

Clinical Abstract

## Die Bedeutung von Biofilmen bei Implantat-assoziierten Infektionen

Mit dem steigenden Einsatz von Implantaten in der Chirurgie nimmt auch die Anzahl an Komplikationen zu. Besonders gefürchtet ist die Implantat-assoziierte Infektion. Sie belastet nicht nur den Patienten, sondern verursacht auch hohe Kosten. So belaufen sich die von Krankenversicherungen in den USA zu tragenden Kosten für die antimikrobielle und chirurgische Behandlung einer Implantat-assoziierten Infektion im Durchschnitt auf 30.000 US\$ pro Fall (1–3). Darüber hinaus wird die Diagnostik und Therapie Implantat-assoziiierter Infektionen durch Bildung eines bakteriellen Biofilms erschwert.

### Warum sind Implantat-assoziierte Infektionen so problematisch?

Prinzipiell kann jedes medizinische Implantat von Keimen besiedelt werden. Eine mögliche Konsequenz daraus ist eine Infektion. Durchschnittlich werden etwa 5 % aller chirurgischen Implantate infiziert (3). Implantatinfektionen sind meist Biofilm-assoziiert. Die Kontamination eines Fremdkörpers findet größtenteils bereits

perioperativ statt (4, 5). Bei Implantation von Biomaterialien, wie z. B. von orthopädischen Endoprothesen, Kathetern oder künstlichen Herzklappen, versuchen Zellpopulationen des Wirtes, den Fremdkörper im Rahmen der Zell- und Gewebsintegration zu kolonisieren. Wirtszellen und Bakterien konkurrieren um die Oberflächenbesiedelung des Fremdkörpers („race for the surface“) (6–8) (Abb. 1).

### Welche Mikroorganismen sind an der Entstehung Implantat-assoziiierter Infektionen beteiligt?

Die am häufigsten auf Implantaten identifizierten Mikroorganismen sind koagulase-negative Staphylokokken (30–43 %) – insbesondere *Staphylococcus epidermidis* – und *Staphylococcus aureus* (12–23 %), gefolgt von einer gemischten Keimflora (10–11 %), Streptokokken (9–10 %), gramnegativen Bakterien (3–6 %), Enterokokken (3–7 %) und Anaerobiern (2–4 %). (9–13) (Abb. 2). Unterschiedliche Keime bevorzugen unterschiedliche Implantate. Orthopädische Implantate werden ebenso wie intravasale Katheter und künstliche Herzklappen meist von koagulase-negativen Staphylokokken (*Staphylococcus epidermidis*) besiedelt. Koagulasepositive Staphylokokken wie *Staphylococcus aureus* sind Hauptverursacher von Infektionen von Hämodialysesystemen, Gefäßprothesen und Metallimplantaten, zu denen auch Zahnimplantate und metallische Osteosyntheseimplantate zählen (4, 14).

Knochenzement ist ebenfalls ein Biomaterial, auf dem sich Mikroorganismen ansiedeln können. Durch den Zusatz eines Antibiotikums im Knochenzement kann ein wirksamer Schutz gegen eine Keimbeseidelung entstehen. Zusätzlich wird durch die subinhibitorische Konzentration des

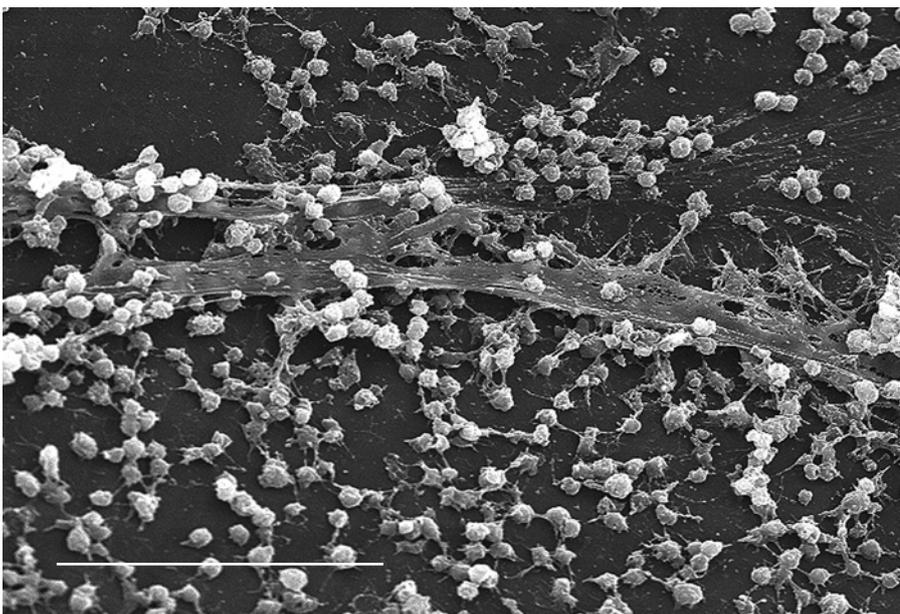


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilms von Staphylokokken; Strichlänge 20 µm. Mit freundlicher Genehmigung von Janice Carr, Centers for Disease Control and Prevention.

