als potenzieller Infektfokus ausgemacht werden [62].

E) Mittels Szintigrafie und Positronen-Emissions-Tomografie (PET)/CT mit Fluordesoxyglukose (FDG) können fortführende radiologische Untersuchungen erbracht werden [19, 60, 63]. Die Ganzkörperskelettszintigrafie erlaubt die rasche Beurteilung des gesamten Körpers. Insbesondere in der nuklearmedizinischen Diagnostik mittels PET/CT erreicht man heute eine gleichsam hohe Sensitivität und Spezifität von 91% [57, 63]. Eine Einschränkung der Beurteilung durch etwaige Metallimplantate besteht nicht. In der FDG-PET kann bei sehr guter anatomischer Darstellung eine Osteitis sehr spezifisch bei gleichzeitig hoher Sensitivität diagnostiziert werden. Entzündliche

Prozesse in Knochen und Weichgeweben führen zu einer Signalanreicherung [64].

Im klinischen Alltag spielt jedoch in der Verlaufsbeurteilung der akuten posttraumatischen Osteitis aufwändige PET/CT-Untersuchung und auch das MRT noch eine untergeordnete Rolle. Wichtiger ist hierzu die radiologische Beurteilung der Frakturheilung im konventionellen Röntgenbild oder CT [57-60, 64].

1.1.4 Mikrobiologische Untersuchung

Die Identifikation des auslösenden Pathogens ist von großer Bedeutung zur Festlegung der Behandlungsstrategie. Es lassen sich in der mikrobiologischen Untersuchung nach entsprechender Behandlung nicht nur Aussagen über das Erregerspektrum, sondern auch über Resistenzen gegenüber Antibiotika machen. Der Keimnachweis ist daher für das therapeutische Vorgehen relevant [33]. Hierzu sollten, sofern möglich, Proben des infizierten Gewebes genommen werden. Reine Abstriche im Gegensatz zu Gewebeproben haben eine deutlich geringere Aussagekraft über das vorhandene Keimspektrum [15].

Bei Kenntnis des Keims und dessen Resistenzprofiles sind lokale Antibiotikatherapien möglich. Die Bakterienart kann auch wesentlich die chirurgische Therapie beeinflussen. Während multisensiblen Keimen das alleinige chirurgische Debridement unter Erhalt des Knochens zur Ausheilung führen kann, sind bei multiresistenten Keimen gegebenenfalls die Entfernung von Implantaten oder Knochen bis hin zu Amputationen notwendig.

Über die Bestimmung der Keimzahl kann eine Aussage über die Besiedelungsdichte gemacht werden [12, 33]. Im klinischen Alltag erfolgt eine grobe Abschätzung der Keimzahl durch die Abstufungen

- Ganz vereinzelt
- Vereinzelt
- Mäßig
- Reichlich

Diese Einteilung wird anhand der Anzahl gewachsener Bakterienkolonien nach Bebrütung einer ausgestrichenen Gewebeprobe auf einem Nährmedium erhoben.

1.1.5 Histologische Untersuchung

Während die mikrobiologische Untersuchung indirekt eine Infektion nachweist, gelingt der direkte Nachweis einer vorliegenden Osteitis in der histologischen Untersuchung von Gewebeproben. In unterschiedlicher Ausprägung je nach Fortschreiten der Infektion zeigen sich unterschiedliche Veränderungen im Gewebe des Knochens und der umliegenden Weichteile [13]. Um diese sichtbar zu machen, werden Gewebeproben entsprechend bearbeitet. Histologische Analysen des Knochens können sowohl mit als auch ohne Entkalkung erfolgen. Anhand von Untersuchungen ohne Entkalkung können insbesondere die Kallusbildung und der Bau des kalzifizierten Knochens beurteilt werden [65, 66]. Alternativ erfolgt die Einbettung in Paraffin nach Entkalkung. Die hieraus gefertigten Schnitte werden mittels Färbung mikroskopisch beurteilbar gemacht und untersucht. Es stehen für verschiedene Fragestellungen zahlreiche unterschiedliche Färbemethoden zur Verfügung. Im nicht entkalkten Knochen können phosphatreiche Strukturen wie sie in Osteoblasten und Osteoklasten vorkommen durch die Silberfärbung nach *Von-Kossa* sichtbar gemacht werden [65]. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen an entkalkten Schnitten durchgeführt, die mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und mittels Giemsa-Färbung bearbeitet wurden. In der HE-Färbung werden alle basophilen Strukturen bläulich und acidophile Strukturen rötlich gefärbt. Dies ergibt eine gute Übersicht im gesamten Schnitt. Die Giemsa-Färbung bewirkt ein ähnliches Erscheinungsbild, in dem Zellkerne jedoch kräftig blau auffallen. So können beispielsweise Bakterien gut im Gewebe visualisiert werden [65].

In der histologischen Beurteilung von Ostitiden findet man unterschiedliche Bilder bei akuten und chronischen Verläufen.

In der akuten Osteitis sieht man histologisch eine lokale Anhäufung von neutrophilen Granulozyten begleitet von diffusem oder gruppiertem entzündlichem Infiltrat mit Granulozytenapoptosen. Ein Markraumödem, reduzierte bzw. fehlende Hämatopoese, hyperämische Blutgefäße, Fibrinpräzipitate und nekrotische Knochentrabekel mit Totenlade gehören ebenfalls zum Bild [4, 8, 13, 16, 56]. Die histologische Übersicht zeigt einen Strukturverlust des Knochenmarkes. Im weiteren Verlauf der Osteitis erkennt man zusätzlich fehlende Kallusbildung und mangelndes Remodelling [13].

Chronisch infizierte Knochen zeigen dagegen ein eher Plasmazellreiches entzündliches Infiltrat mit wenigen neutrophilen Granulozyten und einer Markraumfibrose. Bei Übergreifen der Osteitis vom Markraum auf den kortikalen Knochenanteil kann es zu reaktiver Knochenneubildung um den nekrotisch gewordenen Knochen kommen [13, 67].

1.8 Grundsätze der Therapie

Primäres Ziel einer jeden Behandlung ist die Infektsanierung. Dabei sollen Form und Funktion des betroffenen Körperteils wenn möglich erhalten bleiben [32, 52].

Die Therapie der Osteitis basiert auf einem etablierten Algorithmus. Zu Beginn steht das radikale chirurgische Debridement mit Entfernung allen infizierten Gewebes [32]. Hierbei werden ebenfalls Proben zur mikrobiologischen und histologischen Untersuchung gewonnen. Hiernach steht supportiv die lokale oder systemische medikamentöse Therapie mit Antibiotika [10, 52, 68].

Insbesondere beim Vorliegen eines postoperativen Frühinfektes, eines Abszesses und bei chronischen Osteitiden muss primär eine chirurgische Behandlung erfolgen, in der sämtliche Entzündungsherde ausgeräumt, Fremdkörper und Sequester entfernt und saubere Wundverhältnisse geschaffen werden [10, 33, 52, 55, 69]. Das Vorgehen in Bezug auf einliegende Implantate wird dadurch bestimmt, ob ein Früh- oder ein Spätinfekt vorliegt. Ebenso ist von Relevanz, wie weit die knöchernen Konsolidierung fortgeschritten ist. Während bei Frühinfekten eine Infektsanierung unter Erhalt der einliegenden Osteosynthesematerialien versucht werden kann, wird bei chronischen Infekten regelhaft eine Implantatentfernung empfohlen. In Abhängigkeit der Ausdehnung des Knocheninfektes und des so chirurgisch sanierten Gebietes entsteht mitunter eine Defektzone. Diese Defektzonen können den Knochen oder die den Knochen umhüllende Weichgewebestruktur sein. Es stehen hiernach komplexe Möglichkeiten der Weiterbehandlung zur Verfügung, die von einer vorübergehenden Vakuumversiegelung, also einer *VAC-Therapie* [55] über Osteosyntheseverfahren mit neuen Implantaten oder Zuhilfenahme von externen Fixateuren und Kallusdistraction bis hin zur plastischen Weichteildeckung führen [33, 52, 69].

Die Gabe von Antibiotika erfolgt supportiv zur chirurgischen Therapie. Eine kalkulierte Antibiotikatherapie ohne Kenntnis des auslösenden Keims sollte möglichst vermieden werden [70]. Wenn Antibiotika verabreicht werden, soll dies nur nach vorheriger Erregeridentifikation und entsprechend eines erstellten Antibiogrammes erfolgen. Ansonsten besteht ein erhöhtes Risiko, ein Wachstum antibiotikaresistenter Spezies zu begünstigen. Es wird dazu geraten, nur bei akutem Infekt mit drohender Sepsis sowie bei der fehlenden Möglichkeit der Probengewinnung zur mikrobiologischen Untersuchung auf eine kalkulierte Therapie zurückzugreifen. Ansonsten sollte eine resistenzgerechte Antibiose erfolgen [52, 55]. Bei der empirischen Antibiotikagabe muss die Form der Osteitis bei der Auswahl des Antibiotikums berücksichtigt werden, da je nach Ursache der Infektion häufig unterschiedliche Keime vorkommen [15]. Grundsätzlich kann die Antibiotikatherapie lokal durch Einbringen eines Antibiotikaträgers in das infizierte Gewebe oder systemisch über orale oder intravenöse Applikation erfolgen. Beides kann auch kombiniert werden [25, 33, 49, 70].

1.9 Existierende Scores zur Einteilung der Osteitis

Neben gängigen klinischen Scores existieren in der Literatur verschiedene Versuche, die Osteitis zur Beurteilung des Verlaufes auch unter Berücksichtigung der erwähnten Kriterien in verschiedene Stadien einzuteilen. Solche Einteilungen gibt es für die Osteitis beim Menschen und bei verschiedenen Tiermodellen. Eine Übersicht der wichtigsten Klassifikationen ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Klassifikation	Eingeschlossene Kriterien	Einteilung
Waldvogel et al.	Anatomischer Ursprung	Nach Ursprungsort
Ciorny / Mader	Anatomische Ausbreitung, physiologischer Zustand des Patienten	Stadium 1 – 4, zusätzlich Einteilung der Patienten in Kategorie A - C
Osteitis-Definition-Score	Anamnese, Klinik, Bildgebung, Bakteriologie, Histologie	1 – 18 Punkte (18 Punkte = sichere Osteomyelitis)

Tabelle 3. Übersicht über existierende Klassifikationen der Osteitis

In der Vergangenheit teilte man die Osteomyelitis nach Waldvogel et al. entsprechend dem Ursprung der Osteitis ein [33]. Alternativ besteht die Möglichkeit der weiterhin klinisch relevanten Einteilung nach Ciorny / Mader die

die anatomische Ausbreitung der Infektion und dem Status des Erkrankten Individuums bezüglich Komorbiditäten zugrunde legt [18].

Der für den Menschen aktuell bedeutsamste wurde 2011 als Osteitis-Definition-Score von Schmidt et. al eingeführt [12]. Hierbei handelt es sich um einen aus 5 Kriterien bestehenden Score, bei dem maximal 30 Punkte erreicht werden können. Einbezogen werden erstens die Anamnese, zweitens der klinische Befund und Laborwerte, drittens bildgebende Diagnostik, viertens Bakteriologie und fünftens die Histologie. Für jedes Kriterium können maximal 6 Punkte erreicht werden. Der Score geht bei über 18 Punkten vom sicheren Vorliegen einer Osteomyelitis aus, unter 8 Punkten ist eine Osteomyelitis möglich und zwischen 8 und 17 Punkten wird die Osteomyelitis als wahrscheinlich gesehen [12].

Ebenfalls gibt es Tierversuchsmodelle, die zur Untersuchung der Osteitis dienen [71, 72]. Eine Einteilung der Schweregrade wird hier teilweise durchgeführt. Diese orientiert sich in der Regel am bereits für den Menschen entwickelten und existenten Osteitis-Definition-Score [12] oder an der Cierny / Mader Einteilung. Darüber hinaus wurde aktuell ein radiologischer Score an der Maus eingeführt [73].

1.10 Existierende Tiermodelle der Osteitis

In dieser Arbeit dienen Mäuse des Stammes BALB/c der Untersuchung. Bei den bereits existierenden Tiermodellen wurden mannigfaltige Untersuchungen zur Diagnostik und Therapie der Osteomyelitis durchgeführt [71, 72, 74].

Tiermodelle zur Untersuchung der Osteitis existieren neben dem Mausmodell auch bei der Ratte als etabliertes Modell für chronische und akute Osteitiden, wobei verschiedene Studien auch zur implantatassoziierten Osteitis und der Besonderheit der Bildung des Biofilms durchgeführt wurden [75-77].

Verbreitet ist auch bereits seit den 1940er Jahren die Verwendung von Kaninchen als Versuchstier. Hier wurden im Wesentlichen Versuche zur systemischen Antibiose durchgeführt, auch über lange Zeiträume [78-80].

Weiter wurden eine Reihe an Untersuchungen mit größeren Tieren wie Schweinen, Hunden, Schafen und Ziegen durchgeführt, wobei hier aufgrund deutlich aufwändigerer Haltung und Kosten Schwierigkeiten entstehen und meist geringe Fallzahlen möglich sind. Vorteile bieten diese Tiere durch die im

Maßstab dem Menschen ähnliche Anatomie. Es können also prinzipiell Implantate für den Menschen genutzt werden. Auch sind hier Revisionseingriffe und aufwändigere chirurgische Techniken möglich [81-83].

An Hühnern wurden Versuche zur nichttraumatischen hämatogenen Osteitis durchgeführt [84].

1.11 Besonderheiten der Osteitis an der Maus

Die Maus hat sich zur Untersuchung von *Staphylococcus aureus* bezogenen Infektionen etabliert [85]. Hierbei ist zu beachten, dass Unterschiede bestehen, je nachdem von welchem genetischen Typ die entsprechenden Versuchstiere stammen. Die von uns untersuchten Tiere des Stammes BALB/c zeigen eine besonders hohe Mortalität und Morbidität in Bezug auf Infektionen, während beispielsweise Mäuse vom Stamm C57BL/6 eine wesentlich höhere Resistenz aufweisen [86]. Die Ursache liegt am Ehesten in der Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten, an den Ort der Infektion zu migrieren und dort entsprechend zu wirken [86]. Im Vergleich zum Menschen verfügen Mäuse über eine höhere Anzahl neutrophiler Granulozyten im Knochenmark [87]. Die Knochenheilung der Maus ist im Vergleich zum Menschen unproblematisch und bereits nach einem kürzeren zeitlichen Intervall abgeschlossen [88, 89].

