



# Een Blok aan je Been

**Een interdisciplinair onderzoek naar infectiepreventie bij  
botgerelateerde implantaten**

**Rosanna Denis  
Doret de Rooij  
Liberal Arts & Sciences**



**Interdisciplinair onderzoek binnen de bacheloropleiding  
Liberal Arts & Sciences aan de Universiteit Utrecht**

**11 april 2014**

**Rosanna Denis  
3584291  
Microbiologie  
Vakreferent: Dr. Ir. W. van Schaik**

**Doret de Rooij  
3673642  
Geneeskunde  
Vakreferent: Dr. F. Hietbrink**

**Interdisciplinair begeleider: Drs. R.S. van Doorn**

## Inhoudsopgave

<b>Inleiding.....</b>	<b>p. 5</b>
<b>Inzichten vanuit de Geneeskunde.....</b>	<b>p. 8</b>
Profylactische Antibiotica.....	p. 8
Tijdstip van Débridement.....	p. 10
Laminaire Luchtstromen.....	p. 11
Perioperatieve Temperatuur.....	p. 12
Bloedleegte.....	p. 13
Externe en interne fixatie.....	p. 13
Pin vs. Plaat.....	p. 14
Wond Sluiten.....	p. 15
Wondbedekking.....	p. 16
Biofilms.....	p. 17
Conclusie.....	p. 18
<b>Inzichten vanuit de Microbiologie.....</b>	<b>p. 19</b>
Biologie en Virulentie	
Ziekteverwekkers van Prosthetic Joint Infection.....	p. 19
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	p. 20
<i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	p. 20
Biofilms.....	p. 21
Conjugatie en Resistentie.....	p. 23
Up- en Downregulatie van Genen.....	P. 24
Quorum-Sensing.....	p. 24
Pathogenese en Virulentiefactoren.....	P. 25
Preventiemogelijkheden	
Profylactische Medicatie.....	p. 27
Antiresistentie.....	p. 28
Antivirulentie Agenten.....	p. 29
Gericht tegen Bacteriële Groei en Overleving.....	p. 29
Discussie.....	p. 31
<b>Integratie van Disciplines.....</b>	<b>p. 33</b>
Theoretisch kader.....	p. 33
Common Ground.....	p. 35
'A more comprehensive understanding' .....	p. 37
<b>Conclusie en Discussie.....</b>	<b>p. 37</b>
<b>Referenties.....</b>	<b>p. 39</b>

## ***Inleiding***

De zorg is een uitdijende sector. Een toenemend maakbaarheidsideaal en bijbehorende hoge verwachtingen laten de zorgvraag en het jaarlijks aantal ingrepen toenemen. Waar de uitroep 'gelukkig Nieuwjaar' gebruikelijk lijkt, neemt 'een gezond Nieuwjaar' het langzaam over. Met een stijging van gemiddeld 677,2 chirurgische ingrepen per 10.000 inwoners in 1995 naar maar liefst 851,4 in 2010 (CBS, 2014) is deze trend duidelijk zichtbaar. Er is steeds meer mogelijk, maar men verlangt ook meer van de dokter. De keerzijde van de medicalisering van de samenleving is echter dat de hoeveelheid schade opgelopen in het ziekenhuis (iatrogenese) ook toeneemt. Vrijwel iedere behandeling brengt ook risico's met zich mee. Hoewel de risico's gevoelsmatig slinken nu het steeds gebruikelijker is om operaties te ondergaan, blijft de kans op infectie altijd bestaan. Het plaatsen van lichaamsvreemde materialen brengt hierbij een extra risico met zich mee (Achermann et al., 2013). Wat begint als een relatief eenvoudige ingreep, kan met een geïnfecteerde plaat, schroef of pen ter stabilisatie van een breuk desastreuze gevolgen hebben of zelfs leiden tot verlies van de betrokken ledemaat.

Hoewel het aantal infecties rond implantaten de laatste jaren is gedaald (Jämsen et al., 2010), zijn er toch problemen vanwege met name de toenemende resistentie van de ziekteverwekkers tegen de gegeven antibiotica. Tussen 2000 en 2006 was 45.7% van de huidbacterie *Staphylococcus aureus* resistent tegen oxacilline, een veelgebruikt antibioticum. In die tijd was 15.6% van de darmbacterie *Escherichia coli* resistent tegen ciprofloxacin of ofloxacin en was 12.5% van de darmbacterie *Enterococcus* resistent tegen vancomycine, welke alle drie veelgebruikte antibiotica zijn (Benoit et al., 2013). Bacteriën blijken de bestrijdingsmiddelen steeds vaker te kunnen omzeilen, waardoor zij overleven en mogelijk ooit een einde maken aan het nut van antibiotica. Het is voor de mens een uitdaging nieuwe manieren te vinden om deze infecties te bestrijden. Een ideale situatie zou echter zijn dat de patiënten niet geïnfecteerd raken; voorkomen is nog altijd beter dan genezen.

### *Maar hoe kunnen infecties van botgerelateerde implantaten worden voorkomen?*

Dit probleem is er een van complexe aard. Er is informatie nodig over de betrokken ziekteverwekkers, de manier waarop zij werken en overleven, de reacties die zij ter plaatse opwekken en de vorm van schade die ontstaat aan het lichaam. Er moet worden gekeken naar therapiemogelijkheden ter plaatse, maar ook de manier waarop de therapie ter plaatse kan komen. Daarnaast is er nog de mens die betrokken is, die ziek is of juist niet, die zich moet houden aan therapieën en voorschriften, die verschillende besmettingshaarden kan hebben en die dit probleem voor een langere tijd met zich mee zal dragen. Kortom, om het probleem op te lossen is het van belang dat er kennis en begrip is van vele variabelen. Er is niet één discipline die alle variabelen

omvat en in staat is een eenduidig antwoord te geven; Er is een interdisciplinaire aanpak nodig.

In de strijd tegen het ontstaan van infecties bij botgerelateerde implantaten zijn voornamelijk twee disciplines betrokken. De microbiologie is onderzoekend en proactief en kijkt op kleine schaal naar het probleem. Onderzocht wordt wat de precieze mechanismen zijn achter de infectie en welke stappen er ondernomen kunnen worden om de processen te beïnvloeden, waarbij de focus ligt op het lokale systeem. De geneeskunde is reactief en heeft het doel om mensen in eerste instantie beter te maken. De mens staat centraal in het zoeken naar de best mogelijke situatie. Vanuit het probleem van infectie wordt teruggeredeneerd in het proces dat hieraan ten grondslag ligt. De microbioloog en de geneeskundige zullen daarom samen de eerst nodige stap moeten zetten en een eerste indicatie geven van het probleem.

Daarnaast is er een derde discipline die belangrijke inzichten zou kunnen leveren en dat is de werktuigbouwkunde. Deze richt zich op de benodigde materialen voor de implantaten, aangezien het prothesemateriaal gevoelig is voor aanhechting van pathogenen. Zodra het materiaal is geïnfecteerd, kan er infectie optreden tijdens en na plaatsing bij de patiënt. Deze kennis ontbreekt bij de geneeskundige en de microbioloog. De werktuigbouwkundige kan echter ook pas in een later stadium aan de slag met de eisen die gesteld worden door de microbiologie en de geneeskunde. Deze twee laatste zullen zich als eerste moeten buigen over een oplossing.

De hoofdvraag wordt opgesplitst in twee disciplinaire onderzoeken. De geneeskunde onderzoekt infecties die gepaard gaan met stabilisatie van botbreuken. Omdat in de geneeskunde vanuit de kliniek geredeneerd wordt, zijn er veel onderzoeken gedaan naar implantaten op specifieke locaties in specifieke botten. Binnen de breuken wordt op breuken van het scheenbeen (tibia) gericht. Dit is een bot dat relatief vaak breekt en vaak geïnfecteerd raakt. Onderzoeken die naar tibia gedaan zijn, zullen relatief grotere variatie in uitkomsten hebben tussen verschillende gevonden therapieën zodat een betrouwbaardere uitkomst kan worden gevonden voor preventie van infectie. De specifieke vraag is: Welke perioperatieve factoren zijn van invloed in de preventie van geïnfecteerd osteosynthesemateriaal gebruikt in tibiafracturen?