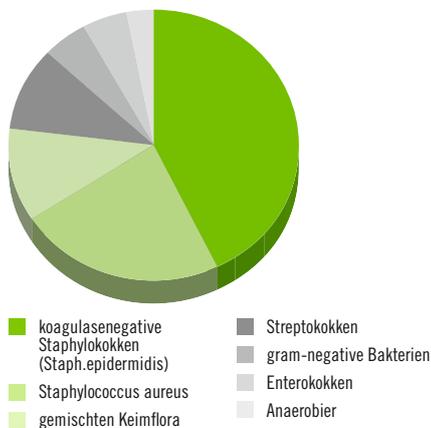


Abb. 2. Keimspektrum Implantat-assoziiertes Infektionen (13).

lokal freisetzen Antibiotikums aus der Knochenzementmatrix eine potentielle Resistenzentwicklung begünstigt. (15, 16).

### Warum neigen Implantate zur bakteriellen Besiedelung?

Im Zusammenhang mit der Implantation von Biomaterialien ist die Infektionsgefahr deutlich erhöht. Je nach seinen biomimetischen Eigenschaften bewirkt Biomaterial eine Abwehrreaktion immunkompetenter Zellen des Wirtes. Bei der Implantation von titan-, nickel- oder chromhaltigen Implantaten bilden sich z. B. histiozytäre Gewebe, bindegewebige Membranen oder fibröse Kapseln. Diese stellen eine ideale Leitstruktur für die Formation von bakteriellen Biofilmen dar. Zudem verursacht der implantierte Fremdkörper eine überschießende Komplementaktivierung mit folgender Entzündungsreaktion. Dies reduziert die Fähigkeit des Organismus, Fremdkörper durch Phagozytose zu eliminieren (17).

Wesentlich für die Therapie einer Implantat-assoziierten Infektion ist die frühzeitige Diagnose mit sicherem Keimnachweis. Haben die Bakterien den Wettkampf um die Kolonisierung eines Biomaterials („race for the surface“) erst gewonnen und sich etabliert, beginnt die Biofilmbildung. Hierdurch können sie der Immunreaktion des Wirtes entgehen und sich vor antimikrobiellen Substanzen schützen. (18)

### Was ist ein Biofilm und wie entsteht er?

Bakterien können in planktonischer und in sessiler Form existieren. Sessile Bakterien sind Oberflächen-assoziiert und leben in Biofilmen. Dabei ist der Biofilm als eine natürliche Überlebensstrategie und strukturierte Gemeinschaft von Mikroorganismen definiert, die sich unter anderem durch eine Beeinträchtigung von Immunreaktionen

des Wirtes auszeichnet. Der Biofilm ist in einer aus Glykolipiden und Glykoproteinen zusammengesetzten Polymermatrix eingeschlossen (Exopolysaccharidgel, „Schleim“), die einer lebenden oder inerten Oberfläche anhaftet (19–21).

Die Bildung des Biofilms durchläuft fünf Phasen (22–24) (Abb. 3):

**Phasen 1 und 2: Adhäsion** – Die Adhäsion von Mikroorganismen an festen Oberflächen ist in der Natur weit verbreitet (19, 25), etwa bei der Besiedlung von Epithelzellen. Die Adhäsion an ein Implantat dauert circa 1–2 Stunden. Sie wird durch zahlreiche Faktoren determiniert, z. B. durch die Art der Zelloberfläche und Rezeptoren des Mikroorganismus, die physikochemischen Eigenschaften der Oberfläche oder das Umgebungsmedium (26). Die Bakterien konkurrieren dabei mit den Wirtszellen bei der Besiedlung der Oberfläche (27).

**Phase 3: Proliferation** – Nach circa 2–3 Stunden beginnen die Bakterien zu proliferieren. Die zunehmende Proliferation und Reifung der Bakterien unter Ausbildung eines Netzwerks aus mehreren Zellschichten bewirkt eine verstärkte Adhäsion an das Fremdmaterial (28).