1.12 Zielsetzung der Arbeit

Zwar existieren eine Reihe verschiedener Scores zur Diagnostik der Osteitis, eine Abschätzung des Krankheitsverlaufes ist bisher jedoch nur eingeschränkt möglich. Während einer implantatassoziierten Osteitis beeinflussen sich die Immunreaktion gegen die Infektion und die gestörte Frakturheilung gegenseitig. Während eines Krankheitsprogresses durchlaufen beide Systeme unterschiedliche Stadien. Eine objektive Beurteilung der beteiligten Zellen an den jeweiligen Stadien kann anhand histologischer Untersuchungen erfolgen. Ziel der Arbeit war die Erstellung eines standardisierten und objektiven Messverfahrens für den Grad der Osteitis im Mausmodell anhand der histologischen Kriterien Kallusbildung, Frakturheilung, Bakterienanzahl und Markraumveränderungen. Ein solches Messverfahren kann die Grundlage zur Abschätzung des Krankheitsprogresses einer Osteitis darstellen und somit einen die Therapie beeinflussenden Wert besitzen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

HE-Färbeapparat: Tissue-Tek Prisma, Code 6133, Model Prisma E2S

Giemsa-Färbeapparat: Tissue-Tek Prisma, Code 6133, Model Prisma E2S

Mikrotom: Manuelles Mikrotom der Firma Microm, in Verwendung mit Einmal-Mikrotomklingen der Firma Feather

Objektträger: Glasobjektträger, 76 x 26mm, mit Mattrand, geschnitten und gereinigt (Engelbrecht, Edermünde, Deutschland)

Entkalkungslösung: EDTA, Einwirkzeit 7 Tage bei 36°C.

Mikroskop: Axioskop 40 (Zeiss, Jena, Deutschland). Genutzt wurde das aufrechte Lichtmikroskop ohne Verwendung von Filtern oder Fluoreszenz. Zur Digitalisierung der Bilder wurde die AxioCam MRc zum Anschluss an einem handelsüblichen Windows-PC eingesetzt.

2.1.2 Mäuse

Es wurden Wildtyp BALB/c Mäuse aus der Tierversuchsanstalt (TVA) der Uniklinik Düsseldorf behandelt und mit *Staphylococcus aureus* vom Typ ATCC 29213 infiziert.

2.2 Tierversuchsmodell

Die Tierversuche wurden von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt. Von mir wurden die gewonnenen Präparate histologisch aufbereitet und untersucht, wie in Kapitel 2.3 beschrieben. Zum besseren Verständnis wird hier ein Überblick über den Aufbau des Tiermodells und den Versuchsablauf gegeben.

2.2.1 Versuchstiere

In der Forschungsgruppe wurden Wildtyp BALB/c-Mäuse verwendet. Es handelt sich hier um Tiere, die in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-

Universität Düsseldorf gezüchtet wurden oder von der TVA bei Züchtern für Versuchstiere zugekauft wurden. In jeder Versuchsreihe wurden gleichaltrige Tiere aus demselben Wurf verwendet. Die Tierversuche waren genehmigt unter der Tierversuchsgenehmigung Nr. 87-5104.2010.A375 der LANUV NRW, Antragsteller Prof. Dr. med. S. Flohè, Datum 09.02.2011.

2.2.2 Ablauf der operativen Erstbehandlung der Mäuse

Die Tiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von Ketanest (75mg/kg KG) und 2% Xylazin (2mg/kg KG) narkotisiert. Es wurde jeweils die rechte hintere Extremität rasiert, desinfiziert und steril abgedeckt. Eine ca. 15 mm lange laterale Inzision wurde unter sterilen Kautelen vorgenommen und das Femur präpariert. Zur Herstellung der Femurfraktur wurde mit Hilfe einer Gigly-Säge ($\varnothing=0,22\text{mm}$) im mittleren Femurschaftdrittel eine Osteotomie durchgeführt. Durch Implantation einer 4-Loch winkelstabilen Platte (Länge 7,75 mm, Breite 1,5 mm, Dicke 0,7 mm, AO Foundation, Research Implants Systems, Davos, Schweiz), die mit jeweils 2 selbstschneidenden Schrauben am proximalen und distalen Fragment fixiert wurden, wurde die Osteosynthese durchgeführt. Die Fixierung mit 2 Schrauben pro Fragment war für eine sichere Stabilität von Achse, Länge und Rotation notwendig. Fraktur und Implantatlage wurden radiologisch kontrolliert. Bei einem Teil der Mäuse (Osteitisgruppe) wurden zur Induktion einer Osteitis 10^3 colony forming units (CFU) von *Staphylococcus aureus* vor Wundverschluss inokuliert. Anschließend erfolgte der Wundverschluss in Einzelknopfnahntechnik.

2.2.3 Postoperative Behandlung der Mäuse

Die Tiere wurden postoperativ in der Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf gehalten und von geschultem Personal und unter tierärztlicher Aufsicht geführt. Es erfolgte die Ernährung der Tiere mit speziellem für Versuchstiere vorgesehenem Nahrungsmittel. Nach Protokoll erfolgte die Schmerztherapie der Tiere im Sinne der Gabe von 5 mg/kg Körpergewicht Meloxicam täglich [90].

2.2.4 Ablauf des Zweiteingriffes und Euthanasie

Nach 7, 14 und 28 Tagen erfolgte die Tötung der Tiere der entsprechenden Gruppe in Narkose mittels zervikaler Dislokation. Hiernach wurden die voroperierten Femura unter sterilen Kautelen entnommen. Die Implantate wurden vollständig entfernt. Die gewonnenen Knochenproben wurden in Formalinlösung gelagert.

2.3 Aufarbeitung der Femura

Die in diesem Kapitel aufgeführten Arbeitsschritte wurden von mir durchgeführt.

Für die Experimente standen Oberschenkelknochen (Femura) von insgesamt 35 BALB/c-Mäusen zur Verfügung. Die Femura wurden in eine Kontrollgruppe (n=8) und eine Osteitisgruppe (n=27) unterteilt. Die Kontrollgruppe bestand aus Oberschenkelknochen, bei denen während des Ersteingriffes die Osteotomie und Plattenosteosynthese ohne Infektion durchgeführt wurde. Bei der Osteitisgruppe erfolgte zusätzlich die Inokulation von *Staphylococcus aureus* in den Frakturspalt. Die Femura wurden nach 7, 14 oder 28 Tagen gewonnen und histologisch untersucht. Eine Übersicht hierüber zeigt Tabelle 4.

Anzahl Tiere	nach 7 Tagen	nach 14 Tagen	nach 28 Tagen
Kontrollgruppe	4	0	4
Osteitisgruppe	5	4	18

Tabelle 4. Anzahl der Tiere pro Gruppe

Es erfolgte die Entkalkung der Knochenproben in EDTA für jeweils 7 Tage und abschließend die Spülung in destilliertem Wasser für weitere 12 Stunden bei 36° Temperatur. Danach wurden die gewonnenen entkalkten Proben in Paraffin gebettet. Aus den so hergestellten Blöcken wurden im Mikrotom Längsschnitte durch den Knochen hergestellt. Diese wurden dann maschinell mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) oder Giemsa-Färbung aufbereitet und mikroskopisch untersucht. Es wurden jeweils Untersuchungen in 10-facher, 40-facher und 100-facher Vergrößerung durchgeführt, wobei bei 100-facher Vergrößerung ein optisches Dispenser-Öl zum Einsatz kam.

2.4 Histologischer Score

Der erstellte Score besteht auf den 4 histologisch bestimmten Parametern

1. Kallusbildung
2. Frakturkonsolidierung
3. Strukturveränderungen des Markraumes
4. Bakterienanzahl

Diese sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Jeder Parameter wurde entsprechend seiner Bedeutung innerhalb des Krankheitsverlaufes einer Osteitis unterschiedlich gewichtet. Die Wichtung erfolgte auf der Basis der klinischen Erfahrung (siehe Kapitel 2.4.5). Im Folgenden werden die ermittelten Punktzahlen in den untersuchten Mäusen angegeben und beschrieben. Insgesamt konnten Punktwerte zwischen 4 und 27 Punkten erreicht werden. Je niedriger die Gesamtpunktzahl ist, desto wahrscheinlicher ist eine Osteitis.

Parameter	Punktzahl	Bedeutung
Kallusbildung	6	Viel Kallusbildung
	3	Wenig Kallusbildung
	1	Keine Kallusbildung
Frakturheilung	12	Vollständige Durchbauung
	6	Keine vollständige Heilung
	1	Destruktion
Markraumveränderungen	6	Physiologische Verhältnisse
	3	Unregelmäßige Zellstruktur
	1	Nekrosen
Bakterienanzahl	3	Wenige Bakterien
	2	Mäßig viele Bakterien
	1	Viele Bakterien

Tabelle 5. Übersicht der Punktzahlen pro jeweiligem Parameter

2.4.1 Bestimmung des Ausmaßes der Kallusbildung

Es wurde in den histologischen Schnitten jeweils in den mittels HE-Färbung hergestellten Präparaten an repräsentativer Stelle auf Höhe der Fraktur eine Messung der Kortikalisbreite vorgenommen. Dies geschah unter Nutzung der computergestützten Mikroskopie anhand der Messfunktion der mitgelieferten

Software. Es wurde hierzu jeweils in vierfacher Vergrößerung die Stelle der Kortikalis gemessen, die dem breitesten Abschnitt unmittelbar an der Fraktur entsprach. Die Messung des Referenzwertes wurde in einem sicher außerhalb eines etwaigen Kallus liegenden Abschnitt des Femurschaftes vorgenommen.

Aus den ermittelten Messwerten konnte nun eine Relation von Kallus zu Kortikalis bestimmt und eine Punktzahl vergeben werden.

Parameter	Punktzahl	Bedeutung	Maß
Kallusbildung	6	Viel Kallusbildung	Quotient $>1,6$
	3	Wenig Kallusbildung	Quotient $1,1-1,6$
	1	Keine Kallusbildung	Quotient $<1,1$

Tabelle 6. Punktwerte für den Parameter Kallusbildung

Hierbei erwies sich die Einteilung in 1. Viel (Quotient Kallus/Kortikalis $>1,6$) (Abbildung 1a), 2. Wenig (Quotient $1,1-1,6$) (Abbildung 1b) und 3. keine Kallusbildung (Quotient $<1,1$) (Abbildung 1c) als sinnvoll. Das Ausmaß der Kallusbildung wurde mit Punkten bewertet (Viel Kallus: 6 Punkte, wenig Kallus: 3 Punkte und keine Kallusbildung: 1 Punkt) (Tabelle 6).

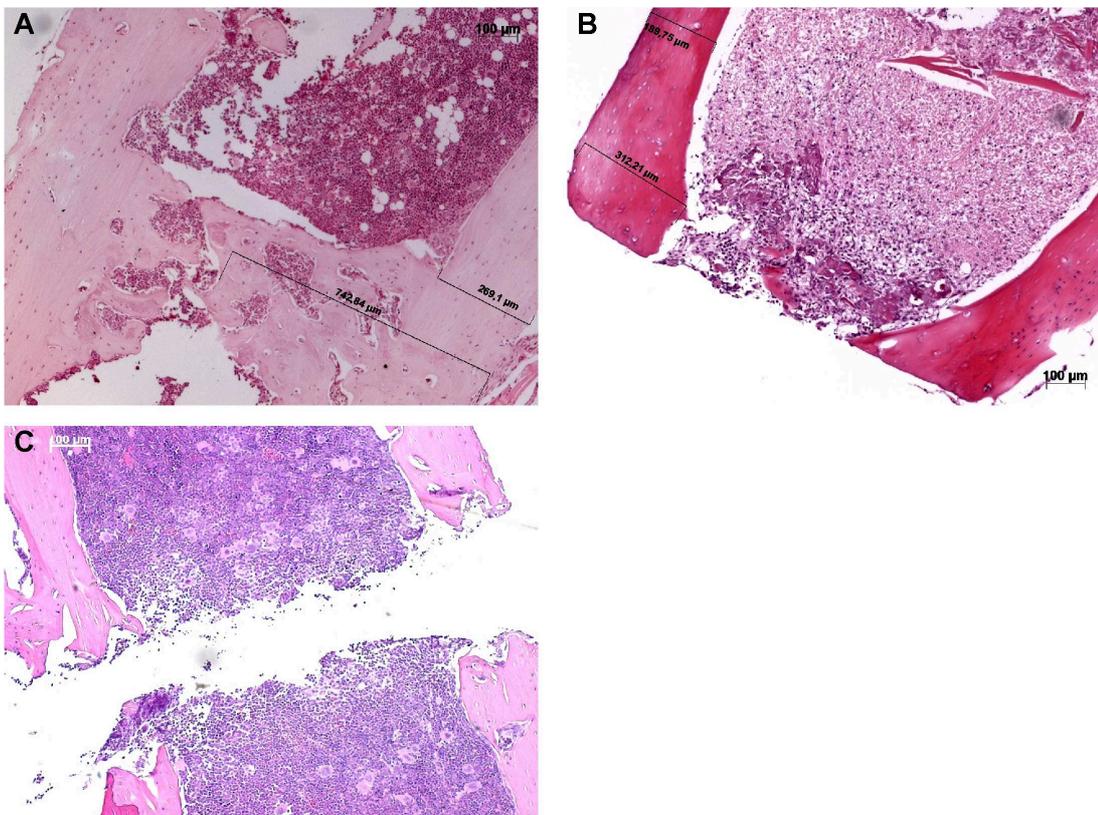


Abbildung 1. Kallusbildung: Repräsentative Schnitte zur Beurteilung der Kallusbildung in jeweils 10-facher Vergrößerung. A. viel Kallus (HE-Färbung), B. wenig Kallus (Giemsa-Färbung), C. kein Kallus (HE-Färbung)

2.4.2 Bestimmung des Grades der Frakturkonsolidierung

Das Ausmaß der Frakturkonsolidierung wurde bestimmt, indem im histologischen Schnitt betrachtet wurde, wie weit der Osteotomiespalt bereits verheilt ist. Es wurden zwischen 1 und 12 Punkte vergeben (Tabelle 7). Für

Parameter	Punktzahl	Bedeutung	Maß
Frakturkonsolidierung	12	Vollständige Durchbauung	Frakturspalt komplett durchbaut, ggf. erfolgtes Remodelling
	6	Keine vollständige Heilung	Unvollständige Durchbauung
	1	Destruktion	Verschmächtigung der Kortikalis