De microbiologie kijkt naar de interactie tussen implantaat, pathogeen en het lichaam en is hierdoor minder afhankelijk van de locatie in het lichaam. Hoewel locatie niet zozeer een beperkende factor is voor het onderzoek van de microbioloog, is er wel veel onderzoek gedaan naar gewrichtsprothesen en de infectieziekten die daarmee gepaard gaan. Om het onderwerp af te bakenen, zal de microbiologie zich richten op *Prosthetic-Joint Infection (PJI)*, infecties van gewrichtsprothesen. De microbiologie redeneert vanuit de infectieveroorzaker en moet zich wat betreft bacteriën specificeren. De meest voorkomende infectieveroorzakers bij PJI zijn de staphylococci, met name de bacterie *Staphylococcus aureus* en *Staphylococcus epidermidis*. De

specifieke vraag is: Welke microbiële factoren zijn van belang in de preventie van de door staphylococceen veroorzaakte *Prosthetic Joint Infections* en wat zijn de preventiemogelijkheden?

Na de twee disciplineaire onderzoeken zullen de uitkomsten naast elkaar worden gelegd. Op basis van disciplineaire kenmerken zal integratie plaatsvinden om zo preventieve mogelijkheden te presenteren die microbiologisch onderbouwd en in de toekomst praktisch uitvoerbaar zijn. Dit is een zeer grote opgave. Het doel van dit interdisciplineaire onderzoek is dan ook met name het schetsen van een theoretisch kader waarin vervolgonderzoek vergemakkelijkt wordt.

## ***Inzichten vanuit de Geneeskunde***

Er zijn veel verschillende factoren die van invloed kunnen zijn op het wel of niet optreden van infectie van geplaatst osteosynthesemateriaal. Het doel is om vanuit de geneeskunde algemene uitspraken te doen over preventie van deze infecties. Verschillende perioperatieve factoren zullen worden onderzocht, en bij grote verschillen tussen lokalisatie van fracturen is steeds tibiaschachtletsel genomen. Fracturen van de onderste extremiteiten, in het bijzonder van de tibia, zijn namelijk erg vatbaar voor infecties (Dellinger *et al.*, 1988), waarschijnlijk vanwege de relatief matige vascularisatie (Abubaker & Rollert, 2001). Hierdoor is de verwachting dat verschillen eerder significant kunnen worden gemeten. Eventueel is extrapolatie naar lange pijpbeenderen, dan wel algemene osteosynthese mogelijk.

Over sommige invloeden is men het in de medische literatuur behoorlijk eens. Wanneer er onlangs grote systematische reviews zijn verschenen waarin een uitspraak kon worden gedaan, is dit overgenomen. Bij onderwerpen waar geen reviews van bekend zijn, is zo systematisch mogelijk literatuur gezocht naar het onderwerp, zijn resultaten geëxtraheerd en wordt aan de hand hiervan een uitspraak gedaan.

### **Profylactische antibiotica**

De belangrijkste, huidige preventieve middelen tegen infectie van osteosynthesemateriaal zijn antibiotica. Het geven van een profylactische dosis voorafgaand aan interne fixatie van gesloten fracturen bij lange beenderen wordt al sinds 1970 routinematig gehanteerd (Gillespie & Walenkamp, 2010). In een Cochrane review wordt het nut van deze maatregel onderzocht. Aan de hand van 23 geïnccludeerde trials werd een significant verschil gevonden in het aantal postoperatieve infecties tussen gekregen antibioticaprofylaxe of ontvangen placebo of geen profylaxe. De kans bij een preoperatieve dosis parenterale antibiotica voor het ontwikkelen van een diepe infectie was 0.35 ten opzichte van placebo of geen profylaxe. Het maakte daarbij niet uit of er een eenmalige dosis of meerdere doses werden gegeven, zolang vanaf de incisie tot en met het sluiten van de wond het antibioticum maar actief was (Gillespie & Walenkamp, 2010). Er werd geen significant verschil gevonden tussen multiële doses binnen 24 uur, vergeleken met een langere periode antibiotica. Ook een verschil tussen orale of parenterale toediening kon niet worden aangetoond.

De geïnccludeerde onderzoeken zijn verspreid over 27 jaar. In de eerste studies werd penicilline gebruikt als profylaxe, maar vanwege toenemende resistentie zijn tegenwoordig cephalosporines het middel van eerste keus, wat invloed kan hebben op de betrouwbaarheid van onderzoeksresultaten. Het uitvoeren van prospectieve studies naar andere antibiotica is lastig,



omdat de groepen zeer groot moeten zijn om significante verschillen te vinden. Echter, is het met toenemende resistentieontwikkeling wel van belang dat er andere antibiotica worden getest (Gillespie & Walenkamp, 2010).

Wat betreft open fractures is in een Cochrane Review van 2004 (in 2009 nog up-to-date verklaard) het gebruik van antibiotica werkzaam gebleken in het voorkomen van vroege infectie in 59% van de gevallen. Wat betreft verschillen in incidentie van chronische infectie, acute of chronische osteomyelitis, vertraagde unions of non-unions werden in verband met insufficiënte data geen significante resultaten gevonden. Ook kon met de huidige data niet worden gespecificeerd in uitspraken wat betreft effectiviteit bij verschillende fractuurgraad, duur van de kuur of dekking van Gram-negatieve bacteriën (Gosselin, Roberts, & Gillespie, 2004). Wel zijn er over deze factoren lagere niveaus van bewijs te vinden.

Daar blijkt de timing van de gegeven profylaxe van belang (Hauser, Adams, & Eachempati, 2006). Een korte kuur van eerste-generatie cephalosporines, zo snel mogelijk na het trauma, verlaagt de kans op infectie significant wanneer dit wordt gecombineerd met 'modern orthopedic fracture wound management' (Acello, Wallace, & Pachuda, 1995; Hauser *et al.*, 2006).

Er is blijvende onzekerheid over het nut van antibiotica tegen ook bacteriën (GNB). Bij gebruik van cephalothine werden in een onderzoek uit 1974 met name Gram-negatieve verwekkers gevonden, in de placebo groep zowel Gram-positieve, Gram-negatieve en clostridium spp. Op basis hiervan is extra Gram-negatieve dekking jarenlang aangeraden (Patzakis, Harvey, & Ivler, 1974). De studie van Ilinger 1988 toont in een studie met veel hoogenergetische tibiafracturen echter succesvol en significant aan dat antibiotica >24 uur of extra gericht tegen GNB niet superieur is boven een korte smalspectrumkuur. Tegenwoordig zijn de meeste resistente organismen stafylokokken en GNB. Juist therapie tegen deze verwekkers zou hun resistentie in de hand kunnen hebben gewerkt. De precieze effectiviteit is nog niet aangetoond (Hauser *et al.*, 2006).

Ook de duur van de profylactische antibiotische therapie is een punt van discussie. Opvallend is dat van een enkele dosis eerste-generatie cephalosporine als profylaxe bij gesloten fractures en ook in studies naar open fractures een langere duur niet is aangetoond, terwijl dit nadrukkelijk wel resistentie in de hand werkt (Hauser *et al.*, 2006). In open fractures raadt Jaeger *et al.* 24 uur profylactische antibiotica aan bij graad I en II uit de Gustilo-Andersonclassificatie (Gustilo & Anderson, 1976), maar 72 uur bij graad III (Jaeger, Maier, Kern, & Südkamp, 2006). Hauser *et al.* maakt ook onderscheid tussen type en duur, maar gaat uit van Level III bewijs (2006). Ongegronde chirurgische profylaxe en verlengde kuren zijn geassocieerd met een groter risico op nosocomiale infecties en morbiditeit door pneumonie met deze bacteriën (Velmahos *et al.*, 2002).