**Phase 4: Reifung** – Nach einem weiteren Tag bildet sich der eigentliche, stabile Biofilm mit Ausbildung einer mehrschichtigen, gelatinösen Matrix, in der sich die Bakterien einbetten (26). Nährstoffe werden zurückgehalten und Bakterien vor immunologischen Abwehrreaktionen oder Antibiotika geschützt (29).

**Phase 5: Ablösung** – Einzelne Bakterien können sich nun aus dem Biofilm lösen, entfernte Regionen kolonisieren und zusätzliche Infektionsherde etablieren (30).

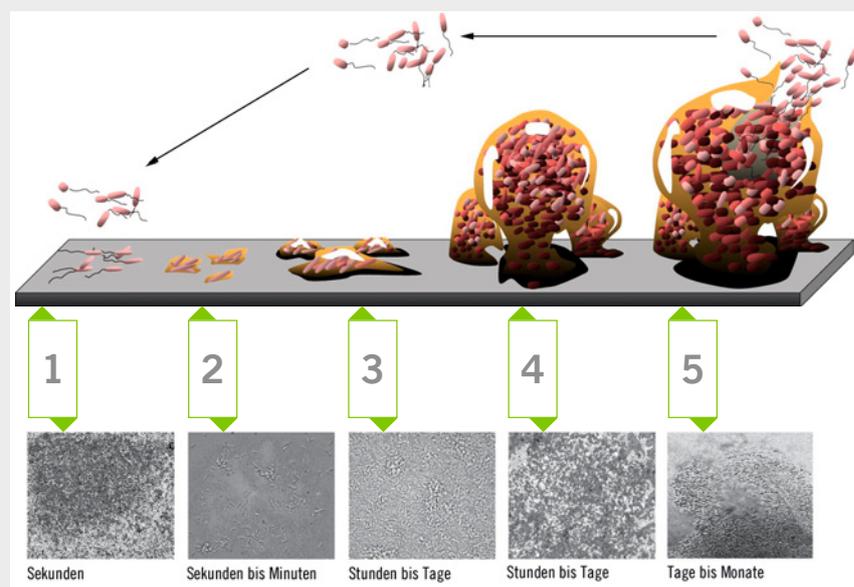


Abb. 3. Bildung eines Biofilms: 1. reversibles Anhaften von Bakterien, 2. irreversible Bindung an der Oberfläche des Fremdmaterials, 3. bakterielles Wachstum, 4. Reifung und Bildung der Polymermatrix, 5. Ablösung, Mit freundlicher Genehmigung von D. Davis (22).

## Warum sind Antibiotika gegen Bakterien in Biofilmen nahezu unwirksam?

Die Bildung des Biofilms ist dynamisch und wird durch externe Bedingungen und die Mikroumwelt im Biofilm bestimmt (31). Bakterien sind im Biofilm für das Immunsystem schlecht oder gar nicht erreichbar und zusätzlich hemmt die „Schleimschicht“ die Phagozytosefähigkeit und Proliferation körpereigener Immunzellen (28). Die relative Hypovaskularität im Bereich eines Implantates, durch einen Infekt verstärkt, begünstigt diesen Prozess und reduziert die Immunkompetenz des Wirts weiter (32).

### Intrinsische Resistenz

Der intrinsische Schutz gegenüber Antibiotika beruht auf physikalischen Mechanismen und einer reduzierten Wachstumsrate der Bakterien im Biofilm (33). Das Exopolysaccharidgel wirkt als physikalische Barriere, indem es die Penetration einiger Antibiotika entweder durch Bindung und Inaktivierung oder durch limitierte Diffusion verhindern kann. Bakterien, die von einer hohen Zelldichte beeinflusst werden, proliferieren langsamer oder befinden sich in einer sessilen Phase (19, 34). Das langsame Wachstum und der deutlich reduzierte Stoffwechsel ermöglicht es ihnen, einer verminderten Nährstoffzufuhr, Änderungen des pH-Werts und Sauerstoffradikalen standzuhalten (26, 31). Das sauerstoffarme Milieu in tiefen Schichten des Biofilms fördert zudem die Resistenzentwicklung durch verminderte Aufnahme antimikrobieller Substanzen (35).

Das reduzierte Wachstum von Bakterien im Biofilm scheint eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen, insbesondere gegenüber zellwandaktiven, von Wachstumsphasen abhängigen Antibiotika zu spielen (36). Im Biofilm lebende Bakterien tolerieren Antibiotikakonzentrationen, die 10–1000-fach über den Konzentrationen liegen, die benötigt werden, um vergleichbare planktonische Lebensformen abzutöten. Dadurch können in

Biofilmen organisierte Bakterien kaum noch erfolgreich bekämpft werden. (20, 37–39).