Tabelle 7. Punktwerte für den Parameter Frakturkonsolidierung

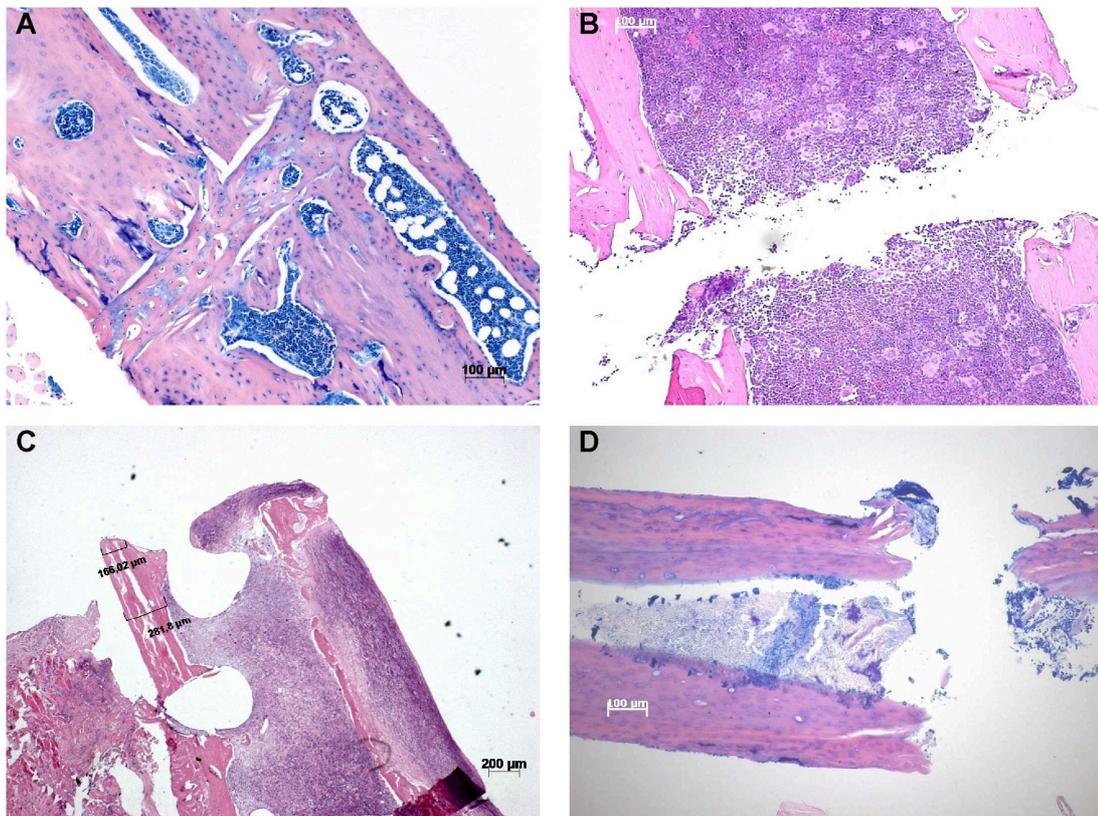


Abbildung 2. Frakturkonsolidierung: Repräsentative Schnitte zu Beurteilung der Frakturdurchbauung. A. vollständige Durchbauung (Giemsa-Färbung, 10-fache Vergrößerung), B. keine Frakturheilung (HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung, vergleiche Abb. 1C), C. und D. Destruktionen (HE-Färbung, je 4-fache Vergrößerung)

einen vollständig verheilten Osteotomiespalt wurden 12 Punkte vergeben, wobei hier die Voraussetzung mindestens eine vollständige Durchbauung mit Knochensubstanz (Abbildung 2a) oder bereits erfolgtes Remodelling war. War

die Fraktur nicht vollständig knöchern durchbaut (Abbildung 2b), wurde dies als keine Frakturkonsolidierung mit 6 Punkten bewertet. Im Falle einer Destruktion im Bereich des ehemaligen Osteotomiespaltes wurde nur ein Punkt vergeben, wie dies an der verschmächtigten Kortikalis im Frakturbereich auf Abbildung 2c und d gezeigt wird.

2.4.3 Bestimmung der Strukturveränderungen des Markraumes

In der Übersichtsvergrößerung der Schnitte lassen sich insbesondere in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung strukturelle Markraumveränderungen der untersuchten Knochen erkennen. Diese entsprechen der zellulären Reaktion auf eine Infektion im Sinne einer Immunantwort. Im Falle einer nicht gelungenen Immunabwehr kann es zu Nekrosen im Markraum kommen. Dies ist Ausdruck einer fulminanten Osteitis. Es wurden hier zwischen 6 und 1 Punkt vergeben. Die mit 6 Punkten höchste Punktzahl wurde für physiologische Verhältnisse im Knochenmark vergeben. Die Übersichtsaufnahme zeigt eine geordnete Struktur im gesamten Markraum mit gleichmäßiger Anordnung von Knochenmarkzellen und ohne Anhäufung von Immunkompetenten Zellen wie Granulozyten und keine Zellarmut (Abbildung 3a). 3 Punkte wurden dann vergeben, wenn in der Übersicht ein unregelmäßiges Zellbild sichtbar war (Abbildung 3b). Dies entsprach einer erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten und anderer immunkompetenter Zellen und wurde als Immunreaktion gewertet. Einen Punkt wurde vergeben, wenn im Markraum Nekrosen ohne vitale Zellen nachweisbar waren (Abbildung 3c). Die Wichtung des Parameters „Markraumveränderungen“ ist in Tabelle 8 aufgeführt.

Parameter	Punktzahl	Bedeutung	Maß
Markraum- veränderungen	6	Physiologische Verhältnisse	Geordnete Zellstruktur, wenige Abwehrzellen
	3	Unregelmäßige Zellstruktur	Ungeordnete Zellstruktur mit Anhäufung von Immunzellen
	1	Nekrosen	Avitale Areale im Markraum

Tabelle 8. Punktwerte für den Parameter Markraumveränderungen

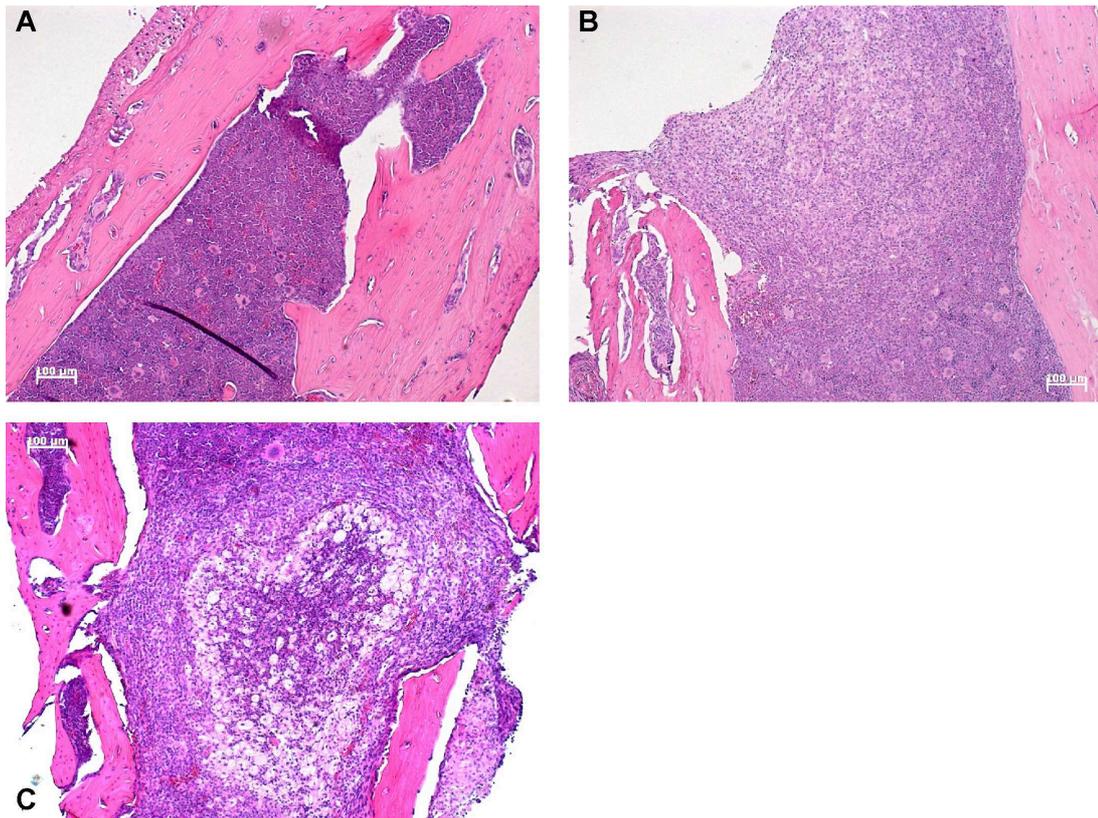


Abbildung 3. Markraumveränderungen: Repräsentative Schnitte zu Beurteilung der Markraumveränderungen in 10-facher Vergrößerung und HE-Färbung. A. physiologischer Aufbau, B. unregelmäßige Struktur, C. nekrotische Areale

2.4.4 Bestimmung der Bakterienzahl

Der alleinige Nachweis von Bakterien im Präparat ist kein sicherer Nachweis einer Infektion. Histologisch weist die Anzahl der Bakterien allerdings auf eine mögliche Infektion unterschiedlicher Ausprägung hin. Die Bakterienanzahl im Präparat gibt eine direkte Auskunft über den Grad der Kontamination, aus der sich die Wahrscheinlichkeit einer Osteitis ableiten lässt. Zur Messung der Bakterienanzahl in den Proben wurden die Knochen nach der *Hot-Spot-Methode* betrachtet. Hier wurde ein Areal mit besonders vielen Bakterien aufgesucht. Die Bakterien in dieser Region wurden in einem Ausmaß von 20 Gesichtsfeldern bei 100-facher Vergrößerung in der Giemsa-Färbung gezählt. Über 10 Bakteriengruppen wurden als „viel“ eingestuft und mit 1 Punkt bewertet. Zwischen 4 und 10 Bakteriengruppen wurden als „mäßig“ und mit 2 Punkten bewertet. Unter 4 Bakteriengruppen wurden als „wenig“ und mit 3 Punkten bewertet. Abbildung 4a zeigt beispielhaft bei nur 40-facher Vergrößerung einen größeren Bereich, in dem keine Bakterien vorhanden sind. In Abbildung 4b ist ein Gesichtsfeld in 100-facher Vergrößerung mit bereits 3

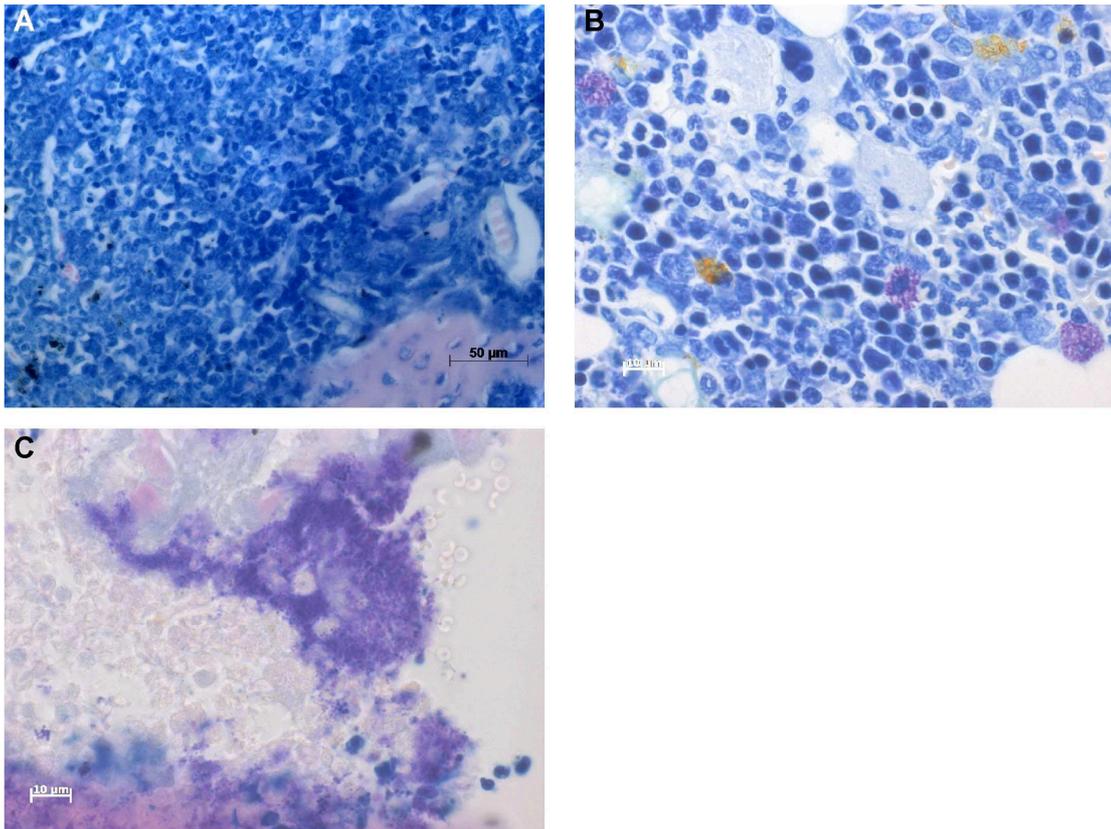


Abbildung 4. Bakterienanzahl: Repräsentative Schnitte zur Messung der Bakterienzahl (Giemsa-Färbung), A. keine Bakterien (40-fache Vergrößerung), B. mäßig viele Bakterien (100-fache Vergrößerung), C. viele Bakterien (100-fache Vergrößerung)

Gruppierungen von Bakterien zu sehen. Abbildung 4c zeigt ein Gesichtsfeld einer mit „vielen“ Bakterienkolonien (>10) befallenen Probe. Die Übersichten der Wichtungen des Parameters „Bakterienanzahl“ zeigt Tabelle 9.

Parameter	Punktzahl	Bedeutung	Maß
Bakterienanzahl	3	Wenige Bakterien	<4/20 Gesichtsfelder
	2	Mäßig viele Bakterien	4-10/20 Gesichtsfelder
	1	Viele Bakterien	>10/20 Gesichtsfelder

Tabelle 9. Punktwerte für den Parameter Bakterienanzahl

2.4.5 Errechnung der Gesamtpunktzahl und deren Wertung

Aus den einzelnen Parametern wird durch einfache Addition die Gesamtpunktzahl errechnet. Diese gibt den Schweregrad der Osteitis an. Wesentliche sich gegenseitig beeinflussende Aspekte der Osteitis sind zum einen der Prozess der Frakturheilung und zum anderen die Progression der Infektion. Zur histologischen Abschätzung der Krankheit im Ganzen wurden die jeweiligen Parameter in der unterschiedlichen Bedeutung zu verschiedenen

Zeitpunkten im Krankheitsverlauf. Die Wichtung erfolgte hierbei auf der Basis der klinischen Erfahrung.