Kortom, profylactische antibiotica werkt bij preoperatieve start en volledige operatieve dekking bij gesloten fracturen en in algemene zin bij open fracturen. In de laatste groep kunnen veel specificaties in grote reviews geen significantie bereiken. Er zijn echter studies die in de balans tussen infectiepreventie en het beperken van resistentie adviseren tot een zo snel mogelijk gestartte, korte kuur gericht tegen Gram-positieve bacteriën bij open fracturen.

### **Tijdstip van débridement**

Wanneer een patiënt antibiotica heeft gekregen, volgt eventueel het operatieve débridement. Op basis van dierproefstudies is er een regel die stelt dat bij open fracturen infectiepreventie binnen zes uur, in de zogenoemde Friedreichse periode, moet worden gestart (Calhoun, 2014). Zo snel mogelijk behandelen lijkt aannemelijk, maar er zijn situaties denkbaar (i.e. in multitrauma of lange reistijden naar behandelcentra vanuit afgelegen gebieden) waarin débridement van de open fractuur wordt uitgesteld. Het kennen van de invloed van deze factor is daarom relevant. In Schenker *et al.* is een systematische review te vinden, die o.a. een Cochrane Review uit 2010 over dit onderwerp includeert, over de timing van débridement bij open fracturen van lange beenderen en daarna interne fixatie (2012). Er werd geen significant verschil gevonden in infectieaantallen tussen vroeg of laat débridement in alle subgroepen volgens Gustilo-Andersonclassificatie, diepte van de infectie of anatomische locatie (Schenker *et al.*, 2012).

Echter, zwaktes van deze studie zijn dat antibioticagebruik in vele geïncludeerde studies niet of onnauwkeurig staat vermeld, niet altijd duidelijk is hoe het débridement is uitgevoerd en verschillende studies bovendien vroeg- dan wel laat-débridement anders definiëren. Infectiefrequenties zijn dan ook erg uiteenlopend, tussen 4-63%. Ondanks correctie voor bovenstaande factoren blijft confounding aannemelijk (Schenker *et al.*, 2012).

De kracht van deze studie is het grote aantal open fracturen en subgroepanalyses. Ondanks een niet-significante uitkomst, mogen op basis van deze studie het gezond verstand en ervaring niet mogen worden verworpen (Calhoun, 2014). Vroegtijdig débridement kan ook betekenen dat midden in de nacht, op ongunstigere plaats met schaarse bezetting en middelen wordt behandeld, wat zijn eigen nadelige invloed kan hebben op infectie.

De zesuursregel kan niet worden bevestigd, maar vraagt om goed prospectief onderzoek. Hoe het echter mogelijk is om mensen vrijwillig later te opereren is onduidelijk. Bovendien zijn er al zoveel niet-significante data beschikbaar dat een dergelijke studie enorm groot moet zijn om in een review doorslaggevend te kunnen zijn (Calhoun, 2014). Er zijn oudere reviews (Crowley *et al.*, 2007 & Harley *et al.*, 2002) die studies beschrijven waarin de tijd tot débridement in positief verband staat met infectiekans. Zo wordt bij fixatie en débridement na vijf dagen hogere infectiekansen gezien

(Crowley *et al.*, 2007). Ook over geen van deze gedane studies kan significantie worden bereikt. De algemene opinie is dat de grondigheid van de uitvoering en antibioticagebruik van groter belang zijn dan exact tijdslimiet (Pollak AN, Jones AL, Castillo RC, Bosse MJ, 2010)

### **Laminaire luchtstromen**

Débridement wordt uitgevoerd in de operatiekamer (o.k.), waar ook preventiemogelijkheden liggen. Een voorbeeld is het gebruik van het *laminar airflow system* (LAF). Dit ventilatiesysteem is sinds de toepassing steeds onderwerp van debat geweest. Aangezien algemene verbetering rondom chirurgische ingrepen de infectieparameters in de afgelopen decennia toch al sterk hebben laten dalen, is het moeilijk meetbaar wat het systeem nu werkelijk bijdraagt (Chow & Yang, 2004). Gastmeier *et al.* hebben de effectiviteit onderzocht aan de hand van wondinfecties die zijn opgetreden in heup/knieprothesen gedurende tien jaar na de chirurgische procedure in een operatiekamer met LAF dan wel met een conventioneel systeem (2012). Vier cohortstudies werden geïnccludeerd waarvan er geen één significant voordeel ontdekte voor de operatiekamer met een LAF. Daarentegen werden er in twee studies juist hogere infectieratios waargenomen. Hun conclusie is dan ook dat LAF niet moet worden aangeschaft en misschien in huidige o.k.'s zelfs moet worden vervangen door conventionele ventilatiesystemen.

Een mogelijke oorzaak is af te leiden uit één van de studies, Salvati *et al.* Zij vinden een verlaging van het aantal infecties bij heupvervangings, maar een verhoging van het aantal infecties na knie vervanging, terwijl ratios bij een conventioneel systeem gelijk waren. Het personeel stond bij knieoperaties geregeld in de luchtstroom die nog over de wond moest gaan (1982). De opstelling lijkt dan ook van groot belang. Gastmeier *et al.* opereren additief nog een lagere temperatuur van het weefsel in de wond bij LAF(2012).

Er zijn geen studies gevonden die specifiek kijken naar infecties rond osteosynthesemateriaal. Aan het verschil in uitkomsten tussen knie en heup lijkt iedere locatie andere uitkomsten te hebben(Gastmeier *et al.*, 2012). Een mogelijke oplossing is het volgende:

In 2002 is een mobiel LAF screen beschreven die het aantal bacteriën in de lucht, de oppervlaktecontaminatie en de hoeveelheid stofdeeltjes in de lucht significant deed dalen tot waardes onder de norm, zelfs wanneer er geen steriele kleding werd gedragen. Er is geen onderzoek gedaan naar de verbonden infectiekans, maar door de luchtstromen met dit mobiele apparaat te kunnen richten, zou de effectiviteit wellicht verbeterd kunnen worden(Friberg *et al.*, 2002).

## Perioperatieve temperatuur

Ook de perioperatieve temperatuur van de patiënt heeft mogelijk invloed op het ontstaan van infectie. Hier zijn vele onderzoeken naar gedaan, hetzij niet specifiek bij osteosynthesepatiënten. Wel wordt in deze onderzoeken, betreffende buik- of gemengde chirurgie, vrijwel altijd gegeneraliseerd naar chirurgische procedures in het algemeen.

In Leaper werden orthopedische, algemene en urologisch chirurgische patiënten gerandomiseerd en werd de intraoperatieve huiddoorbloeding en zuurstofspanning gemeten als maat voor levensvatbaarheid van het weefsel. Bovendien werd, om drukplekken te voorkomen, intraoperatief een *bairhugger* gebruikt. Er werd geen statistische significantie bereikt in vergelijking met de controle groep, maar het verschil was wel een relatief risicoreductie van 46% van 10.4 naar 5.6% (Leaper, 2006). In een onderzoek naar lokale verwarming met behulp van een warmtestraler werd na zes weken wel een significant lager infectiekans gevonden bij de groep met lokale verwarming van 15% naar 4-6%. Bovendien hadden verwarmde patiënten minder antibiotica voorgeschreven gekregen in de tussenliggende weken (Melling *et al.*, 2001).