### Erworbene Resistenz

Die erworbene Resistenz basiert auf phänotypischen Unterschieden der Mikroorganismen im Biofilm, die sich besonders auf ihre Wachstumsrate und Genexpression auswirken (20, 33). Regulatorische Systeme passen die Genexpression an die sich wechselnden Bedingungen der Umgebung an, nicht zuletzt an die Zunahme der Zelldichte im Biofilm. Die Zell-zu-Zell-Kommunikation, das sogenannte „Quorum sensing“, beschreibt diesen Regulationsprozess (40, 41). Quorum sensing spielt eine entscheidende Rolle für die Synchronisation der Genexpression und die funktionelle Koordination bakterieller Gemeinschaften und beeinflusst die Entstehung des Biofilms maßgeblich (42). Der Austausch genetischen Materials zwischen Bakterien ermöglicht die Ausbreitung antibiotikaresistenter Phänotypen (20, 33).

Subpopulationen der Mikroorganismen in Biofilmen, „small-colony variants“, verfügen über die Fähigkeit, einen ruhenden metabolischen Status einzunehmen (43). Diese weisen ebenfalls eine verminderte Sensibilität gegenüber Antibiotika auf. Vermutlich werden sie mit zunehmender Entwicklung des Biofilms gebildet und fungieren als Barriere für Sauerstoff und Nährstoffe. Darüber hinaus wird die Existenz einer Art spezialisierter Bakterien, so genannter „persister cells“ im Biofilm angenommen (44, 45), die in Gegenwart von Antibiotika weder proliferieren noch absterben. (46) „Persister cells“ und „small-colony variants“ sind nach Beendigung einer Antibiotikatherapie in der Lage, sich zu „normalen“ Bakterien umzuwandeln (47, 48) und sind wahrscheinlich hauptverantwortlich für die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen.

## Die Mechanismen der bakteriellen Resistenz in Biofilmen sind multifaktoriell:

### Intrinsische Resistenz

- Verminderte Penetration antimikrobieller Substanzen durch den Biofilm
- Chemisch alterierte Mikroumwelt, z. B. Sauerstoffarmut, Veränderung des pH-Werts

### Erworbene Resistenz

- Reduzierte Wachstumsrate der Bakterien im Biofilm
- Veränderte, multiresistente Phänotypen mit Expression von Resistenz-Genen
- „Persister cells“ und „small-colony variants“

## Wie können Biofilm-assoziierte Infektionen diagnostiziert werden?

In der orthopädischen Chirurgie werden Implantatinfekte entsprechend ihres zeitlichen Auftretens nach der Operation klassifiziert:

- Frühinfekte: < 3 Monate
- Low-grade-Infekte: 3–24 Monate
- Spätinfekte: >24 Monate

Frühinfekte und Low-grade- bzw. verzögerte Infekte werden vorwiegend während des operativen Eingriffes erworben, während Spätinfekte meist einer hämatogenen Streuung zuzuschreiben sind (49).

## Welche Befunde weisen auf einen Infekt hin?

Patienten mit Frühinfekten weisen häufig typische Infektzeichen auf, wie Schmerz, Rötung, Schwellung, Überwärmung, Sekretabsonderung aus der Wunde. Dagegen stellen Low-grade-Infekte und Spätinfekte eine diagnostische Herausforderung dar, da in der Regel maßgebliche Infektzeichen fehlen. Das Leitsymptom Schmerz tritt nahezu bei allen Infektionen auf. Es ist das Ergebnis des Lockerungsprozesses des Im-

plantats und kommt daher auch bei aseptischen Lockerungen vor. Insofern erlaubt nur eine Kombination klinischer, laborchemischer, histopathologischer, mikrobiologischer (Abb. 4) und radiologischer Befunde die Diagnose einer Biofilm-assoziierten Infektion (50). Die präoperative Differenzierung zwischen aseptischer und septischer Lockerung bleibt jedoch schwierig, viele Biofilm-assoziierte Implantatinfektionen werden nicht erkannt (19, 51, 52).

### Kann intraoperative Diagnostik zu einem Erregernachweis beitragen?

Bakteriologische und histopathologische Kulturen von Gewebeproben, die intraoperativ an unterschiedlichen Stellen entnommen werden, bieten die Möglichkeit eines optimierten Keimnachweises. Dazu sollten Antibiotika mindestens zwei Wochen präoperativ abgesetzt werden, die Probenentnahme sollte vor Verabreichung der perioperativen Antibiose erfolgen (38, 53).