In der Gesamtsumme können maximal 27 Punkte erreicht werden. 27 Punkte entsprechen einer regelrechten knöchernen Heilung. Eine Osteitis ist nicht vorhanden. Der Knochen ist hierbei unter Ausbildung eines Kallus bereits durchbaut, es sind keine Bakterien nachweisbar und die Markhöhle weist physiologische Verhältnisse auf. Die niedrigste mögliche Punktzahl ist 4. Dieser Punktwert weist auf eine Osteitis hin, bei der es unter fehlender Kallusbildung und Destruktionen des Knochens mit auch nekrotischen Bereichen im Markraum kam und zahlreiche Bakterien sichtbar sind. Ein niedriger Gesamtpunktwert nach bereits 7 Tagen weist auf einen Frühinfekt hin, ein niedriger Punktwert nach 28 Tagen spricht für eine chronische Osteitis.

Die Kallusbildung ist ein wesentliches Zeichen der Frakturheilung. Sie wurde daher hoch gewichtet. Es wurden maximal 6 Punkte vergeben, wenn bereits viel Kallus gebildet wurde und eine Osteitis eher nicht wahrscheinlich ist. Hat sich überhaupt kein Kallus bildet wird die Osteitis wieder wahrscheinlicher und nur ein Punkt wird gegeben.

Der Nachweis einer vollständigen Frakturheilung schließt eine Infektion nahezu aus. Daher wird eine vollständige Frakturheilung am höchsten mit 12 Punkten bewertet. Bei einer nicht abgeschlossenen, jedoch voranschreitenden Heilung ist eine Osteitis nicht ausgeschlossen, so dass hier 6 Punkte vergeben werden. Eine Destruktion des Knochengewebes um die Osteotomie herum ist ein starker Hinweis für eine Osteitis und wurde mit nur einem Punkt bewertet.

Eine Markraumnekrose ist ohne Infektion bei der Maus sehr unwahrscheinlich. Geringgradige, temporäre strukturelle Veränderungen sind physiologisch auch im Rahmen der normalen Frakturheilung möglich, schließen eine Infektion jedoch nicht aus. Daher wurden Markraumveränderungen mit einem bis sechs Punkten bewertet.

Die histologische Unterscheidung zwischen Infektion und Kontamination allein anhand der Menge der im Präparat dargestellten Bakterien ist nicht möglich. Es erfolgt daher eine geringere Wichtung dieses Parameters mit einem bis 3 Punkten.

Der Zeitpunkt der Untersuchung nach Fraktur, bzw. Osteotomie und nach Infektion sollte in unserem Score möglichst keine Rolle spielen. Eine Frakturheilung ist bei einem Tier nach 7 Tagen auch unter gesunden und sterilen Bedingungen nicht zu erwarten. Jedoch sollte bei Vorliegen gesunder Verhältnisse weder der Nachweis von zahlreichen Bakterien, noch einer gesteigerten Immunreaktion gelingen. Eine Kallusbildung ist nach einer Woche bei der Maus bereits durchaus möglich. Nach 4 Wochen dagegen kann sich die Anzahl der Bakterien bereits aufgrund der Immunreaktion verringert haben, dafür werden nun Schäden wie ausgebliebene Heilung und Nekrosen, beziehungsweise Knochendestruktionen deutlich wahrscheinlicher wenn eine Osteitis vorliegt.

2.5 Statistik

Die Gesamtzahl aller untersuchten Mäuse war 35 (n=35). Die Größe der Kontrollgruppe war 8 (n=8), die Größe der Osteitisgruppe war 27 (n=27). Diese wurden jeweils zu den oben genannten verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Zuhilfenahme der Windowsbasierten Software Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., 7825 Fay Avenue, Suite 230, La Jolla, CA 92037 USA). Die Werte sind als Median, Mittelwerte (MW) und \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Bei der Gruppenstärke von $n < 8$ wurde aufgrund der kleinen Anzahl von Individuen keine statistische Auswertung für die jeweiligen Zeiträume 1, 2 und 4 Wochen vorgenommen. Bei Gruppengrößen größer oder gleich 8 erfolgte eine statistische Auswertung. Dies traf auf die Gesamtgruppe aller nicht infizierten Mäuse (n=8) und auf die Gesamtgruppe aller infizierten Mäuse (n=27) zu. Eine Prüfung auf Signifikanz des Scores erfolgte mit dem *Mann-Whitney-U-Test*.

Es wurden die Punktwerte für jeden einzelnen der 4 Parameter Kallusbildung, Frakturheilung, Strukturveränderungen und Bakterienanzahl jeweils in der Kontrolle nach einer und 4 Wochen, bzw. in der Osteitisgruppe nach 1, 2 und 4 Wochen ausgewertet. In einem zweiten Schritt wurden die ermittelten Punktwerte und statistischen Ergebnisse auf die Gesamtheit der Kontroll- und Osteitisgruppe bezogen.

Zur Abschätzung der diagnostischen Wertigkeit des Testverfahrens wurden *Receiver Operating Characteristics* (ROC) generiert und ausgewertet. Die *Area Under The Curve* (AUC) wurde bestimmt. Es wurde ein Grenzwert ausgewählt, bei dem die Summe von Sensibilität und Spezifität den maximalen Wert ergab. Dieser lag bei 15 Punkten. Es wurden für diesen Grenzwert Sensitivität und Spezifität sowie der positiv prädiktive Wert (PPV) und negativ prädiktive Wert (NPV) ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Kallusbildung

Die Bildung von Kallus ist wesentlicher Bestandteil der indirekten Frakturheilung. Die Kallusbildung war bei den nicht infizierten Tieren bereits nach einer Woche nachweisbar. Der Median lag bei 3 Punkten, der Mittelwert bei 3,25 Punkten mit einer Standardabweichung von $\pm 1,79$ (MW \pm SD). 4 Wochen nach Osteotomie war in nahezu allen nichtinfizierten Mäusen eine kräftige Kallusbildung vorhanden. Der Median lag bei 6 Punkten ($5,25 \pm 1,30$ Punkte).

In der Osteitisgruppe war nach einer Woche wie in der Kontrollgruppe eine beginnende Kallusbildung vorhanden. Der Median lag bei 3 Punkten ($2,20 \pm 0,98$). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe war im weiteren Verlauf keine wesentliche Kallusbildung nachweisbar. Nach 2 und nach 4 Wochen war eine

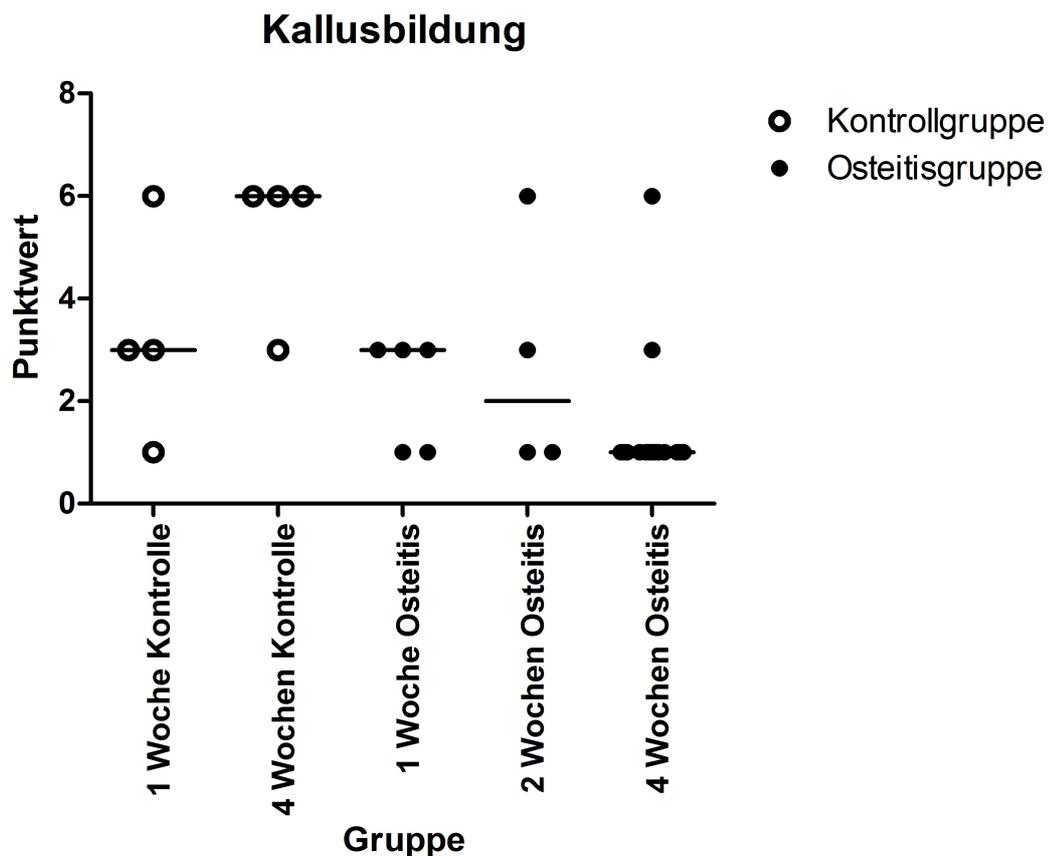


Abbildung 5. Punktwerte für den Parameter Kallusbildung im Median (–) pro Gruppe nach 1, 2 und 4 Wochen.

deutlich verminderte Kallusbildung vorhanden. Der mediane Punktwert lag mit 2 Punkten (MW $2,75 \pm 2,05$) nach 2 Wochen und nur 1 Punkt (MW $1,39 \pm 0,00$) nach 4 Wochen deutlich unter dem der Kontrollgruppe. In Abbildung 5 ist die Kallusbildung der jeweiligen Gruppen über die Zeit aufgetragen.

3.2 Frakturkonsolidierung

Die Frakturkonsolidierung beschreibt die Überbrückung der durchtrennten Kortikalis im Sinne einer Heilung. In der Kontrollgruppe war zu keinem Zeitpunkt eine Destruktion beziehungsweise Erweiterung des Frakturspalt nachweisbar. Nach einer Woche war noch keine Frakturspaltkonsolidierung vorhanden (Median: 6 Punkte, MW $6,00 \pm 0,00$). Auch nach 4 Wochen lag der Median bei 6 Punkten (MW $7,50 \pm 2,60$). Lediglich bei einer Maus war der Osteotomiespalt verheilt (12 Punkte). Bei 3 Mäusen war dieser zwar teils überbaut, aber weiterhin abgrenzbar (6 Punkte). Wie auch in der Kontrollgruppe, war in der Osteitisgruppe in den ersten 2 Wochen keine

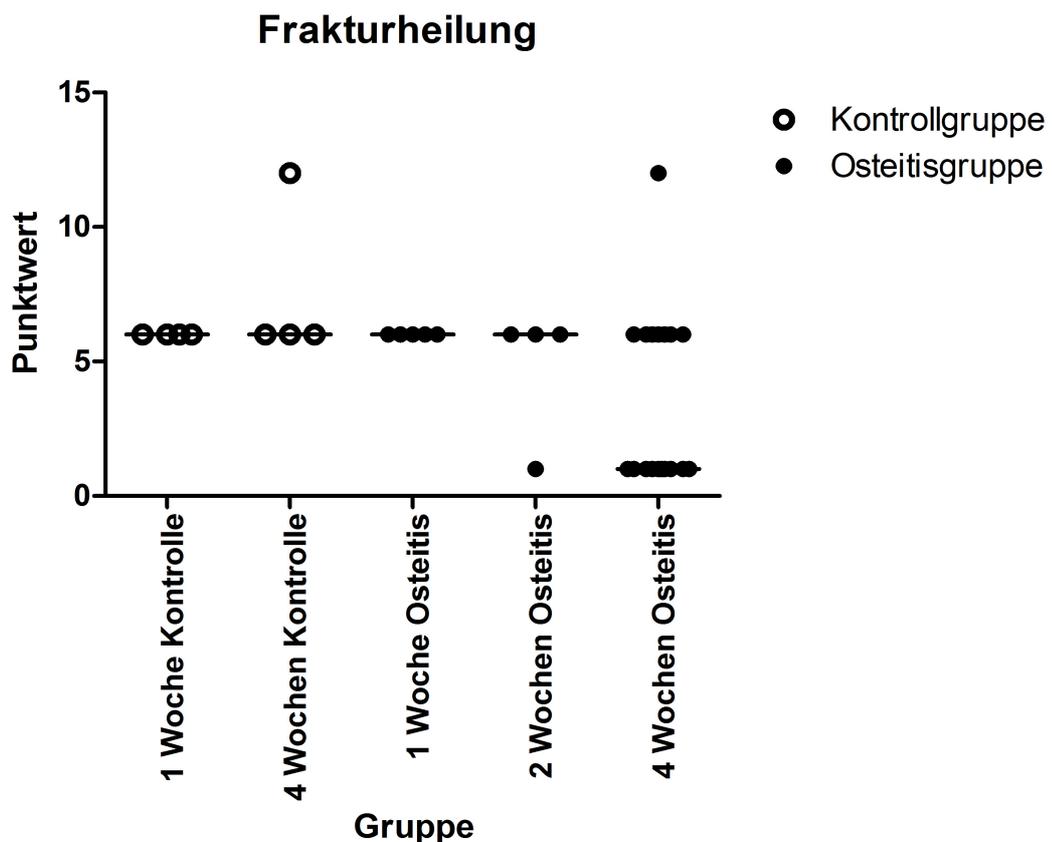


Abbildung 6. Punktwerte für den Parameter Frakturkonsolidierung im Median (–) pro Gruppe nach 1, 2 und 4 Wochen.

Frakturkonsolidierung nachweisbar. Der Median lag jeweils bei 6 Punkten, der Mittelwert nach einer Woche betrug $6,00 \pm 0,00$, nach 2 Wochen $4,75 \pm 2,17$. Nach 4 Wochen zeigte sich als Zeichen einer chronischen Osteitis bei 10 Mäusen eine Destruktion des Frakturspaltes (1 Punkt). Der Median der Osteitisgruppe lag daher mit 1 Punkt (MW $3,56 \pm 2,47$) deutlich unter dem der Kontrollgruppe (6 Punkte) zu diesem Zeitpunkt (Abbildung 6).