De zuurstofspanning neemt toe in hypothermisch weefsel en blijft verhoogd tot enkele uren na het verwijderen van de warmtebron (Kurz *et al.*, 1996 & Leaper, 2006). Hierdoor is de immuniteit verlaagd en verlopen chemotaxis, fagocytose en productie van antilichamen trager (Kurz *et al.*, 1996). Dit, terwijl de eerste uren na besmetting juist kritiek zijn in het wel of niet ontstaan van infectie (Kurz *et al.*, 1996 & Leaper, 2006). In een studie bij laparoscopisch behandelde patiënten is het afkappunt van 35 graden Celsius gevonden waaronder de kans op chirurgische wondinfectie sterk toeneemt, terwijl de duur onder dat niveau voor het aantal infecties niet lijkt uit te maken (Kurz *et al.*, 1996). Normotherm geopereerde patiënten kregen in de weken erna significant minder antibiotica toegediend (Melling *et al.*, 2001) en in Ellis *et al.* werd een significant lagere incidentie van MRSA-kolonisatie waargenomen (2003). Het verschil tussen lokale en systemische warmtetoediening was niet significant en niet betrouwbaar aangezien lokale verwarming langer werd uitgevoerd (Leaper, 2006).

Aan de hand van deze resultaten is het aan te raden patiënten met behulp van een *bairhugger* normotherm de operatie in te laten gaan en intraoperatief te blijven verwarmen (Forbes *et al.*, 2009). Daarnaast wordt aangeraden de temperatuur oesofageaal te controleren bij operaties langer dan 30 minuten (Esnaola & Cole, 2011) en intraveneus vloeistofwarmers te gebruiken bij operaties langer dan een uur (Forbes *et al.*, 2009).

## **Bloedleegte**

Een ander mogelijke perioperatieve factor van invloed op de infectie-incidentie van osteosynthesemateriaal is het opereren onder bloedleegte/bloedsperre. Bij gebruik van een tourniquet wordt de arteriële bloedvoorziening tijdelijk afgesloten, waardoor het zicht voor de chirurg beter is en deze sneller zal kunnen werken. De duur van een operatie staat in positief verband met infectiekansen (Neuman & Grzebieniak, 2014). Daar staat tegenover dat in bloedleegte het immuunsysteem ter plaatse wordt verstoord en contaminatie tijdens de operatie minder goed zou kunnen worden bestreden. Bovendien verzuurt het weefsel en kan het leiden tot ernstige beschadigingen, zoals necrose (Belien, 2000). In Saied *et al.* werden ongecompliceerde tibiafracturen door middel van interne platen gefixeerd, waarbij een deel van de patiënten wel en een ander deel geen tourniquet kreeg tijdens de operatie. In dit onderzoek van 138 patiënten en een follow-up van één jaar werden, ondanks een significant kortere operatieduur in de groep met tourniquet, geen significante verschillen gevonden in infectiefrequentie of non-union van de geosteosyntheseerde fracturen. Wel hadden patiënten geopereerd met tourniquet significant meer pijn in het jaar na de operatie, was er meer postoperatief bloedverlies (Saied & Zyaei, 2010) en werd er neurologische schade gerapporteerd (Odinsson & Finsen, 2006). In Maffuli *et al.* 1993 werd met een kleinere onderzoekspopulatie wel significant meer infectie gevonden bij het gebruik van een tourniquet (11/40) dan zonder (3/40) (1993). Al met al lijkt het opereren onder bloedleegte geen aangetoond voordeel te hebben, hoogstens een aantal nadelen.

Daarnaast is er nog opvallend veel literatuur over de aanwezigheid van de tourniquet zelf op de o.k. die de mate van infectie beïnvloedt. In meerdere studies is aangetoond dat tourniquets vaak niet steriel zijn (Thompson *et al.*, 2011). Thompson *et al.* onderzocht de mate van besmetting van tourniquets voorafgaand aan een chirurgische procedure en vond besmetting met onder andere staphylococcon zoals *S. Aureus*, bacteriën die infecties bij prothesemateriaal veroorzaakten in 68% van de 42 gevallen. Er werd vergeleken met preoperatieve screening van 23 steriele *disposable* tourniquets. Hierop werd geen besmetting aangetroffen. In een soortgelijk onderzoek bleek 99.2% van de 20 herbruikbare tourniquets besmet (Ahmed *et al.*, 2009 & Thompson *et al.*, 2011). Het feit, echter dat tourniquets besmet zijn, wil nog niet zeggen dat ze ook tot meer infecties leiden. Dit is tot nu toe niet verder onderzocht.

## **Externe en interne fixatie**

Primaire osteosynthese kan zowel extern als intern worden uitgevoerd. Ongeveer vijftig jaar geleden werd bij multitraumapatiënten geen vroege behandeling van fracturen van lange pijpbeenderen

uitgevoerd, vanuit de overtuiging dat zij de fysiologische reserves niet hadden om zo'n (verlengde) operatie te ondergaan (Gustilo & Anderson, 1976 & Hildebrand *et al.*, 2004). Vroege stabilisatie is echter belangrijk om de vorm van de ledenmaat te garanderen, en wekedelenletsel en grote standsafwijkingen te beperken (Court-Brown *et al.*, 1991). Vanaf de jaren '80 werden chirurgische protocollen voor 'early total care' (ETC) opgesteld en daarmee initiële interne fixatie toegepast op alle patiënten. Later, in de 1990's, werd duidelijk dat dit niet voordelig was voor alle subgroepen, zoals multitraumapatiënten (Hildebrand *et al.*, 2004 & Tuttle *et al.*, 2009) en werd 'damage control orthopaedics' (DCO) ingevoerd (Hildebrand *et al.*, 2004), initiële externe fixatie en daarna conversie naar definitieve interne fixatie. Dit is nog steeds de huidige gang van zaken (Della Rocca & Crist, 2006 & Pape *et al.*, 2002 & Tuttle *et al.*, 2009). Bij stabiele patiënten is ETC aangeraden, net als bij borderline patiënten die aan de hand van enkele criteria stabiel blijken. Instabiele patiënten en borderline patiënten die volgens criteria instabiel lijken, krijgen in eerste instantie een externe fixateur net als in-extremis patiënten soms zelfs al op de intensive care. Ondanks dat een externe fixateur een hogere kans op infectie en meestal noodzaak tot heroperatie geeft (Webb *et al.*, 2007), is bij deze instabiele patiënten het initieel doorbreken van de 'dodelijke triade' (hypocoagulopathie, acidose en hypothermie) en beperken van weefselschade van groter belang (Giannoudis *et al.*, 2009 & Pape *et al.*, 2002).

Wanneer echter de beste timing is om een externe fixateur te verwisselen voor de definitieve interne fixatie is onduidelijk. Volgens een studie van Nanchahal *et al.* is vroege conversie bij open onderbeenfracturen aangeraden (2009). Wat betreft instabiele patiënten was er een grotere kans op multiorgaanfalen en ontstekingsparameters bij conversie op dag 2-4 dan op dag 6-8 (Pape *et al.*, 2002). Een studie van Della Rocca en Crist wees uit dat de infectiekans stijgt wanneer langer dan twee weken wordt gewacht (2006). Geconcludeerd kan worden dat conversie is aan te raden met een optimaal window tussen zes dagen en twee weken na initiële externe fixatie.

### **Pen vs. Plaat**

Dan is er nog de materiaalkeuze bij interne fixatie, grofweg opgedeeld in pennen en platen. Pennen worden vaak meer geassocieerd met pijn, platen vaker met infectie.

Bij plaatfixatie moeten meer weke delen worden verwijderd om botoppervlak te hebben waarop kan worden gefixeerd. Dit zou vaker tot infecties leiden. Uit onderzoek blijkt echter, hetzij niet significant, voordeel voor de plaatpatiënten. Dit is wellicht gebiased door meer open fracturen in de pen-patiëntengroep (Zelle *et al.*, 2006). Bhandari *et al.* toonde juist aan dat plaatfixatie vaker tot infectie leidt dan intramedullaire penfixatie (2003).