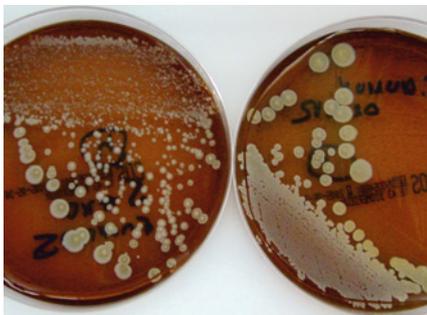


Abb. 4. Pathogene Keime: Kultur in Petrischalen (Dr. Miguel Pons Cabrafiga, Barcelona, Spanien).

### Warum erschweren Biofilme den Infektnachweis?

Eine optimale chirurgische und antibiotische Behandlung erfordert den Nachweis des ursächlichen Erregers. Aufgrund ihres heruntergefahrenen Metabolismus und des langsamen Wachstums gelingt der Nachweis von Bakterien in Biofilmen im Rahmen von Routineuntersuchungen jedoch nur schwer. Gerade eine Low-grade-Infektion kann als aseptische Implantatlockerung fehlinterpretiert werden. Operateur und Mikrobiologe müssen daher aktiv nach „small-colony variants“ suchen (43). Kulturen zur

Detektion von „small-colony variants“ und langsam wachsender Keime wie Propionibacterium-Spezies erfordern eine Bebrütungszeit von mindestens 10 bis 14 Tagen (54), evtl. unter Zugabe von Häm in und Menadion zum Kulturmedium zur Steigerung der Wachstumsrate (55, 56).

#### Optimierter Keimnachweis durch

- Histopathologische und bakteriologische Kulturen intraoperativ entnommener Proben
- Kultivierung explantierter Implantate in einem angereicherten Wachstumsmedium
- Ablösung von Mikroorganismen von der Oberfläche eines entfernten Implantates per Ultraschall
- Mindestens 10 bis 14 Tage Bebrütungszeit

### Welche prophylaktischen Maßnahmen können die Biofilmbildung verhindern?

Nach Etablierung eines Biofilm-assoziierten Implantatinfekts ist in der Regel die Entfernung des Implantats mit radikalem Debridement in Kombination mit einer ausgedehnten Antibiose meist die einzig verbleibende Therapieoption, um Mikroorganismen effektiv zu eliminieren. Ziel sollte daher in erster Linie sein, einer Bildung von Biofilmen vorzubeugen. Neben einem sterilen Management während der Operation und Pflege wurden dazu Materialien mit antimikrobiellen Eigenschaften entwickelt, die eine Kolonisation durch Mikroorganismen verhindern sollen.

### Oberflächenmodifikationen mit antimikrobieller Wirkung

Modifikationen von Implantatoberflächen können eine Kolonisierung durch Mikroorganismen verhindern. Hierzu wurden unterschiedliche Technologien zur Veränderung von Polymeroberflächen und Ausrüstung medizinischer Implantate mit antimikrobiellen Agentien entwickelt, insbesondere wird die Herstellung bakterizider oder bakteriostatischer Oberflächen angestrebt (57–59). Ideal wären Implantate, die im Wesentlichen drei antimikrobiellen Prinzipien folgen:

1. Barrierschutz zur Vermeidung der mikrobiellen Anhaftung
2. Aktive selektive Wirkstoffabgabe
3. Penetration des Wirkstoffes in die Tiefe

Passive Oberflächenbeschichtungen (Coatings) enthalten z.B. Polyethylenglykol, Polyethylenoxid oder hydrophiles Polyurethan (60–62), deren Effektivität ist jedoch beschränkt und hängt stark vom jeweiligen Mikroorganismus ab. Alternative Ansätze bieten aktive Coatings oder lokale Wirkstoffträger. Diese gewährleisten als Drug-Delivery-Systeme direkt vor Ort die kontinuierliche Freisetzung von Wirkstoffen wie Antibiotika, Antiseptika oder Schwermetallionen (63–65).

### Drug-Delivery-Systeme

Die Basisstrategie beruht auf der breiten prophylaktischen Wirkung von Antibiotika, Antiseptika oder Schwermetallionen, die das medizinische Implantat vor allem vor mikrobieller Besiedelung und der Bildung von Biofilmen schützen soll. Hierzu werden spezielle lokale Freisetzungssysteme mit einer Kombination von Biomaterialien und antimikrobiellen Zusätzen bzw. Wirkstoffen eingesetzt (8, 66). In der kritischen Phase peri- und postoperativ wenige Stunden nach Implantation sollten hohe Wirkstoffkonzentrationen am Implantationsort erreicht werden. Die Gefahr der Entwicklung von Nebenwirkungen des Wirkstoffes ist wegen der lokalen Anwendung zu vernachlässigen (14, 67–71).