3.3 Strukturveränderungen im Markraum

Als Zeichen einer Beteiligung des Markraumes an der Infektion kann es zu strukturellen Veränderungen mit einer vermehrten Ansammlung von immunokompetenten Zellen kommen. Bei keinem der Tiere der Kontrollgruppe war zu einem Zeitpunkt eine Beteiligung des Markraumes im Sinne von Strukturveränderungen oder eine Anhäufung von Immunzellen nachweisbar (Median 6 Punkte, MW $6,00 \pm 0,00$). Dies wurde als Nachweis gewertet, dass im Rahmen der physiologischen Frakturheilung eine wesentliche Beteiligung

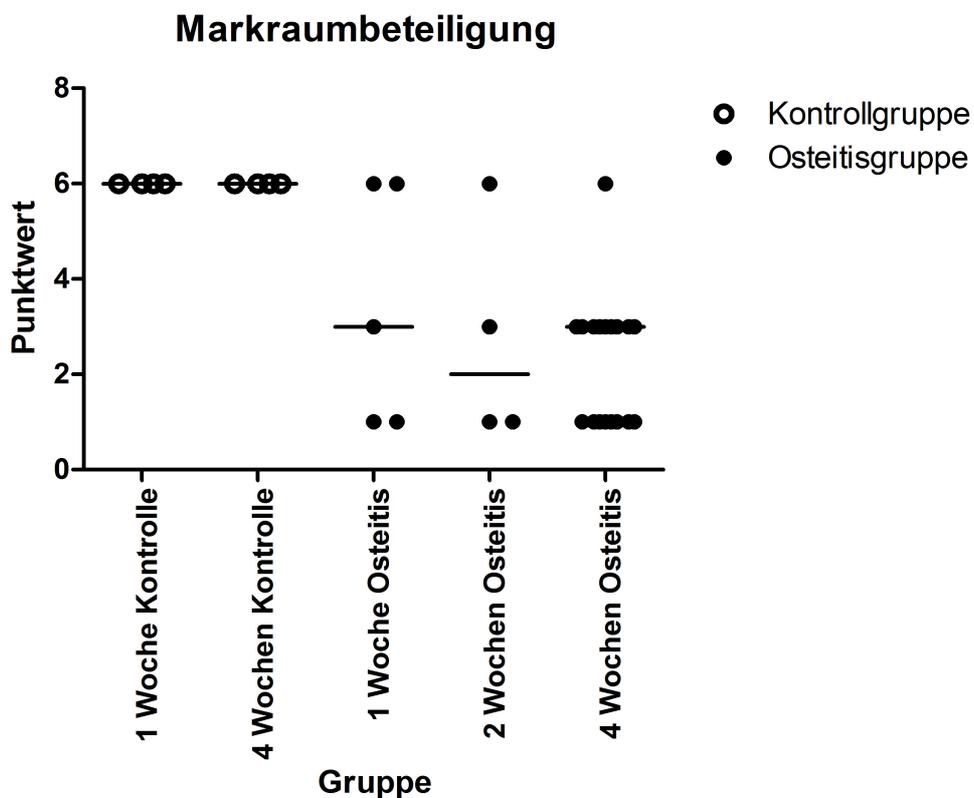


Abbildung 7. Parameter Markraumbeteiligung im Median (-) pro Gruppe nach 1, 2 und 4 Wochen.

an Bakterien im Untersuchungsmaterial in 100facher Vergrößerung bestimmt.

Wie zu erwarten, wurden in der Kontrollgruppe lediglich vereinzelt Bakterienanhäufungen gefunden, die als Kolonisation gewertet wurden. Der Median lag hier nach einer und nach 4 Wochen bei 3 Punkten (MW 3,00 ± 0,00).

Eine Woche nach Keiminkorporation war in den Tieren der Osteitisgruppe in fast allen Fällen (4 von 5 Mäusen) eine hohe Bakterienanzahl (>10 Bakteriengruppen / 20 Gesichtsfelder) nachweisbar. Der Median lag bei 1 Punkt, der Mittelwert bei 1,40 ± 0,80 Standardabweichung. Als Indikatoren für eine einerseits Abwehrreaktion des Körpers und andererseits beginnende Chronifizierung der Infektion waren nach 2 und 4 Wochen weiterhin mäßig viele Bakterien nachweisbar. Der Median lag bei 2 Punkten (MW 2,00 ± 1,00 nach 2 Wochen und MW 2,00 ± 0,88 nach 4 Wochen) (Abbildung 8).

3.5 Gesamtpunktzahl in Abhängigkeit vom Zeitpunkt

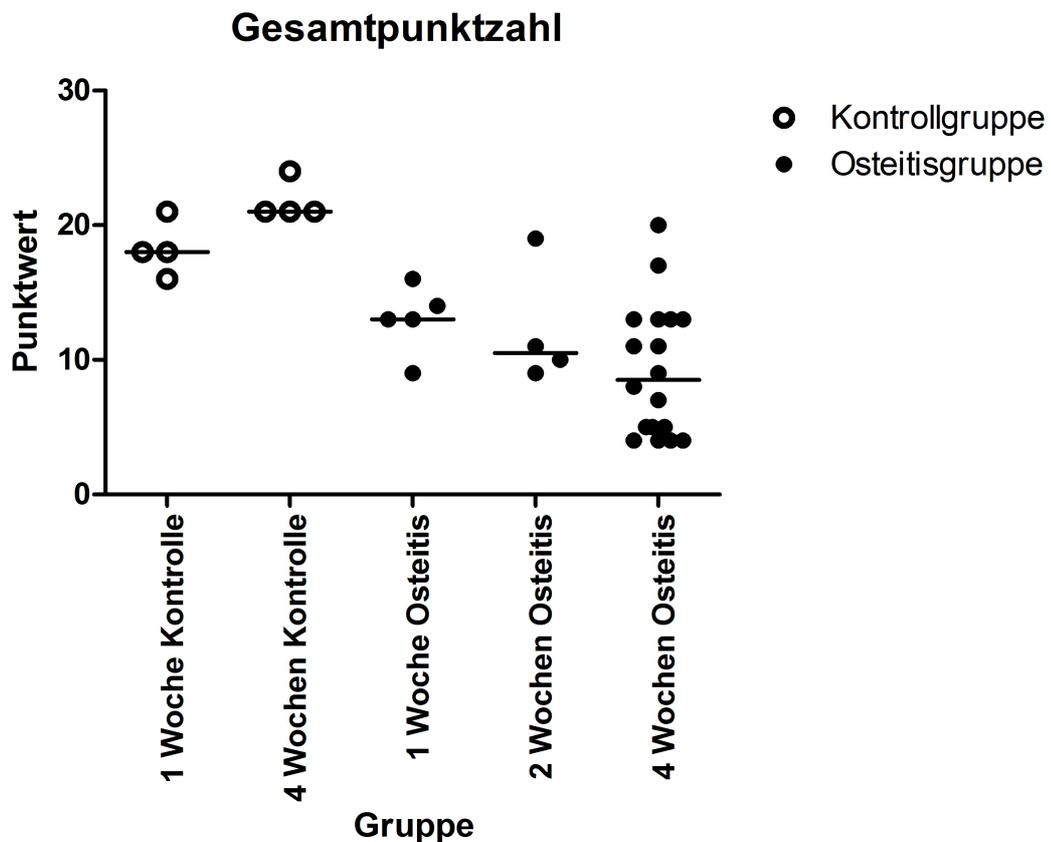


Abbildung 9, Gesamtscore im Median (–) für die Kontroll- und Osteitisgruppe nach 1, 2 und 4 Wochen.

Aus der Summe der Punktwerte der jeweiligen Parameter wurde die Gesamtpunktzahl ermittelt. Je höher der Punktwert, desto geringer die Wahrscheinlichkeit einer Infektion und desto höher die Wahrscheinlichkeit einer ungestörten Frakturheilung. Der Median in der Kontrollgruppe lag nach einer Woche bei 18 (MW $18,25 \pm 1,79$) und nach 4 Wochen bei 21 Punkten (MW $21,75 \pm 1,30$). Diese Punktzahlen spiegeln eine beginnende Frakturheilung nach einer regelrecht voranschreitenden Frakturheilung ohne Infektion nach 4 Wochen wieder. Unabhängig vom Zeitpunkt der Infektion waren in der Kontrollgruppe Gesamtpunkte von 16 bis 24 Punkten nachweisbar.

In der Osteitisgruppe waren Punktwerte zwischen 4 und 20 Punkten vorhanden. Der Median lag für die Osteitisgruppe nach einer Woche bei 13 Punkten (MW $13,00 \pm 2,28$), nach 2 Wochen bei 10,5 Punkten (MW $12,25 \pm 3,96$) und nach 4 Wochen bei 8,5 Punkten (MW $9,22 \pm 3,60$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe lag dieser damit jederzeit deutlich niedriger. Zu beachten ist, dass in Abhängigkeit vom erhobenen Zeitpunkt die jeweiligen Parameter unterschiedlich zum Gesamtpunktwert beitragen. Während in der Frühphase (1 Woche) vor allem die den Infektionsprogress beschreibenden Parameter „Markraumbeteiligung“ und „Bakterienanzahl“ wenige Punkte aufweisen, waren das in der Spätphase (4 Wochen) die die Frakturheilung beschreibenden Parameter „Kallusbildung“ und „Frakturkonsolidierung“ (Abbildung 9).

3.6 Gesamtpunktzahl unabhängig vom Zeitpunkt

Weiterführend wurde untersucht, welche Bedeutung der erstellte Score unabhängig vom Zeitpunkt des Fortschreitens der Infektion und Knochenbruchheilung besitzt. Hierzu wurden die Gesamtpunkte nach 1, 2 und 4 Wochen der Kontrollgruppe und der Osteitisgruppe zusammengefasst.

Für die infizierten Tiere lag der Gesamtwert des Scores im Median bei 11 Punkten. Hingegen lag der Median für die nichtinfizierten Tiere der Kontrollgruppe bei 21 Punkten deutlich höher. Der Mittelwert der Kontrollgruppe lag bei $20,00 \pm 2,35$ Punkten und für die Osteitisgruppe bei $10,34 \pm 4,60$ Punkten (Abbildung 10). Der Unterschied war signifikant ($p < 0,0001$).

Dies zeigt, dass unabhängig vom Zeitpunkt der Erhebung aufgrund der Kombination und Wichtung der vier einzelnen Parameter in der Gesamtpunktzahl eine Unterscheidung zwischen einer Osteitis und einer regelrechten Frakturheilung anhand dieses Scores möglich ist.

Gesamtpunktzahl unabhängig vom Zeitpunkt

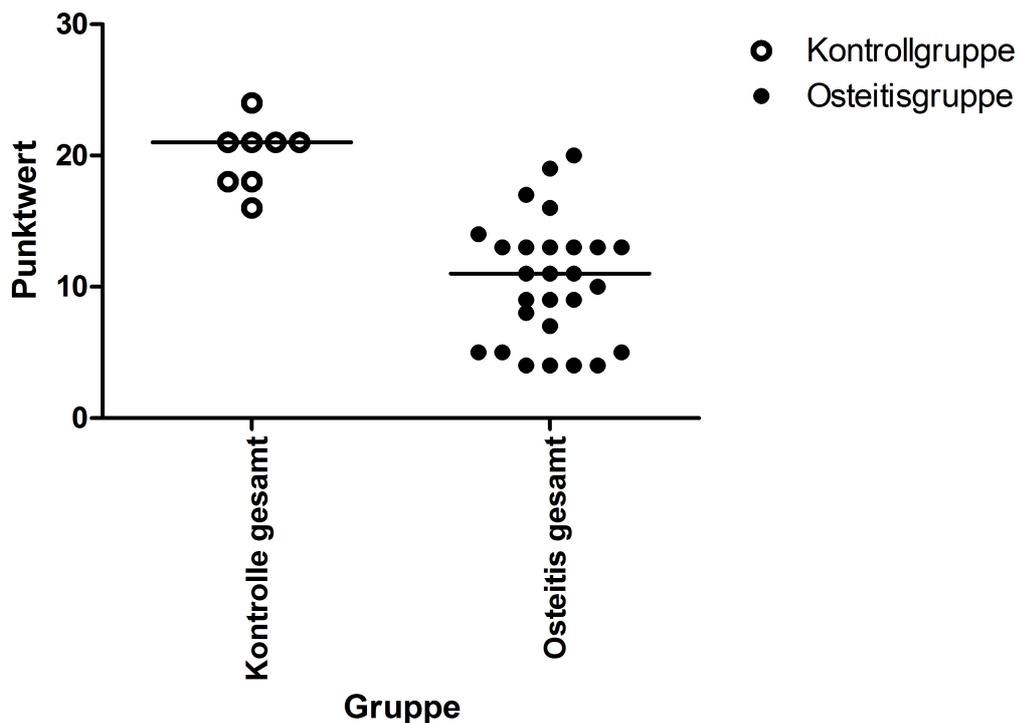


Abbildung 10. Vergleich der Gesamtpunktwerte Kontrollgruppe versus Osteitisgruppe unabhängig vom Zeitpunkt. Dargestellt sind die Mediane (-) und Einzelwerte pro Gruppe.

3.7 Diagnostischer Wert

Zur Bestimmung des Diagnostischen Wertes des Scores wurde mit der Computersoftware Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc) eine *Receiver-Operating-Characteristics* (ROC) Kurve erstellt (Abbildung 11). Die *Area Under The Curve* (AUC) betrug 0,9653. Es wurde der Grenzwert von 15 Punkten ermittelt. Dies entspricht dem Punktwert, bei dem die Summe aus Sensibilität und Spezifität den höchsten Wert ergab. Bei dem Grenzwert von 15 Punkten lag die Sensitivität bei 0,852, die Spezifität bei 1,00, der negative prädiktive Wert (NPV) bei 0,67 und der positive prädiktive Wert (PPV) bei 1,00.

Eine Signifikanzprüfung des Scores wurde mit dem *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt. In der Auswertung der Gesamtgruppen unabhängig vom Zeitpunkt ergab sich eine hohe statistische Signifikanz ($p < 0,0001$). Somit ist anhand des Scores mit hoher statistischer Zuverlässigkeit die Unterscheidung zwischen dem Vorhandensein einer Osteitis und einer Probe ohne Infektion möglich.

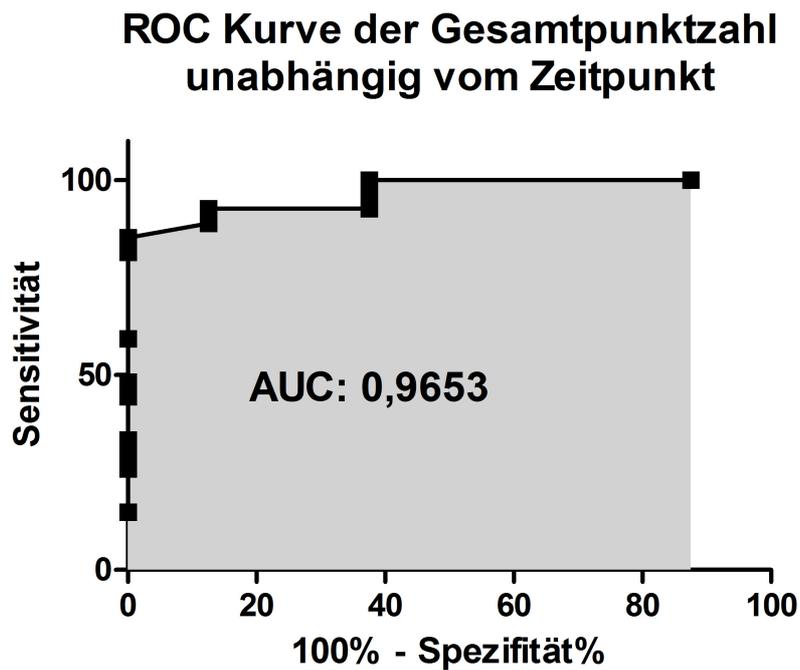


Abbildung 11. Receiver-Operating-Characteristics (ROC) Kurve mit Angabe der Area Under The Curve (AUC).