In 104 tibiafracturen die ofwel met plaat of wel met pen werden behandeld, werden de infectiekansen vergeleken en is geen significant verschil gevonden (Fang *et al.*, 2012 & Vallier *et al.*, 2011). Li *et al.* vergelijken minimaal invasieve plaatfixatie met intramedullaire penfixatie en concludeert dat er geen significante verschillen zijn in diepe infectie, zolang per fractuur wordt gekeken naar de snelst en minst invasieve manier (2014 & Nanchahal *et al.*, 2009). Dit wijst vooral op een chirurgisch oog. Ook zijn het type fractuur en specifiek aanwezige patiëntkarakteristieken als roken en diabetes mellitus bepalend (Vallier *et al.*, 2011).

Onder de pennen heeft een gegleufde pen mechanische voordelen boven een volledig ronde pen. De gegleufde pen heeft een groter contactoppervlak en zorgt zo voor een betere stabiliteit en functionaliteit van het bot. Echter, ontstaat er ook meer dode ruimte rond de implantaat. In dode ruimte kan het afweersysteem van het lichaam moeilijk komen waardoor bacteriën zich hier makkelijker kunnen onderhouden. Er waren bij gegleufde pennen significant minder bacteriën nodig om infectie te induceren. Bij een volledig ronde pin ontstaat geen onnodige dode ruimte (Schlegel & Perren, 2006).

Eenzelfde afweging kent het wel of niet uitboren van het merg voor penplaatsing. De botgenezing is na boren beter, maar er ontstaat meer vasculaire schade wat weer nadelig is in infectiepreventie. Wanneer de afweging moet worden gemaakt tussen verminderde botgenezing met kans op non-union of een diepe infectie, zouden gegleufde pennen en vooraf boren worden afgeraden. In een Cochrane Review van 2012 blijkt er echter geen significant verschil te zijn in bijbehorende diepe infectiekansen (Duan *et al.*, 2012).

Wat betreft platen is de theorie dat deze drukken op het bot, de lokale bloedtoevoer verminderen waardoor de kwaliteit van het bot vermindert en er laagdrempeliger infectie optreedt. Platen zoals de Locking Compression Plates (LCP) die minimaal contact met het bot hebben, tonen zo een lagere incidentie van infectie dan Dynamic Compression Plates (Schlegel & Perren, 2006).

Het blijkt lastig doorslaggevend voordeel toe te kennen aan het materiaal. In veel onderzoeken was het chirurgisch oog het diagnostisch middel en dat is moeilijk te objectiveren. Verder zou er theoretisch voordeel zijn voor de ronde pen, zonder voorboren, maar dit is niet overtuigend aangetoond.

### **Wond sluiten**

Na osteosynthese wordt het openlaten van de wond bij een open fractuur tot enkele dagen na débridement en fixatie nog steeds door chirurgen aangeraden. Het idee hierachter is dat infectieus materiaal de kans krijgt te draineren en bovendien eventueel secundair débridement minder invasief

is (Okike, 2006). Met huidige verbeteringen in stabilisatieprocedure, antibiotica en wondbehandeling staat het nut hiervan echter in twijfel. Onmiddellijke wondbedekking geeft betere weke delenbedekking van de fractuur en bemoeilijkt nosocomiale besmetting. Het zijn voornamelijk nosocomiale bacteriën die infectie veroorzaken, en niet per se de pathogenen die in een open wond zitten (Okike, 2006). Bij een onderzoek bij 349 Gustilo-Anderson graad I t/m IIIA fracturen waar door middel van matched-pairs het optreden van diepe infectie tussen vroeg of vertraagd gesloten wonden na chirurgisch débridement werd vergeleken, werden significant minder infecties gevonden bij vroege sluiting van de wond. Er is met een 'propensity-score' voor bekende factoren gecorrigeerd, maar dit zal niet volledig dekkend zijn voor alle intuïtieve afwegingen die zijn gemaakt, gezien het retrospectieve karakter (Jenkinson *et al.*, 2014).

Dat primair sluiten in ieder geval geen verhoogde infectie geeft is aangetoond in andere studies (Benson *et al.*, 1983 & DeLong *et al.*, 1999). Gustilo en Anderson raadden echter aan om graad III open fracturen niet primair te sluiten. Wanneer een open wond duidelijk besmet was met straatvuil of necrotisch weefsel bevat, of wanneer in het geval van multitrauma er onvoldoende aandacht is voor het primaire débridement, is sluiten niet aan te raden (Okike, 2006).

Concluderend lijkt primair sluiten bij goed geruimde wonden voordelig. Er is echter geen diagnostisch middel dat aangeeft wanneer een wond schoon genoeg is. De meest gecontamineerde wonden worden opengelaten en hierdoor is er in alle niet-gerandomiseerde studies een selectie bias en is specifieke toepassing in de toekomst lastig. Verder bewijs zal uit prospectief onderzoek moeten voortkomen.

### **Wondbedekking**

Wanneer implantaten bij interne fixatie niet goed met weke delen kunnen worden bedekt, is tijdelijke sluiting met behulp van een spierlap een oplossing. De toegenomen vascularisatie en daardoor verbeterde fractuurheling zorgen voor een minimum aan bacteriële groei (Webb *et al.*, 2007). Interne fixatie mag in het kader van diepe infectie zelfs alleen maar worden gedaan als het materiaal kan worden bedekt (Nanchahal *et al.*, 2009). Ook hier lijkt de timing kritiek (Nayagam, 2007). In verschillende bronnen lijkt vroege toedekking met een spierlap niet safe, terwijl in andere de tijd totdat een vrij lap wordt gebruikt in positief verband staat met het risico op diepe infectie (Rohde *et al.*, 2007). In Gopal *et al.* werd gevonden dat wanneer gezonde weke delen kunnen worden gebruikt, het veilig is. In patiënten waar de wond pas na 72 werd gedicht, waren er significant meer infecties (2000). Kortom, hoe beter de kwaliteit van de bedekking, des veiliger is vroege toedekking.



## Biofilms

Na plaatsing van osteosynthesemateriaal zijn er wondspecifieke factoren die infectiekans bepalen. Bij toenemende resistentie neemt het voordeel van deze profylactische antibiotische therapie af. Een eigenschap die resistentie tot 1000x meer in de hand werkt is de productie van biofilms rond implantaten (Olson *et al.*, 2002). Een biofilm is een door micro-organismen gevormd laagje, gehecht aan de implantaat en bestaat uit deze organismen en extracellulaire polymere substantie, door hen zelf geproduceerd (Costerton *et al.*, 2005). 65% van de infecties is verbonden aan proliferatie via een biofilm (Lewis, 2007). Mogelijke preventieve oplossingen zijn het bestrijden van deze biofilms. Er worden antiseptisch en antibiotisch gecoate implantaten toegepast (Källicke *et al.*, 2006). *In vitro* wordt op dit moment veel onderzoek gedaan. Hieronder staan enkele voorbeelden van selectieve oppervlakken.

Hydrofiliëteit van de implantaat zorgt voor bedekking met watermoleculen die hechting van eiwitten of cellen zoals bacteriën bemoeilijken. Bovendien zou hechting van lichaamseigen cellen in de strijd om oppervlak infectiekans verlagen (Maddikeri *et al.*, 2007).

Een implantaat met de RGD (arginine-glycine-aspartic acid)ligand toonde een reductie van 98% voor *S. aureus* en *S. epidermidis* bij een *in vitro* test. Dit suggereert dat het mogelijk moet zijn om selectieve oppervlakken te maken (Maddikeri *et al.*, 2007).