Drug-Delivery-Systeme auf der Basis nicht-biodegradierbarer Polymere, z. B. Polyurethan, Silikon oder Polymethylmethacrylat (PMMA), gewähren im Vergleich mit biodegradierbaren Wirkstoffträgern, z. B. biodegradierbaren Gentamicinkugeln oder gentamicinhaltigen Knochenersatzmaterialien, zwar eine insgesamt geringere, dafür aber oft länger anhaltende Wirkstoffausschüttung im Verhältnis zur eingebrachten Menge.

#### Beispiele lokaler Wirkstoffträger:

- PMMA-Knochenzement
- gentamicinhaltige PMMA-Kugeln
- biodegradierbare Gentamicinkugeln
- resorbierbare, gentamicinhaltige Kollagenschwämme
- gentamicinhaltige Knochenersatzmaterialien
- wirkstoffimprägnierte, resorbierbare Nahtmaterialien
- Implantat-Beschichtungen aus Polymer, Silikon, Polyhydroxyalkanoat, Polylactid, Silber oder Kupfer

#### Beispiel Gentamicin: Warum ist die initiale Freisetzung hoher lokaler Antibiotikakonzentrationen nach der Implantation so wichtig?

Innerhalb der ersten 72 Stunden lassen sich z. B. mit dem bakterizid wirkenden Aminoglykosid Gentamicin hohe Wirkstoffkonzentrationen erzielen (Abb. 5) (39, 72). Diese können die Bildung von Biofilmen verhindern und die Häufigkeit Implantat-assoziiertes Infektionen reduzieren (73–75).

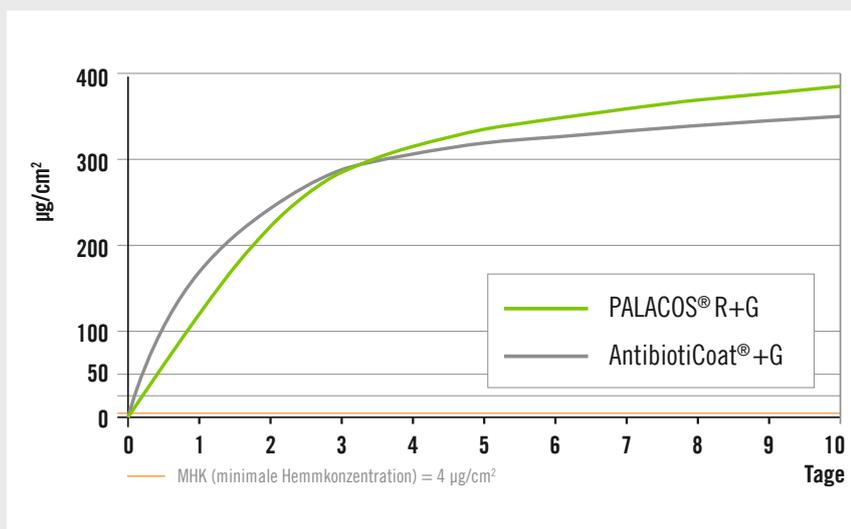


Abb. 5: Verlauf der Elution von Gentamicin aus PALACOS<sup>®</sup> R+G und AntibiotiCoat<sup>®</sup> +G auf einem Titan-Implantat. (76)

Eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration bewirkt, dass selbst die nach üblichen Antibiogrammen als mäßig oder nicht sensibel eingestuften Erreger, etwa bestimmte Staphylokokkus-Stämme oder gramnegative Problemkeime, häufig noch erfasst werden (77, 78).