4 Diskussion

Der Heilungsverlauf einer Fraktur kann durch eine Infektion nachhaltig gestört oder sogar verhindert werden. Ziel dieser Arbeit war die Erstellung eines Scores zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs der Osteitis in Bezug auf Ausprägungsgrad der Infektion und Bruchheilung. Als Grundlage der durchgeführten Arbeiten standen im Rahmen eines murinen *in vivo* Osteitismodells gewonnene Oberschenkelknochen zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Score entwickelt, der auf den Kriterien Kallusbildung, Konsolidierung, Strukturveränderungen des Markraums und Anzahl an Bakterien im Konchen basiert. Die jeweiligen Parameter wurden mit unterschiedlicher Wichtung zu einem Gesamtscore zusammengesetzt. Mit Hilfe des Scores gelingt eine gute Abschätzung der Knochenheilung unter infektiösen Bedingungen und des Aktivitätsgrades der Osteitis anhand histologischer Kriterien.

4.1 Tierversuche

Aufgrund mannigfaltiger Eigenschaften ist die Maus ein etabliertes Versuchstier bei der Erforschung von Knocheninfektionen [47, 71, 72, 74, 77, 78, 85, 91, 92]. Es gibt wegen des vollständig entschlüsselten genetischen Codes der Maus die Möglichkeit, durch Züchtung bestimmter *Knock-Out*-Mäuse auch auf molekularbiologischer Ebene experimentell zu arbeiten und in der Erforschung der Entstehung und Therapie von Knocheninfekten wegweisende Versuche durchzuführen [93].

Als Ursache der Osteitis ist *Staphylococcus aureus* der weltweit verbreitetste Erreger [15, 18, 29, 33, 40, 54, 56, 76, 81]. Diese Bakterien können aus unterschiedlich vermehrungsfähigen Stämmen bestehen. Zum einen gibt es Stämme mit niedriger Vermehrungsrate, die häufig resistent gegenüber Antibiotika sind und für Langzeitinfekte verantwortlich sind, zum anderen gibt es Stämme, die bei hoher Vermehrungsrate besonders bei der akuten Osteitis eine Rolle spielen. *Staphylococcus aureus* ist darüber hinaus in der Lage, auf künstlichen Oberflächen wie den von uns verwendeten Implantaten Biofilm zu bilden und sich hierdurch vor der Therapie mittels systemischer Antibiotikagabe oder Abwehr durch das Immunsystem des infizierten Individuums zu schützen [42]. Der im vorliegenden Modell verwendete Stamm ist *Staphylococcus aureus*

ATCC 29213, ein gegen Antibiotika sensibler Strang mit schnellerer Vermehrungsrate [73].

Es wurden von Auer et al. im Jahre 2007 [91] 10 Regeln zur Erstellung eines ethisch und wissenschaftlich sinnvollen Tierversuches festgelegt. Erstens soll dem Versuch eine durchdachte Fragestellung zugrunde liegen. Die komplexen Vorgänge der Immunreaktion und Entzündung bei Vorliegen einer Osteitis können nicht *in vitro* nachgestellt werden. Zum Herstellen einer Vergleichbarkeit von Infektstadien ist ein objektives *Scoring*-Verfahren notwendig, um Effekte verschiedener Manipulationen und Verläufe einer Osteitis miteinander vergleichen und so Aussagen verschiedener Studien miteinander abgleichen zu können. Hierfür sind *in vivo* Versuche notwendig. Zweitens werden minimale Komplikationsraten verlangt. Eine Komplikation ist bei diesem Score abgesehen von der theoretischen Möglichkeit technischer Mängel während des Aufarbeitungsprozesses der Proben ausgeschlossen. Es ist bei jedem Knochen unter der Voraussetzung der sachgerechten Aufbereitung möglich, die 4 Parameter des Scores zu erheben. Drittens sollen definierte Endpunkte der Studie festgelegt werden, was hier ebenfalls der Fall ist. Es wurden nach 7, 14, beziehungsweise 28 Tagen Endpunkte für die jeweiligen Gruppen gesetzt und die Untersuchungen durchgeführt. Viertens sollen die genutzten Methoden etabliert sein. Dies war in unserer und auch in den Arbeitsgruppen anderer Einrichtungen bereits gegeben [71, 73, 92]. Fünftens sollen Variablen wie genetische Unterschiede, hormonelle Schwankungen und Einflüsse durch die Umwelt beachtet werden. Diese waren durch die Verwendung ausschließlich BALB/c-Mäuse bei gleichem Alter berücksichtigt. Bei der späteren Anwendung des Scores sollen darüber hinaus diese keine Rolle spielen und durch die Auswahl und Wertung der Parameter ausgeglichen werden. Als sechsten Punkt nennt Auer die entsprechende postoperative Nachsorge, die unter den Bedingungen der Tierversuchsanstalt unserer Einrichtung gegeben sind und veterinärmedizinisch kontrolliert werden. Siebtens werden Studienprotokolle erwartet. Die Tierversuche und alle mit dem gewonnenen Probenmaterial angestellten Untersuchungen wurden standardisiert durchgeführt und die Ergebnisse schriftlich festgehalten. Die histologische Beurteilung der Proben war durch mehrere unabhängige Untersucher erfolgt und stimmte in der Bewertung überein. Achtens sollen die Versuche an den Tieren durch erfahrene

Operateure durchgeführt werden. Die Tiere in unseren Versuchen wurden alle durch das gleiche Team nach entsprechender Schulung und Übung durchgeführt. Neuntens sollen Pilotstudien dem Versuch vorausgehen, die das geplante Verfahren bestätigen. Im Rahmen der bereits etablierten Anwendung des Mausmodells in verschiedenen Einrichtungen ist dies bereits erfolgt [47, 71-74, 92, 94]. Als zehnten Punkt verlangt Auer die Abstimmung der Versuche mit den zuständigen Behörden und Konzernen, was im Rahmen der Anmeldung der Versuche bei der Tierschutzbeauftragten des Landesamtes NRW für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz und entsprechender Genehmigung erfolgt war.

4.2 Methodenkritik

Für die Untersuchung standen insgesamt 35 Femura zur Verfügung. In der Kontrollgruppe handelte es sich lediglich um 4 Proben, die nach einer Woche und um 4 Proben, die nach 4 Wochen gewonnen wurden. Hier war eine statistische Auswertung nicht sinnvoll möglich. Im Gegensatz hierzu stand die Osteitisgruppe mit insgesamt 27 Femura. Die unterschiedliche Anzahl der untersuchten Proben in Kontroll- und Osteitisgruppe erschwert die statistische Verwertbarkeit. Aufgrund des Studiendesigns war eine Erhöhung der Fallzahl in diesem Falle ethisch nicht vertretbar.

4.3 Score

Der hier entwickelte Score setzte sich aus 4 histologischen Parametern zusammen: Kallusbildung, Frakturkonsolidierung, Strukturveränderungen des Markraums und dem Nachweis von Bakterien.

4.3.1 Kallusbildung

Die Bildung von Kallus ist ein wesentlicher Schritt in der indirekten Frakturheilung [5]. Hierbei wird in erster Linie von Osteoblasten Faserknochen gebildet, der eine geringere Stabilität aufweist als Lamellenknochen [4, 95]. Beim Menschen ist bei Schaftfrakturen in der Regel nach 7 Tagen weicher, also aus Knorpelfasern gebildeter Kallus histologisch nachweisbar, ein Remodelling findet nach 2-4 Monaten statt [4, 11, 95]. Bei der Maus ist die Frakturheilung ungleich schneller. Durchschnittlich kommt es hier bei adäquater Stabilisierung bereits nach 5 bis 8 Wochen zu einer vollständigen Heilung von Frakturen [96].

Im hier vorliegenden Versuchsansatz war bereits radiologisch nach 4 Wochen eine deutliche Kallusbildung vorhanden. Im Einklang hierzu war in den histologischen Untersuchungen ein deutlicher Kallus in den meisten Fällen bei nichtinfizierten Mäusen nach 4 Wochen nachweisbar. In unserem Modell wurde ein nachhaltiger Einfluss einer Infektion auf die Kallusbildung nachgewiesen. Mehrheitlich war 4 Wochen nach Fraktur deutlich weniger Kallus nachweisbar. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, die als Folge einer Infektion eine verminderte Kallusbildung nachweisen konnten [51].

Das Ausmaß der Kallusbildung wird zudem vom Grad der Stabilität in der Frakturzone bestimmt. Die Art der durchgeführten Osteosynthese hat Einfluss auf die Stabilität und führt im Falle relativer Stabilität zu mehr Kallusbildung. In der von uns durchgeführten Osteosynthese mit einer winkelstabilen Platte ist eine hohe Stabilität in der Frakturzone erreichbar [1, 73, 94, 96, 97]. Welchen Einfluss der Grad der Stabilität in unserem Modell auf die Kallusbildung bei vorliegendem Infekt hat, kann anhand der erhobenen Daten allerdings nicht nachgewiesen werden.

4.3.2 Frakturkonsolidierung

Eine Frakturkonsolidierung beschreibt die direkte Überbrückung eines Frakturspalt mit Lamellenknochen. Sie tritt bei der direkten Frakturheilung auf oder nach dem Remodelling am Ende der indirekten Frakturheilung. Ob und inwiefern Frakturen direkt konsolidieren wird von der Stabilität der Frakturzone bestimmt. Winkelstabile Implantate führen zu einer hohen Stabilität in der Frakturzone und fördern eine direkte Frakturheilung [97, 98]. Auch im hier angewandten Modell lag eine hohe Stabilität vor. Bei instabiler osteosynthetischer Versorgung und in der Infektsituation findet eine direkte Frakturheilung in der Regel nicht statt [3, 5, 11]. Eine ausbleibende Konsolidierung ist daher im vorliegenden Modell am ehesten auf einen Infekt zurückzuführen. Eine gestörte Frakturheilung, insbesondere fehlendes Remodelling sind als Folge gesteigerter inflammatorischer Faktoren wie TNF α , IL-1 und IL-6 zu sehen und ebenfalls ein dem Aktivitätsgrad der Osteitis folgender Parameter [29]. In Fällen besonders ausgeprägter Infektion können diese Faktoren unter anderem sogar zu einem Abbau der bestehenden Knochenstrukturen führen [99]. In der vorliegenden Untersuchung stellt sich dies ebenfalls entsprechend dar. Wir sahen erwartungsgemäß nach einer bis

zwei Wochen auch in nicht infizierten Tieren keine Frakturheilung im histologischen Bild. Nach 2 und 4 Wochen sahen wir hingegen erste Abbaureaktionen der Knochensubstanz bei infizierten Mäusen. Überraschenderweise war es in einem Falle zur vollständigen Heilung einer infizierten Maus gekommen. Man sieht in den Ergebnissen der nichtinfizierten Tiere gut die Korrelation der ausbleibenden Frakturheilung nach 4 Wochen bei jedoch guter Kallusbildung, da es hier offensichtlich zur indirekten Heilung gekommen war.

Die Beurteilung einer fortschreitenden Knochenheilung kann histologisch gesehen werden. Dies ist jedoch im Vergleich zu anderen Verfahren limitiert. Im histologischen Schnitt kann bei stabilisierter Fraktursituation eine zelluläre Reaktion frühzeitig gesehen werden. Das bedeutet, dass bereits erste Schritte der Knochenheilung wahrgenommen werden können, sofern nicht im Rahmen der Erstellung histologischer Schnitte, bzw. in Vorbereitung hierzu bei der Probenentnahme aus dem Mäusesitus, Strukturen zerstört werden. Um einen solchen Risikofaktor auszuschließen, wäre ergänzend zur histologischen Bewertung nach Knochenentnahme eine vorangehende radiologische Untersuchung im Situs erforderlich. Hierzu sind konventionell radiologische Untersuchungen geeignet, idealerweise wäre die Untersuchung im CT denkbar. Im angewendeten Modell wurden bereits radiologische Untersuchungen durchgeführt. Im Einklang mit der histologischen Untersuchung wurde auch in den Röntgenaufnahmen in der Kontrollgruppe eine gute Frakturkonsolidierung nachgewiesen, in der Osteitisgruppe dagegen eine fehlende Heilung bis hin zu Osteolysen [73].

In bereits veröffentlichten Studien wurden bei Mäusen *ex vivo* aber auch *in vivo* Untersuchungen zur Frakturheilung mittels Mikro-CT durchgeführt [100, 101]. Mittels Mikro-CT lassen sich im Rahmen der Schichtbildgebung aufwändige Daten erheben. Diese sind geeignet, die Frakturheilung und Kallusbildung dreidimensional zu erfassen und zu vermessen. Technische Probleme wie die zwangsläufige Beschädigung von Strukturen durch das Entfernen des Knochens aus dem Situs, die Entfernung des Osteosynthesematerials oder den Schneidevorgang im Mikrotom werden vermieden.

Auch Studien in denen andere histologische Untersuchungen durchgeführt wurden, zeigen gute Ergebnisse [101]. Nicht-dekalzifizierte Schnitte oder

spezielle radiologische Untersuchungen wie das *small-angle X-ray scattering* (sSAXS) eignen sich insbesondere zur Beurteilung eines Kallus und des Fortschrittes einer Frakturheilung sehr gut, da hier nicht nur Zellen sondern auch das strukturelle Gerüst des Knochens dargestellt und vermessen wird [102]. Nachteilig bei der Verwendung nicht-dekalzifizierter Schnitte können die technisch bedingt etwas dickeren Schnitte sein. Im Rahmen des Schneidverfahrens können zudem insbesondere Weichgewebestrukturen hier geschädigt werden und die Beurteilung erschweren.