F<sup>+</sup>-geïmplanteerde oppervlaktes hadden sterke reductie in bacteriegroei en stimuleerden bovendien gastheercelhechting en groei (Yoshinari *et al.*, 2000). Dit concept is afkomstig uit de kaakchirurgie, maar is getest op veel verschillende pathogenen. Ook kunnen antimicrobiële stoffen of antibacterieel adhesieve agentia worden ingelijfd in nanogestructureerde oppervlakten (Bumgardner *et al.*, 2011).

Bioresponsieve strategieën zijn medicatiesystemen die antimicrobiële medicatie uit implantaten enkel vrijgeven wanneer er bacteriële infectie present is. Dit zou resistentie voorkomen. Het idee is dat eiwitten het antibioticum bedekken en door proteïnasen in bacteriën worden afgebroken bij infectie en dan het antibioticum vrijgeven (Bumgardner *et al.*, 2011).

Dierproeven naar vaccinatie tegen biofilmformatie, met oppervlakte-eiwitten van *S. epidermidis*, toonde significant verminderde biofilmformatie in muizen (Shahrooei *et al.*, 2012).

Ook *quorum sensing inhibitors* zijn veelbelovend. *Quorum sensing* is het mechanisme dat beschrijft hoe bacteriën in een biofilm communiceren en resistentie overgeven. *Quorum sensing inhibitors* voeren competitie in dit systeem. Zij zijn geen stressfactor in de bacterie, waardoor resistentie minder snel verloopt en kan ook een oplossing naast antibiotica zijn (Zeng *et al.* 2008). Een grote review op dit gebied geeft de huidige staat van ontwikkeling (Kalia, 2013). Het voorkomen van biofilms door het coaten van implantaten is een veelbelovende techniek voor de toekomst ter preventie van infectie van osteosynthesemateriaal.

## **Conclusie**

Samenvattend kan worden gezegd dat vele factoren van elkaar afhankelijk zijn. Zo lijkt tijdig débridement zinvol, maar het effect valt in het niet vergeleken met de grondigheid ervan en het antibioticagebruik. Profylactische antibiotica bij gesloten fracturen, dan wel zo snel mogelijk gestart bij open fracturen werkt. In het licht van resistentie en de factoren die daarop van invloed zijn, zijn doorslaggevende onderzoeken naar de perfecte combinatie moeilijk. Bovendien komt resistentie in de VS veel meer voor dan in Nederland. Resultaten uit Amerikaanse studies kunnen daarom niet zonder meer worden toegepast in Nederland.

De patiënt dient normotherm te worden geholpen in een operatiekamer met een conventioneel ventilatiesysteem of mobiel LAF screen. Wat betreft de wijze van fixatie, lijkt ongeboorde interne fixatie met een ronde intramedullaire pen de meest voordelige manier bij midschaftfracturen van de tibia. Enkel bij hemodynamisch instabiele patiënten wordt initiële externe fixatie aangeraden, met vervolgens conversie naar interne fixatie tussen 6 dagen en twee weken. Een grote factor hierin lijkt de staat van de weke delen. Hierop aansluitend wordt opereren in bloedleegte nadelig, ondanks de positieve invloed van een verkorte operatieduur. Primair sluiten lijkt voordelig, maar is gedaan bij wonden die zich daarvoor leken te lenen. Er is een factor, het klinisch oog, die sterk bepalend kan zijn in deze uitkomsten. Grote mogelijkheden lijken te liggen in het coaten van materialen. Door het voorkomen van biofilms lijkt resistentie verminderd op te treden. De verschillende manieren om de vorming te voorkomen, worden nog onderzocht, maar zijn veelbelovend.

## Inzichten vanuit de Microbiologie

Bij infecties die optreden bij het plaatsen van botgerelateerde implantaten, spelen diverse factoren een rol. Het doel is om vanuit de microbiologie onderzoek te doen naar preventiemogelijkheden van dergelijke infecties. In de literatuur is gekeken naar een nosocomiale infectie, de Prosthetic Joint Infection (PJI). Dit is een infectie die kan optreden bij de vervanging van gewrichtsmateriaal door prothesemateriaal. Daarnaast is bij grote diversiteit aan infectieveroorzakers gekeken naar de Gram-positieve bacteriën *Staphylococcus aureus* en de coagulase-negatieve *Staphylococcus epidermidis*. Samen vormen zij de meest voorkomende infectieveroorzakers bij PJI, wat hen een interessante groep maakt om te bestuderen (Peel *et al.*, 2012). De Gram-negatieve bacteriën vormen een veel kleinere groep PJI veroorzakers en zullen om die reden buiten beschouwing worden gelaten.

### Ziekteverwekkers van Prosthetic Joint Infection

Hoewel *S. aureus* en *S. epidermidis* huidflora bacteriën zijn en in hun gebruikelijke omgeving onschadelijk zijn voor de mens, zijn deze infectieus wanneer ze terechtkomen op andere plaatsen in het lichaam, zoals in open wonden (Otto *et al.*, 2014). In een reviewstudie van Peel *et al.* (2012) is literatuuronderzoek gedaan naar de meest voorkomende bacteriën bij PJI uit ziekenhuizen in diverse landen, zoals het Verenigd Koninkrijk, Australië en de Verenigde Staten, die over drie jaar tijd kniegewricht- en heupgewricht-vervangingen uitvoerden. *Staphylococcus aureus* blijkt hieruit de meest voorkomende PJI bacterie met 26% van de isolaten (tabel 1) samen met de coagulase-negatieve bacteriën (24%) (Peel *et al.*, 2012). Ongeveer de helft van de *S. aureus* isolaten was methicilline resistent (MRSA).

**Tabel 1:** Resultaten uit een microbiologische literatuurstudie naar meest voorkomende veroorzakers van Prosthetic Joint Infection (Peel *et al.*, 2012).

Reference	11	20	2	3	24	30	21	29	27	Current study	Total
Publication yr	1977	1989	1991	1998	2000	2000	2007	2008	2008	2012	
Country	USA	USA	Sweden	USA	UK	USA	UK	Australia	USA	Australia	
No. of isolates	42	81	357	462	81	578	112	248	63	163	2,187
No. (%) of coagulase-negative staphylococcal isolates	8 (24)	37 (46)	59 (17)	86 (19)	39 (48)	172 (30)	15 (13)	78 (31)	13 (21)	18 (11)	525 (24)
No. (%) of <i>Staphylococcus aureus</i> isolates	10 (19)	19 (23)	149 (42)	101 (22)	11 (14)	135 (23)	26 (23)	53 (21)	23 (38)	47 (29)	574 (26)
No. (%) of streptococcus species isolates	5 (12)	12 (15)	17 (6)	42 (9)	8 (10)	51 (9)	6 (5)	17 (7)	8 (13)	2 (1)	168 (8)
No. (%) of enterococcus species isolates	4 (10)	7 (9)	10 (3)	6 (1)	6 (7)	16 (3)	3 (3)	15 (6)	0 (0)	1 (0.6)	68 (3)
No. (%) of diptheroid isolates	0 (0)	6 (7)	5 (1)	3 (0.6)	3 (4)	3 (0.5)	2 (2)	11 (4)	1 (2)	1 (0.6)	35 (2)
No. (%) of Gram-negative bacillus isolates	12 (29)	18 (22)	19 (5)	38 (8)	2 (2)	33 (6)	7 (6)	58 (23)	7 (11)	23 (14)	217 (10)
No. (%) of propionibacterium species isolates	1 (2)	1 (1)	1 (0.3)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	6 (0.3)
No. (%) of polymicrobial isolates	11 (26)	0 (0)	55 (15)	88 (19)	10 (12)	71 (12)	53 (33)	0 (0)	4 (6)	59 (36)	351 (16)
No. (%) of anaerobe isolates	1 (2)	7 (9)	8 (2)	6 (1)	0 (0)	23 (4)	3 (3)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	52 (2)
No. (%) of isolates of other infectious species	19 (19)	3 (4)	1 (0.3)	7 (2)	0 (0)	10 (2)	1 (1)	8 (3)	0 (0)	1 (0.6)	50 (2)
No. (%) of culture negative isolates	2 (2)	2 (2)	29 (8)	5 (1)	0 (0)	64 (11)	7 (5)	0 (0)	6 (10)	12 (7)	127 (6)