## Literatur

1. Klussmann R. [Psychosocial problems from the viewpoint of psychosomatic medicine]. *Aktuelle Probl Chir Orthop* 1990; 34:153-158.
2. Heitemeyer U, Hax PM. [Economic aspects of bone infection]. *Aktuelle Probl Chir Orthop* 1990; 34:162-164.
3. Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 2004; 350:1422-1429.
4. Schierholz JM, Morsczech C, Brenner N, et al. [Special aspects of implant-associated infection in orthopedic surgery. From the pathophysiology to custom-tailored prevention strategies]. *Orthopade* 2004; 33:397-404.
5. Nasser S. The incidence of sepsis after total hip replacement arthroplasty. *Semin Arthroplasty* 1994; 5:153-159.
6. Gristina AG, Giridhar G, Gabriel BL, Naylor PT, Myrvik QN. Cell biology and molecular mechanisms in artificial device infections. *Int J Artif Organs* 1993; 16:755-763.
7. Schierholz JM, Beuth J, Pulverer G. Adherent bacteria and activity of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:158-160.
8. Stemberger AW, Schwabe J, Ibrahim K et al. New Antibiotic Carriers and Coatings in Surgery. In: Walenkamp GHM editors(s). *Local Antibiotics in Arthroplasty: State of the Art from an Interdisciplinary Point of View*. Thieme-Verlag 2007; p. 13-22.
9. Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect* 2002; 4:481-489.
10. Steckelberg JM, Osmon DR. Prosthetic Joint Infection. In: Waldvogel FA, Bisno AL, eds. *Infections associated with indwelling medical devices*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2000; 173-209.
11. Pandey R, Berendt AR, Athanasou NA. Histological and microbiological findings in non-infected and infected revision arthroplasty tissues. The OSIRIS Collaborative Study Group. *Oxford Skeletal Infection Research and Intervention Service. Arch Orthop Trauma Surg* 2000; 120:570-574.
12. Segawa H, Tsukayama DT, Kyle RF, Becker DA, Gustilo RB. Infection after total knee arthroplasty. A retrospective study of the treatment of eighty-one infections. *J Bone Joint Surg Am* 1999; 81:1434-1445.
13. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly* 2005; 135:243-251.
14. Kittinger C, Marth E, Windhager R et al. Antimicrobial activity of gentamicin palmitate against high concentrations of *Staphylococcus aureus*. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22(6): 1447-1453.
15. Kendall RW, Duncan CP, Smith JA, Ngui-Yen JH. Persistence of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots. A reason for caution. *Clin Orthop Relat Res* 1996:273-280.
16. Neut D, van de Belt H, Stokroos I, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:885-891.
17. Schierholz JM, Beuth J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect* 2001; 49:87-93.
18. Costerton JW, Ellis B, Lam K, Johnson F, Khoury AE. Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2803-2809.
19. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318-1322.
20. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236:163-173.
21. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:167-193.
22. Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol* 2007; 5:e307.
23. Vacheethasane K, Marchant RE. In: An YH, Friedman RJ, eds. *Handbook of bacterial adhesion: Principles, methods and applications* Totowa, (NJ): Humana Press Inc., 2000; 73-90.
24. Wagner VE, Iglewski BH. *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 35:124-134.
25. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41:435-464.
26. Dunne WM, Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:155-166.
27. Gristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg Am* 1985; 67:264-273.
28. von Eiff C, Heilmann C, Peters G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:843-846.
29. Patel JD, Ebert M, Ward R, Anderson JM. S. *epidermidis* biofilm formation: effects of biomaterial surface chemistry and serum proteins. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80:742-751.
30. Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol* 2006; 296:133-139.
31. Vinh DC, Embil JM. Device-related infections: a review. *J Long Term Eff Med Implants* 2005; 15:467-488.
32. Hausman MR, Rinker BD. Intractable wounds and infections: the role of impaired vascularity and advanced surgical methods for treatment. *Am J Surg* 2004; 187:44S-55S.
33. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1387-1392.
34. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005; 13:34-40.
35. Tresse O, Jouenne T, Junter GA. The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36:521-526.
36. Ashby MJ, Neale JE, Knott SJ, Critchley IA. Effect of antibiotics on non-growing planktonic cells and biofilms of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 33:443-452.
37. Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 2003; 426:306-310.
38. Widmer AF. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin Infect Dis* 2001; 33 Suppl 2:S94-106.
39. Frommelt L, Kühn KD Properties of Bone Cement: Antibiotic-Loaded Cement. In: (Eds.) Breusch S, Malchau H. *The Well-Cemented Total Hip Arthroplasty*. Springer Verlag 2005; S. 86-92.
40. Otto M. Quorum-sensing control in *Staphylococci* -- a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiol Lett* 2004; 241:135-141.
41. Otto M. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosci* 2004; 9:841-863.
42. Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol* 2005; 43 Spec No:101-109.
43. Neut D, van der Mei HC, Bulstra SK, Busscher HJ. The role of small-colony variants in failure to diagnose and treat biofilm infections in orthopedics. *Acta Orthop* 2007; 78:299-308.
44. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322:107-131.
45. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002; 292:107-113.
46. Cogan NG. Effects of persister formation on bacterial response to dosing. *J Theor Biol* 2006; 238:694-703.
47. Roberts ME, Stewart PS. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* 2005; 151:75-80.
48. Lewis LA, Li KB, Gousse A, et al. Genetic and molecular analysis of spontaneous respiratory deficient (res-) mutants of *Escherichia coli* K-12. *Microbiol Immunol* 1991; 35:289-301.
49. Zimmerli W, Ochsner PE. Management of infection associated with prosthetic joints. *Infection* 2003; 31:99-108.
50. Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury* 2006; 37 Suppl 2:S59-66.
51. Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, et al. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg Br* 1998; 80:568-572.