4.3.3 Markraumveränderungen

Der Markraum von langen Röhrenknochen in der Maus ist neben strukturbildenden Zellen u. a. mit zahlreichen neutrophilen Granulozyten gefüllt [87]. Während der normalen Frakturheilung ist der Markraum nur unwesentlich verändert. In der Literatur liegen hier nur eingeschränkt Daten vor. Wir fanden bei den nichtinfizierten Mäusen keine Veränderungen, hingegen war bei den infizierten Mäusen nach 1, 2 und 4 Wochen mehrheitlich deutliche Strukturveränderung vorhanden. Es ist davon auszugehen, dass diese Veränderungen früh, das heißt nach 1 Woche, auf eine lokale Akkumulation immunokompetenter Zellen zurückzuführen ist. Zu nennen sind vor allem neutrophile Granulozyten [103]. Diese spielen in der Frühphase der Abwehr von *Staphylococcus aureus* in der Maus eine wichtige Rolle [104]. Auch über den weiteren Zeitraum der Beobachtung waren die Veränderungen präsent. Inwiefern auch andere immunokompetente Zellen lokal vermehrt vorhanden sind, kann anhand der durchgeführten Untersuchung nicht erklärt werden. Denkbar wäre eine Anhäufung von Makrophagen oder Zellen des spezifischen Immunsystems. Wir sahen zu allen Zeitpunkten nach der Infektion auch bereits Knochenmark-Nekrosen. Vitale Zellen konnten in diesen Arealen nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser Strukturveränderungen wurde als indirekter Parameter einer persistierenden Infektion gewertet. Für folgende Untersuchungen wäre es von Interesse zu untersuchen, inwiefern die Strukturveränderungen einen Einfluss auf die Knochenbruchheilung besitzen oder ob es sich um ein histologisch nachweisbares Epiphänomen handelt.

4.3.4 Bakterienanzahl

Der Nachweis von Bakterien durch Kulturanalysen aus Gewebe welches vom Ort der Infektion gewonnen wurde, gilt als sicherer Nachweis einer Infektion.

Ausnahmen bleiben Kontaminationen und der Nachweis nicht oder fraglich pathogener Keime. Auch in der vorliegenden Untersuchung wurden selbst in nicht infizierten Mäusen vereinzelt histologisch Kolonien von Bakterien nachgewiesen. Diese wurden auch als Kontamination gewertet. In allen Mäusen die infiziert wurden, waren nach 4 Wochen auch Bakterienkolonien nachweisbar. Hier erfolgte zudem die quantitative Analyse durch Auszählung. Die Bestimmung der Anzahl kann als Surrogatparameter für die Aktivität der Infektion interpretiert werden.

Die Beurteilung der Osteitis anhand der Bakterienanzahl alleine ist aufgrund der potenziell unterschiedlichen Verläufe einer Osteitis problematisch. Im Rahmen eines akuten Frühinfektes ist mit einer großen Anzahl von Bakterien zu rechnen. Eine geringe Anzahl pathogener Bakterien kann im Krankheitsverlauf jedoch ansteigen, wenn eine erfolgreiche Immunantwort ausbleibt und eine ungestörte Keimvermehrung erfolgen kann. Aufgrund der besonderen Eigenschaften von Bakterien im Gewebe aktiv zu bleiben und der körpereigenen Abwehr durch Bildung von Biofilm zu entgehen kann auch eine kleine Anzahl an Bakterien einen hohen Krankheitswert haben.

Die Bakterienanzahl kann im Krankheitsverlauf deutlich schwanken. In Bezug auf implantatassoziierte Infektionen mit Biofilmbildung wird zwischen *sessil* und *planctonic* Bakterien unterschieden. *Planctonic* Bakterien weisen im Gewebe eine hohe Aktivität und Teilungsrate auf. Der Nachweis der *sessil* Bakterien kann mitunter schwierig sein. Diese sind mit deutlich geringerer Teilungsrate häufig wesentliche Bildner eines Biofilms [42]. Es ist davon auszugehen, dass anhand der von mir durchgeführten histologischen Untersuchungen die *sessil* Bakterien nicht sicher erfasst werden. Hier liegt eine diagnostische Lücke des Scores vor.

4.3.5 Gesamtpunktzahl

Um einen Score zu errechnen, der einen Aufschluss über den aktuellen Aktivitätsgrad der Osteitis gibt, ist es erforderlich, die einzelnen untersuchten Parameter zu einem Gesamtscore zusammenzufassen. Die gewählten Parameter Kallusbildung, Frakturheilung, Markraumveränderungen und Bakterienanzahl besitzen zum einen im Ganzen eine unterschiedliche Bedeutung für die Frakturheilung und zum anderen eine wichtige Rolle im Progress der Infektion. Daher werden die Parameter in Abhängigkeit der

Bedeutung gewichtet. Ziel war es, einen Score zu entwickeln, der unabhängig vom Progress der Infektion oder des Frakturheilungsstadiums die Diagnose der Osteitis sicherstellen zu können.

Grundlage für die unterschiedliche Wichtung ist die Überlegung, dass nach 7 Tagen auch unter physiologischen Verhältnissen weder bei der direkten, noch bei der Indirekten Frakturheilung ein massiver Kallus, bzw. eine vollständige Frakturheilung zu erwarten sind. Im weiteren Verlauf ist bei der indirekten Frakturheilung eine Kallusbildung auch unter Infektbedingungen möglich, wenn auch weniger wahrscheinlich. Eine vollständige Durchbauung einer Fraktur ist jedoch unter florider Entzündung und in der Infektsituation nicht zu erwarten. Es wurde also eine erreichbare Punktzahl von maximal 6 Punkten für die Kallusbildung festgelegt, während eine Frakturdurchbauung als deutliches Zeichen gegen das Vorliegen einer Osteitis mit 12 Punkten maximal bewertet wurde. Weiter liegen zu Beginn der Infektion in der Regel noch höhere Bakterienanzahlen vor, da das Immunsystem des Trägers und gegebenenfalls verabreichte Antibiotika noch nicht lange Zeit hatten, ihre volle Wirkung zu entfalten. Auch ist eben die Therapie mittels Antibiotika und die Verminderung der Bakterienzahl nicht zwangsläufig gleichbedeutend mit einer erfolgreichen Infektbekämpfung. Aus diesem Grunde werden hier maximal nur 3 Punkte als Hinweis gegen das Vorliegen einer Osteitis gegeben. Ohne Abhängigkeit hiervon findet man zu jedem Zeitpunkt der Infektion Veränderungen in der Beschaffenheit des Markraumes. Diese können nun Folge einer Infektion sein, insbesondere die Markraumnekrose, oder Anzeichen für die aktiv stattfindende Immunreaktion auf eine akute Infektion mit Bakterien im Sinne der Veränderung der Zellkonstellation zugunsten immunoaktiver Zellen und deren örtlicher Veränderung innerhalb der Markhöhle. Hierfür sind ebenfalls 6 Punkte als deutlichster Hinweis auf Infektionen vergeben worden. Insgesamt sieht man also eine pro Parameter unterschiedlich gewählte Gewichtung im Gesamtscore, die sich gegenseitig ergänzen und einen auf breiter Basis aufgestellten Gesamtscore ergeben, der die zeitlich und physiologisch unterschiedlich ablaufenden Möglichkeiten der Entwicklung einer Osteitis berücksichtigt.

In der erreichten Gesamtpunktzahl spiegelt sich demzufolge der Aktivitätsgrad der Osteitis wieder, wobei die größte Gewichtung gegen eine Osteitis dem Parameter „Frakturkonsolidierung“ zukommt. Auf gleicher Höhe erfolgt die

Wichtung der Parameter „Kallusbildung“ und „Markraumveränderungen“. Mit der niedrigsten Sicherheit spricht der Parameter „Bakterienanzahl“ gegen eine Osteitis und wird somit mit der kleinsten erreichbaren Punktzahl der 4 Parameter gewichtet.

4.4 Diagnostischer Wert

Der diagnostische Wert zur Abschätzung der Diagnose „Osteitis“ wird durch eine hohe Spezifität und Sensitivität bestimmt. Bei einem Grenzwert von 15 Punkten in der Gesamtpunktzahl, wobei Werte kleiner oder gleich 15 für und Werte über 15 Punkten gegen eine Osteitis sprechen, lag die Spezifität bei 100% und die Sensitivität bei 85,2%.

Im klinischen Alltag werden Laborwerte wie Cytoreaktives Protein (CRP) und Leukozytenzahl im Blut verwendet, die bei nicht ausreichend hoher Sensitivität eine sehr geringe Spezifität aufweisen [12, 105, 106]. Diese Werte sind mit geringem Aufwand im Rahmen einer venösen Blutentnahme zu gewinnen. Sie spielen insbesondere als Verlaufsparemeter während der Therapie einer Infektion eine wesentliche Rolle [26].

Etwas höher liegen die Angaben über die Aussagekraft von Punktaten. Diese sind ebenfalls häufig mit vergleichsweise wenig Aufwand zu gewinnen. Ein Keimnachweis gelingt jedoch aus einem Punktat nicht immer, so dass die Verwertbarkeit eher eingeschränkt ist. In der Literatur wird beschrieben, dass in nur 65% der Fälle ein Keimnachweis anhand eines Punktates gelingt [107, 108]. Einen höheren diagnostischen Wert haben etablierte Untersuchungen wie die Entnahme von Gewebeproben. Diese bieten die Möglichkeit der mikrobiologischen Untersuchung. Im Rahmen dieser wird neben dem Nachweis eines Erregers oft die Erstellung eines die Therapie mitbestimmenden Resistogrammes ermöglicht. Zudem ist eine histologische Gewebeuntersuchung möglich [13, 32, 70, 109, 110].

Die Kombination des histologischen Scores mit der ebenfalls hohen Aussagekraft radiologischer Untersuchungen, insbesondere Mikro-CT und laborchemischer sowie mikrobiologischer Untersuchungen werden möglicherweise in kommenden Studien eine weitere Verbesserung in der Diagnostik der implantatassoziierten Osteitis im Mausmodell ermöglichen.

4.5 Auswertung

Erstellt wurde der Score in erster Linie zur Abschätzung der Osteitis im experimentellen Tiermodell unter standardisierten Bedingungen. Er bietet sich dadurch zur Beurteilung eines therapeutischen Effektes auf die Osteitis im Tierversuch an.

Eine Übertragung des Scores auf den klinischen Alltag ist schwer umsetzbar, da den durchzuführenden Untersuchungen die Resektion relevanter ossärer Strukturen vorausgeht.

Die Feststellung des Scorewertes in dieser Arbeit gelingt durch die mikroskopische Untersuchung zuvor erstellter histologischer Präparate in Giemsa- und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen in unterschiedlicher Vergrößerungsstufe (4x bis 100x). Praktisch und technisch ist diese Arbeit für jeden geschulten Untersucher durchführbar. Eine ausreichende Reliabilität der Ergebnisse wurde in unserer Arbeit durch die übereinstimmenden Bewertungen der vorgelegten histologischen Präparate von drei verschiedenen Untersuchern erreicht. Festgelegte objektive Grenzwerte bei dem Ausmaß der Kallusbildung, der Frakturdurchbauung, der Markraumveränderungen und der Bakterienanzahlen führen zu einer leichten Einordnung der festgestellten Messgrößen in die Punktwerte des Scoring-Systems.

5 Schlussfolgerung

Es ist gelungen, einen histologischen Score zu etablieren, anhand dessen der Ausprägungsgrad einer Osteitis im Mausknöchel abgeschätzt werden kann. Im Rahmen weiterer experimenteller Studien und Literaturvergleiche wird es möglich sein, Effekte etwaiger Therapien miteinander zu vergleichen und einen Behandlungserfolg messen zu können. Zudem ist die Beurteilung der Schweregrade behandelter und unbehandelter Osteitiden verschiedener Studien möglich. Zur weiterführenden Etablierung und Erhöhung der Genauigkeit wäre eine Erweiterung des Scores durch Kombination mit radiologischen und laborchemischen Kriterien denkbar.

6 Literatur

1. Thomas Rüedi, R.E.B., Christopher G Moran, AO Principles of Fracture Management. 2007, Thieme.
2. Beckmann, R., et al., Aus alt mach neu. Der Orthopäde, 2014. 43(4): p. 298-305.
3. Junqueira, L.C.U.C., J.; Gratzl, M., Knochen, in Histologie, L. Junqueira, J. Carneiro, and M. Gratzl, Editors. 2005, Springer Berlin Heidelberg. p. 91-105.
4. Clarke, B., Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. 3 Suppl 3: p. S131-9.
5. Marsell, R. and T.A. Einhorn, The biology of fracture healing. Injury, 2011. 42(6): p. 551-555.
6. Baumhoer, D.S., I.; Götz, W., Kurzlehrbuch Histologie. 2003: Urban & Fischer Verlag München.
7. Kartsogiannis, V. and K.W. Ng, Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. Molecular and Cellular Endocrinology, 2004. 228(1-2): p. 79-102.
8. Böcker, W., H. Denk, and P.U. Heitz, Repetitorium Pathologie. 2004, München: Elsevier.
9. Sims, N.A. and J.H. Gooi, Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2008. 19(5): p. 444-451.
10. Cierny, G., 3rd, Surgical treatment of osteomyelitis. Plast Reconstr Surg, 2011. 127 Suppl 1: p. 190S-204S.
11. Jahagirdar, R. and B.E. Scammell, Principles of fracture healing and disorders of bone union. Surgery (Oxford), 2009. 27(2): p. 63-69.
12. Schmidt, H.G.K., et al., Zur Definition der Diagnose Osteomyelitis - Osteomyelitis-Diagnose-Score (ODS), in Z Orthop Unfall. 2011, Georg Thieme Verlag KG. p. 449-460.
13. Tiemann, A.H., et al., Infektiöse Knochenerkrankungen, in Der Pathologe. 2011, Springer-Verlag.
14. Garcia-Lechuz, J. and E. Bouza, Treatment recommendations and strategies for the management of bone and joint infections. Expert Opin Pharmacother, 2009. 10(1): p. 35-55.
15. Gentry, L.O., Osteomyelitis: Options for diagnosis and management, in J. Antimicrobial Chemotherapy. 1988. p. 115-128.
16. Wünsch, P.H. and A. Woltmann, Knocheninfektion - pathologische Abläufe, in Chirurgische Infektionen von Knochen, Gelenken und Weichteilen. 1991, Walter de Gruyter: Berlin.
17. Niethard, F.U., J. Pfeil, P. Biberthale, in Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie. 2009, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart.
18. Zimmerli, W. and U. Fluckiger, [Classification and microbiology of osteomyelitis]. Orthopade, 2004. 33(3): p. 267-72.
19. Tiemann, A.H., et al., Strategies for the analysis of osteitic bone defects at the diaphysis of long bones. Strategies Trauma Limb Reconstr, 2009. 4(1): p. 13-8.
20. Walter G, K.M., Kappler C, Hoffmann R, Treatment algorithms for chronic osteomyelitis. Dtsch Arztebl Int, 2012: p. 109(14): 257-64.
21. Meisinger, C., et al., Epidemiologie der Extremitätenfrakturen, in Der Orthopäde. 2002, Springer-Verlag. p. 92-93.