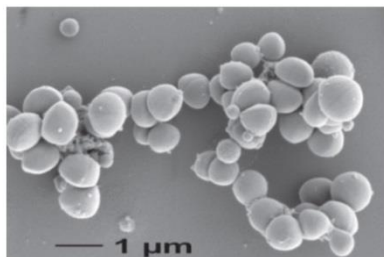
### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* (figuur 1) is een Gram-positieve huidcommensaal en heeft daarmee voordeel van de huid zonder dat de mens daar voor- of nadeel van heeft. Naast de huid zijn ook de slijmmembranen, zoals in de neus, een leefomgeving voor *S. aureus*. Deze bacterie is onder te verdelen in methicilline-sensitieve *S. aureus* (MSSA) en methicilline-resistente *S. aureus* (MRSA). De laatste vormt een probleem, vanwege resistentie tegen het antibioticum methicilline (Peel *et al.*, 2012). De bacterie wordt getypeerd door de productie van coagulase, een enzym dat voor bloedstolling zorgt. *S. aureus* heeft ook biofilm vormende capaciteiten, wat betekent dat het de neiging heeft om een samenballing van microbiële cellen gehecht aan een oppervlak te vormen. Deze biofilms bestaan voornamelijk uit een monolaag van bacteriën van dezelfde soort.

De virulentiefactoren in *S. aureus* bepalen de pathogenese van de bacterie en deze worden gereguleerd door cel-cel signaleringssystemen (quorum-sensing). Deze upreguleert synthese van exoproteïnen en downreguleert de celoppervlakte eiwitten.

### ***Staphylococcus epidermidis***

*Staphylococcus epidermidis* leeft voornamelijk op de huid van de mens. De biofilms die gevormd worden door *S. epidermidis* bestaan uit meerdere lagen. Essentiële factoren voor het vormen van biofilms zijn polysaccharide intercellulair adhesine (PIA), accumulatie-geassocieerd eiwit (Aap) en het



**Figuur 1:** *Staphylococcus aureus*. Figuur van scannende elektronenmicroscopie van de bacterie, gefixeerd (Sibbald *et al.*, 2006).

biofilm-geassocieerd eiwit (Bap) (Sibbald *et al.*, 2006). De extracellulaire toxines die in *S. aureus* aanwezig zijn, zijn niet aanwezig in *S. epidermidis* met uitzondering van het delta-toxine (zie onder). Dit is te wijten aan het feit dat de toxines door pathogeniciteitseilanden gecodeerd worden, welke zich in het genoom van de *S. aureus* stammen bevinden. Dergelijke eilanden zijn niet aanwezig in het genoom van *S. epidermidis* (Sibbald *et al.*, 2006).

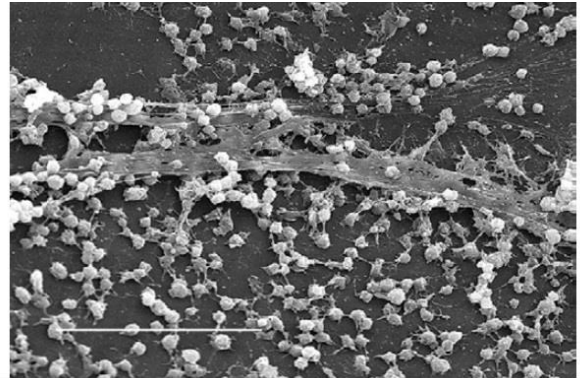
Een quorum-sensing regulatiesysteem werkt via het accessory gene regulator (*agr*) systeem, waarvan het *agr* locus in *S. aureus* bestaat uit vier *agr* genen (*agrA*, *agrB*, *agrC* en *agrD*). Dit is ook gevonden in *S. epidermidis*. De volgorde van genen en sequenties zijn sterk gelijkend, maar *S. epidermidis* heeft slechts drie *agr* genen. *Agr* in *S. epidermidis* reguleert voor een groot deel de chromosomale genen die betrokken zijn bij celdeling, virulentie en metabole aanpassingen (Hellmark *et al.*, 2013).

Zoals genoemd is een van de weinige toxines geproduceerd door *S. epidermidis* het delta-toxine (PSM- $\gamma$ ) dat wordt gecodeerd door het *hld* gen. Het eiwit is betrokken bij processen, zoals het

zelfbehoud-mechanisme door andere bacteriële soorten aan te vallen die competieren voor dezelfde ruimte op de menselijke huid (Hellmark *et al.*, 2013).

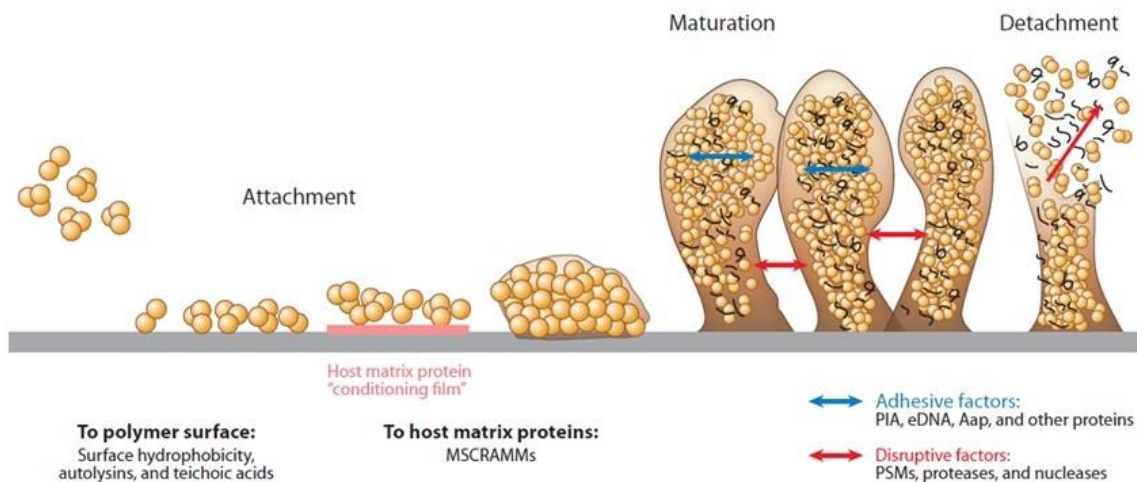
## Biofilms

Beide bacteriën kunnen biofilms vormen op medische instrumenten (figuur 2). Een definitie voor biofilms kan gegeven worden als een samenstelling van microbiële cellen, die irreversibel aan een oppervlak gehecht zijn en ingesloten zitten in een netwerk van polysacchariden en andere macromoleculen (Donlan, 2002 & Otto, 2013). De met een biofilm geassocieerde cellen kunnen verschillen van hun vrij levende ofwel planktonische tegenhangers, als er gekeken wordt naar verschillen in genexpressie. Biofilms vormen zich op een wijde variëteit aan oppervlakken, zoals levend weefsel, medische instrumenten (implantaten) of pijpen van een watersysteem.



**Figuur 2:** Biofilm op medisch instrument. Enkele bacteriesoort, *Staphylococcus aureus*, op het binnenste oppervlak van medisch instrument, gehecht aan de extracellulaire polymere substantie matrix (Donlan, 2002).