52. Neut D, van Horn JR, van Kooten TG, van der Mei HC, Busscher HJ. Detection of biomaterial-associated infections in orthopaedic joint implants. *Clin Orthop Relat Res* 2003;261-268.
53. Spangehl MJ, Masri BA, O'Connell JX, Duncan CP. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am* 1999; 81:672-683.
54. Schäfer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis* 2008; 47:1403-1409.
55. Looney WJ. Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci* 2000; 57:317-322.
56. Kahl BC, Belling G, Reichelt R, Herrmann M, Proctor RA, Peters G. Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J Clin Microbiol* 2003; 41:410-413.
57. Lin TL, Lu FM, Conroy S, Sheu MS, Su SH, Tang L. Antimicrobial coatings: a remedy for medical device-related infections. *Med Device Technol* 2001; 12:26-30.
58. Kühn KD. In-vitro release of gentamicinpalmitate coating in uncemented titanium implants. *International Journal of Nano and Biomaterials* 2010; 3: 94-106.
59. Kühn KD, Brünke J. Effectiveness of a novel gentamicinpalmitate coating on biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Nano and Biomaterials* 2010; 3: 107-117.
60. Ademovic Z, Holst B, Kahn RA, et al. The method of surface PEGylation influences leukocyte adhesion and activation. *J Mater Sci Mater Med* 2006; 17:203-211.
61. Kaper HJ, Busscher HJ, Norde W. Characterization of poly(ethylene oxide) brushes on glass surfaces and adhesion of *Staphylococcus epidermidis*. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003; 14:313-324.
62. Nagel JA, Dickinson RB, Cooper SL. Bacterial adhesion to polyurethane surfaces in the presence of pre-adsorbed high molecular weight kininogen. *J Biomater Sci Polym Ed* 1996; 7:769-780.
63. Kühn KD, Vogt S. Antimicrobial Implant Coating in Arthroplasty. In: Wahlenkamp GHIM editor(s). *Local Antibiotics in Arthroplasty: State of the Art from an Interdisciplinary Point of View*. Thieme-Verlag 2007; 23-30.
64. Matl FD, Zlotnyk J, Obermeier A et al. New anti-infective coatings of surgical sutures based on a combination of antiseptics and fatty acids. *J Biomater Sci Polym Ed* 2009; 20(10): 1439-1449.
65. Matl FD, Obermeier A, Repmann S et al. New anti-infective coatings of medical implants. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(6): 1957-1963.
66. Gorman S, Jones D. Antimicrobial biomaterials for medical devices. *Medical Device Manufacturing and Technology* 2002:97-101
67. Gollwitzer H, Ibrahim K, Meyer H, Mittelmeier W, Busch R, Stemberger A. Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:585-591.
68. Gollwitzer H, Thomas P, Diehl P, et al. Biomechanical and allergological characteristics of a biodegradable poly(D,L-lactic acid) coating for orthopaedic implants. *J Orthop Res* 2005; 23:802-809.
69. Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, et al. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone* 2005; 36:770-778.
70. Vogt S, Kühn KD, Gopp U, Schnabelrauch M. Resorbable antibiotic coatings for bone substitutes and implantable devices. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 2005; 36: 814 – 819.
71. Vogt S, Schnabelrauch M, Kühn KD. Antibiotikum-/Antibiotika-Polymer-Kombination. 2002. DE10114247A1.
72. Kühn K. Bone cements. Up-to-date comparison of physical and chemical properties of commercial materials. Berlin, Heidelberg, New York, Tokio: Springer, 2000.
73. Espehaug B, Engesaeter LB, Vollset SE, Havelin LI, Langeland N. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Review of 10,905 primary cemented total hip replacements reported to the Norwegian arthroplasty register, 1987 to 1995. *J Bone Joint Surg Br* 1997; 79:590-595.
74. Engesaeter LB, Lie SA, Espehaug B, Furnes O, Vollset SE, Havelin LI. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop Scand* 2003; 74:644-651.
75. Engesaeter LB, Espehaug B, Lie SA, Furnes O, Havelin LI. Does cement increase the risk of infection in primary total hip arthroplasty? Revision rates in 56,275 cemented and uncemented primary THAs followed for 0-16 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop* 2006; 77:351-358.
76. Data on file at Heraeus Medical GmbH.
77. Wahlig H, Buchholz HW. [Experimental and clinical studies on the release of gentamicin from bone cement]. *Chirurg* 1972; 43:441-445.
78. Buchholz HW, Gartmann HD. [Infection prevention and surgical management of deep insidious infection in total endoprosthesis]. *Chirurg* 1972; 43:446-453.