22. Gerlach, U.J., C. Grimme, and R. Schoop, Akute posttraumatische Osteomyelitis. Ist die Osteosynthese zu retten?, in Trauma und Berufskrankheit · Supplement 2. 2009, Springer Medizin-Verlag. p. 203-206.
23. Seybold, D. and T.A. Schildhauer, Knocheninfekte, in Orthopädie und Unfallchirurgie essentials: Intensivkurs zur Weiterbildung. 2010, Georg Thieme-Verlag: Stuttgart. p. 135-142.
24. Geipel, U. and M. Herrmann, Das infizierte Implantat. Der Orthopäde, 2004. 33(12): p. 1411-1428.
25. Schmelz, A., L. Kinzl, and T. Einsiedel, Osteitis. Der Chirurg, 2006. 77(10): p. 943-962.
26. Walter, G. and R. Hoffmann, Implantat-assoziierte Infektionen in Orthopädie und Unfallchirurgie. Krankenhaus-Hygiene + Infektionsverhütung, 2009. 31(1): p. 8-14.
27. Hansis, M., S. Arens, and C. Wingenfeld, Infektionsraten in der Unfallchirurgie Eine Übersicht anhand der neueren deutschsprachigen Literatur. Der Unfallchirurg, 1997. 100(6): p. 457-464.
28. Tsukayama, D.T., Pathophysiology of posttraumatic osteomyelitis. Clin Orthop Relat Res, 1999(360): p. 22-9.
29. Wright, J.A. and S.P. Nair, Interaction of staphylococci with bone. International Journal of Medical Microbiology, 2010. 300(2-3): p. 193-204.
30. Goldenberg, D.L., Septic arthritis. The Lancet, 1998. 351(9097): p. 197-202.
31. Kipp, F., Posttraumatische Osteitis. Trauma und Berufskrankheit, 2009. 11(2): p. 232-235.
32. Horch, R.E., et al., Osteomyelitis. Der Chirurg, 2013. 84(11): p. 962-969.
33. Lew, D.P. and F.A. Waldvogel, Osteomyelitis, in The Lancet. 2004, Elsevier. p. 369-379.
34. Dirschl, D.R. and L.C. Almekinders, Osteomyelitis. Common causes and treatment recommendations. Drugs, 1993. 45(1): p. 29-43.
35. Bonnaire, F., et al., Knocheninfektionen. Der Unfallchirurg, 2002. 105(8): p. 716-734.
36. Ciampolini, J. and K. Harding, Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? Postgraduate Medical Journal, 2000. 76(898): p. 479-483.
37. Shirtliff, M.E. and J.T. Mader, Acute Septic Arthritis. Clinical Microbiology Reviews, 2002. 15(4): p. 527-544.
38. Robson, M.C., Infection in the surgical patient: an imbalance in the normal equilibrium., in Clinics in Plastic surgery. 1979. p. 493-593.
39. Hansis, M., Pathophysiology of infection — a theoretical approach, in Injury. 1996, Elsevier. p. S/C5-S/C8.
40. Brady, R.A., et al., Osteomyelitis: Clinical Overview and Mechanisms of Infection, in Clinical Microbiology Newsletter. 2006, Elsevier.
41. Gristina, A.G., P.T. Naylor, and Q.N. Myvik, Musculoskeletal infection, microbial adhesion, and antibiotic resistance., in Infect Dis Clin North Am. 1990. p. 391-408.
42. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev, 2002. 15(2): p. 167-93.
43. Jabbouri, S. and I. Sadovskaya, Characteristics of the biofilm matrix and its role as a possible target for the detection and eradication of

- Staphylococcus epidermidis associated with medical implant infections. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2010. 59(3): p. 280-291.
44. Donlan, R.M., Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases, 2002. 8(9): p. 881-890.
 45. Miller, M.B. and B.L. Bassler, QUORUM SENSING IN BACTERIA, in Annual Review of Microbiology. 2001. p. 165-199.
 46. Klosterhalfen, B., et al., Local and Systemic Inflammatory Mediator Release in Patients with Acute and Chronic Posttraumatic Osteomyelitis, in The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. 1996, Williams & Wilkins. p. 372-378.
 47. Prabhakara, R., et al., Murine immune response to a chronic Staphylococcus aureus biofilm infection. Infect Immun, 2011. 79(4): p. 1789-96.
 48. Wagner, C., et al., Die implantatassoziierte posttraumatische Osteitis. Der Unfallchirurg, 2006. 109(9): p. 761-769.
 49. Heppert, V., U. Glatzel, and A. Wentzensen, Postoperative und bakterielle Osteitis. Der Orthopäde, 2004. 33(3): p. 316-326.
 50. Arens, S. and M. Hansis, Risiko der posttraumatischen Osteitis bei Osteosynthesen. Trauma und Berufskrankheit, 2001. 3(4): p. S487-S490.
 51. Josten, C. and C. Schmidt, Postoperative Komplikationen in der Unfallchirurgie. Der Chirurg, 2009. 80(9): p. 790-806.
 52. Schnettler, R. and H.U. Steinau, Septische Knochenchirurgie. 2004, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
 53. Flückiger, U. and W. Zimmerli, Diagnosestellung und Verlaufsmonitoring der postoperativen bakteriellen Osteitis, in Der Orthopäde. 2003, Springer-Verlag.
 54. Kalbitz, M. and H.v. Baum, Frühe postoperative Wundinfektionen. Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 2009. 4(01): p. 49-62.
 55. Tiemann, A.H., et al., [Risk Assessment in the Therapy for Osteomyelitis using Immunological Parameters]. Z Orthop Unfall, 2011. 149(3): p. 330-5.
 56. Weber U, S.S., Infektionen von Knochen und Gelenken, in Infektionskrankheiten: verstehen, erkennen, behandeln. 2003, Georg Thieme Verlag.
 57. Braunschweig, R., et al., Bildgebende Diagnostik bei Osteitis/Osteomyelitis und Gelenkinfekten. Z Orthop Unfall, 2011. 149(EFirst): p. 436-448.
 58. PD Dr. R. Linke, H.W., M. Militz, Bildgebende Diagnostik der Osteitis. Trauma und Berufskrankheit, 2009. S2: p. 193-202.
 59. Weber, A., et al., Bildgebende Verfahren in der Diagnostik der Osteitis. Was gibt es Neues? Trauma und Berufskrankheit, 2002. 4(3): p. 306-313.
 60. Bohndorf, K. and H. Imhof, Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke. 1998, Stuttgart: Thieme-Verlag.
 61. W A Erdman, F.T., H T Jayson, P T Weatherall, K B Ferry, and R M Peshock, Osteomyelitis: characteristics and pitfalls of diagnosis with MR imaging. Radiology, 1991. 180(2): p. 533-539.
 62. Linke, R., H. Weidemann, and M. Militz, Bildgebende Diagnostik der Osteitis. Trauma und Berufskrankheit, 2009. 11(2): p. 193-202.
 63. Kaim, A., et al., Chronic post-traumatic osteomyelitis of the lower extremity: comparison of magnetic resonance imaging and combined

- bone scintigraphy/immunoscintigraphy with radiolabelled monoclonal antigranulocyte antibodies. *Skeletal Radiology*, 2000. 29(7): p. 378-386.
64. Goebel, M., et al., Diagnostik der chronischen Osteitis des Extremitätenskeletts. *Der Unfallchirurg*, 2007. 110(10): p. 859-866.
 65. Lang, G., *Histotechnik*. 2013: Springer Vienna.
 66. Carter, D.H., J. Barnes, and J. Aaron, Histomorphometry of fresh frozen iliac crest bone biopsies. *Calcified Tissue International*, 1989. 44(6): p. 387-392.
 67. Krenn, V. and W. Rütger, *Pathologie des Bewegungsapparates*. 2012: De Gruyter.
 68. Heppert, V., et al., Prinzipien der operativchirurgischen Therapie der Osteitis. *Trauma und Berufskrankheit*, 2002. 4(3): p. 321-328.
 69. Diefenbeck, M. and G.O. Hofmann, Behandlungsstrategie beim Frühinfekt nach operativer Frakturversorgung. *Trauma und Berufskrankheit*, 2003. 5(2): p. s309-s312.
 70. Scheffer, D., et al., Infektionen in der Orthopädie und Traumatologie. *Der Orthopäde*, 2008. 37(7): p. 709-720.
 71. Mader, J.T., Animal models of osteomyelitis. *The American Journal of Medicine*, 1985. 78(6, Supplement 2): p. 213-217.
 72. Patel, M., et al., Animal models for the study of osteomyelitis. *Semin Plast Surg*, 2009. 23(2): p. 148-54.
 73. Windolf, C.D., et al., Implant-associated localized osteitis in murine femur fracture by biofilm forming *Staphylococcus aureus*: A novel experimental model. *Journal of Orthopaedic Research*, 2013. 31(12): p. 2013-20.
 74. Kalicke, T., et al., [Animal models of osteomyelitis]. *Orthopäde*, 2004. 33(3): p. 260-6.
 75. Rissing, J.P., et al., Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immun*, 1985. 47(3): p. 581-6.
 76. Spagnolo, N., et al., Chronic staphylococcal osteomyelitis: a new experimental rat model. *Infect Immun*, 1993. 61(12): p. 5225-30.
 77. Chadha, H.S., et al., Experimental acute hematogenous osteomyelitis in mice. I. Histopathological and immunological findings. *J Orthop Res*, 1999. 17(3): p. 376-81.
 78. Norden, C.W., Experimental osteomyelitis. I. A description of the model. *J Infect Dis*, 1970. 122(5): p. 410-8.
 79. Johansson, A., et al., Anaerobic osteomyelitis. A new experimental rabbit model. *Clin Orthop Relat Res*, 1991(265): p. 297-301.
 80. Schulz, S., H. Steinhart, and R. Mutters, Chronic osteomyelitis in a new rabbit model. *J Invest Surg*, 2001. 14(2): p. 121-31.
 81. Kaarsemaker, S., G.H. Walenkamp, and A.E. vd Bogaard, New model for chronic osteomyelitis with *Staphylococcus aureus* in sheep. *Clin Orthop Relat Res*, 1997(339): p. 246-52.
 82. Johansen, L.K., et al., Pathology and biofilm formation in a porcine model of staphylococcal osteomyelitis. *J Comp Pathol*, 2012. 147(2-3): p. 343-53.
 83. Fitzgerald, R.H., Jr., Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *J Bone Joint Surg Am*, 1983. 65(3): p. 371-80.
 84. Emslie, K.R. and S. Nade, Acute hematogenous staphylococcal osteomyelitis. A description of the natural history in an avian model. *Am J Pathol*, 1983. 110(3): p. 333-45.

85. Marra, A., Animal Models in Drug Development for MRSA, in Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols, Y. Ji, Editor. 2014, Humana Press. p. 333-345.
86. von Köckritz-Blickwede, M., et al., Immunological Mechanisms Underlying the Genetic Predisposition to Severe Staphylococcus aureus Infection in the Mouse Model. *The American Journal of Pathology*, 2008. 173(6): p. 1657-1668.
87. Boxio, R., et al., Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004. 75(4): p. 604-611.
88. Hiltunen, A., E. Vuorio, and H.T. Aro, A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res*, 1993. 11(2): p. 305-12.
89. Rontgen, V., et al., Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res*, 2010. 28(11): p. 1456-62.
90. Flecknell, P., Analgesia of small mammals. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 2001. 4(1): p. 47 - 56.
91. Auer, J., et al., Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2007. 8(1): p. 72.
92. Holstein, J.H., et al., Development of a Stable Closed Femoral Fracture Model in Mice. *Journal of Surgical Research*, 2009. 153(1): p. 71-75.
93. Mannstadt, M., Die Knockout-Maus — ein revolutionierendes Modell in der modernen biomedizinischen Forschung. *Medizinische Klinik*, 1997. 92(9): p. 558-560.
94. Garcia, P., et al., A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: Impact of stability on fracture healing. *Journal of Biomechanics*, 2008. 41(8): p. 1689-1696.
95. Grundnes, O. and O. Reikeraas, Effects of macrophage activation on bone healing. *Journal of Orthopaedic Science*, 2000. 5(3): p. 243-247.
96. Gardner, M., et al., Differential fracture healing resulting from fixation stiffness variability: a mouse model. *Journal of Orthopaedic Science*, 2011. 16(3): p. 298-303.
97. Hagiwara, Y., et al., Fixation stability dictates the differentiation pathway of periosteal progenitor cells in fracture repair. *J Orthop Res*, 2015.
98. Fan, Y., et al., Biomechanical and histological evaluation of the application of biodegradable poly-L-lactic cushion to the plate internal fixation for bone fracture healing. *Clinical Biomechanics*, 2008. 23, Supplement 1(0): p. S7-S16.
99. Ochsner, P.E. and S. Hailemariam, Histology of osteosynthesis associated bone infection. *Injury*, 2006. 37(2, Supplement): p. S49-S58.
100. Inzana, J.A., et al., A novel murine model of established Staphylococcal bone infection in the presence of a fracture fixation plate to study therapies utilizing antibiotic-laden spacers after revision surgery. *Bone*, 2015. 72(0): p. 128-136.
101. Li, D., et al., Quantitative mouse model of implant-associated osteomyelitis and the kinetics of microbial growth, osteolysis, and humoral immunity. *Journal of Orthopaedic Research*, 2008. 26(1): p. 96-105.

102. Liu, Y., et al., Size and habit of mineral particles in bone and mineralized callus during bone healing in sheep. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010. 25(9): p. 2029-2038.
103. Trouillet-Assant, S., et al., Dual Impact of Live *Staphylococcus aureus* on the Osteoclast Lineage, Leading to Increased Bone Resorption. *J Infect Dis*, 2015. 211(4): p. 571-81.
104. de Oliveira, T.H., et al., Sepsis Induced by *Staphylococcus aureus*: Participation of Biomarkers in a Murine Model. *Med Sci Monit*, 2015. 21: p. 345-55.
105. Welsch, T., et al., C-reactive protein as early predictor for infectious postoperative complications in rectal surgery. *Int J Colorectal Dis*, 2007. 22(12): p. 1499-507.
106. Wagner, F., Laboruntersuchungen zur Osteitidiagnostik. *Trauma und Berufskrankheit*, 2009. 11(2): p. 184-186.
107. Atkins, B.L., et al., Prospective Evaluation of Criteria for Microbiological Diagnosis of Prosthetic-Joint Infection at Revision Arthroplasty. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998. 36(10): p. 2932-2939.
108. Walter G, H.W., Hoffmann R, *Mikrobiologie bei Osteitis*. *Trauma und Berufskrankheit*, 2009. 11: p. 189-192.
109. Schwameis, E., F. Abdolvahab, and C. Wurnig, Osteomyelitis. Clinical aspects, diagnosis and therapy. *Der Radiologe*, 1996. 36(10): p. 823-833.
110. Trampuz, A. and W. Zimmerli, Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury*, 2006. 37(2, Supplement): p. S59-S66.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf,

Michael Hambüchen