Het vormen van biofilms kan worden opgedeeld in drie processen, waarbij specifieke moleculaire factoren betrokken zijn: (1) aanhechting, (2) maturatie en (3) loslaten van de biofilm (figuur 3). Voor de profylaxe van infectieziekten zijn aanhechting en maturatie de belangrijkste stappen om interventies op te richten. Aanhechting aan abiotische oppervlakken, zoals medische instrumenten, heeft te maken met fysiochemische eigenschappen van het medisch instrument en het oppervlak van de bacterie. Dit betreft hydrofobe of elektrostatische interacties met het substraat (Otto, 2013), waarbij het hydrolyserende enzym autolysine en componenten van de bacteriële celwand (teichoïnezuren) een rol spelen.



**Figuur 3:** De fases van biofilmvorming. Te zien zijn initiële aanhechting, maturatie en uiteindelijk onthechting (het loslaten van de bacteriën van de biofilm). Aanhechting vindt plaats direct op een oppervlak, zoals een medisch instrument, of aan een geconditioneerde laag, die gevormd wordt door gastheer matrix moleculen. Afhankelijk van adhesiemoleculen vervolgt de biofilm maturatie via aaneenklontering van cellen. Daarna vormen de karakteristieke kanalen in de biofilm structuur, die afhankelijk zijn van versturende factoren. Deze zijn uiteindelijk ook verantwoordelijk voor de laatste fase: de onthechting. Toelichting van de betrokken moleculen: Aap is het accumulatie-geassocieerde eiwit, eDNA is extracellulair DNA, MSCRAMMs zijn de *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*, PIA is het polysaccharide intercellulaire adhesine en PSMs zijn fenol-oplosbare modulines (Otto, 2013).

Er kan echter een onderscheid worden gemaakt tussen aanhechting aan abiotisch materiaal en aanhechting aan menselijk weefsel (biotisch). Aanhechting aan menselijk weefsel is veel meer specifiek en komt anders tot stand. Medische instrumenten zoals protheses, raken na plaatsing in het lichaam bedekt met gastheer matrixeiwitten, wat een conditioneringslaag genoemd wordt. De eiwitten die aan het bacteriële oppervlak zijn geankerd (*surface-anchored proteins*), kunnen aan de gastheer matrixeiwitten binden. De zogenaamde *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs) zijn een belangrijke groep van oppervlakte-eiwitten, die betrokken zijn bij de hechting aan gastheereiwitten (Otto, 2013). Direct na de plaatsing van een implantaat raakt deze 'geconditioneerd' met gastheereiwitten, zoals fibrinogeen, fibronectine of vitronectine. Voor *S. epidermidis* geldt dat deze zich makkelijker hecht aan niet-geconditioneerde oppervlakken van medische instrumenten, die meer hydrofoob van aard zijn en daardoor beter interactie aangaan met de hydrofobe cellen (Rohde *et al.*, 2010). Tocht heeft *S. epidermidis* vitronectine bindende eigenschappen via het autolysine eiwit Aae en heeft het fibrinogeen bindende activiteit via het eiwit Fbe. Het ECM bindend eiwit (Emb) heeft samen met de teichoïnezuren fibronectine bindende activiteit, terwijl in *S. aureus* het fibronectine-bindend eiwit (FnBPA) deze rol vervult. Ook het polysaccharide intercellulaire adhesine (PIA) van *S. aureus* heeft de rol van aanhechting in biofilms op zich, maar het accumulatie-geassocieerd eiwit (Aap) kan deze functie vervangen. PIA wordt ook door

*S. epidermidis* geproduceerd en is chemisch en biologisch sterkt gelijkend op die van *S. aureus* (Rohde *et al.*, 2010).

Aanhechting van de bacteriën aan een oppervlak heeft echter met meerdere factoren te maken. Het raakvlak tussen een vloeibare en een vaste substantie is een ideale plaats voor aanhechting. Hoe ruwer en hydrofober het oppervlak, des te beter hecht de bacterie. Ook het grensgebied tussen het oppervlak en de vloeistof speelt een rol bij aanhechting. De dikte van de grenslaag hangt af van de lineaire stroomsnelheid van de vloeistof, waarbij de laag dunner wordt naarmate de snelheid toeneemt. Hoe dunner de laag, des te sneller zullen cellen aan het oppervlak binden. Ook de pH, aanwezige nutriënten en temperatuur van de omgeving van de bacterie spelen een rol (Donlan, 2002).

De eigenschappen van de cellen zelf spelen ook een rol bij de aanhechting, zoals hydrofobiciteit van het celoppervlak, de aanwezigheid van fimbriae en flagella en productie van extracellulaire polymere substantie (EPS). Hoe minder polair de eigenschappen van de cellen of het oppervlak, des te groter de hydrofobe interacties en daarmee des te sterker de aanhechting (Donlan, 2002).

Biofilms bestaan vooral uit microbiële cellen en EPS matrix, welke het primaire raamnetwerk vormen van de biofilms. EPS matrix bestaat voornamelijk uit polysacchariden en kan veel water opnemen, waardoor het vaak zowel hydrofiel als hydrofoob is. De componenten afzonderlijk hebben echter wel enkel één eigenschap. De matrix draagt ook bij aan de antimicrobiële resistentie eigenschappen van de biofilms, mogelijk door direct aan antibiotische agenten te binden en zo het transport van antibiotica door de biofilms heen te verhinderen.

In biofilms zijn de microkoloniën van bacteriële cellen heterogeen verspreid en daardoor duidelijk gescheiden van elkaar. Een bacteriële microkolonie is een kleine, lokale kolonie van meerdere bacteriën. Op implantaten zijn biofilms van een enkele bacteriesoort veelvoorkomend, zoals het geval is bij de hier bestudeerde PJ's. Hierbij is er maar één bacteriesoort verantwoordelijk voor de biofilm en kan zo een monocultuur genoemd worden. Biofilms met monoculturen zijn over het algemeen dunner dan de dikkere biofilms met verschillende soorten bacteriën (Donlan, 2002).

### **Conjugatie en Resistentie**

Een biofilm biedt de ideale omgeving voor overdracht van genetisch materiaal in de vorm van extrachromosomale DNA strengen (plasmiden) door middel van conjugatie. In een biofilm is er minimale schuifspanning en vergroot cel-cel contact, waardoor conjugatie sneller dan in planktonisch levende bacteriën kan plaatsvinden. Plasmiden kunnen coderen voor resistentie tegen antimicrobiële



agenten (zie onder), waardoor biofilm formatie een tweede resistentievoordeel biedt voor de aanwezige bacteriën. Dit vergroot de overlevingskans van de organismen (Donlan *et al.*, 2002).

### **Up- en Downregulatie van genen**

In biofilms is de genexpressie van bacteriën anders dan wanneer ze planktonisch leven.

Geupreguleerde genen in *S. aureus* hebben betrekking op de glycolyse of het fermentatieproces voor energiewinning van de cel, zoals de genen die coderen voor fosfoglyceraat mutase, triosefosfaat isomerase en alcohol dehydrogenase (Becker *et al.*, 2001). De oorzaak hiervan ligt hoogst waarschijnlijk in het feit dat in biofilms een zuurstoftekort heerst en er moet dan van minder zuurstof net zo veel energie gemaakt worden. Ook quorum-sensing speelt hierbij een rol, waarmee cellen onderling de aanhechting aan en loslating van de biofilm bevorderen. De signalen kunnen bepaalde concentraties bereiken, die nodig zijn voor de activatie van bepaalde genen betrokken bij biofilm differentiatie. Quorum-sensing kan ook de transformatie van bacteriën, waarbij de opname en incorporatie van extern DNA plaatsvindt, beïnvloeden (Donlan, 2002). In een biofilm is er upregulatie van threonyl-tRNA synthetase, dat betrokken is bij eiwitsynthese (Becker *et al.*, 2001). Ook is er upregulatie van de *clpC* homologo coderend voor het stress-eiwit ClpC-ATPase. Dit eiwit is verantwoordelijk voor de afbraak van slecht gevouwen eiwitten, wat belangrijk is voor stress-adaptatie en overleving (Chatterjee *et al.*, 2010).

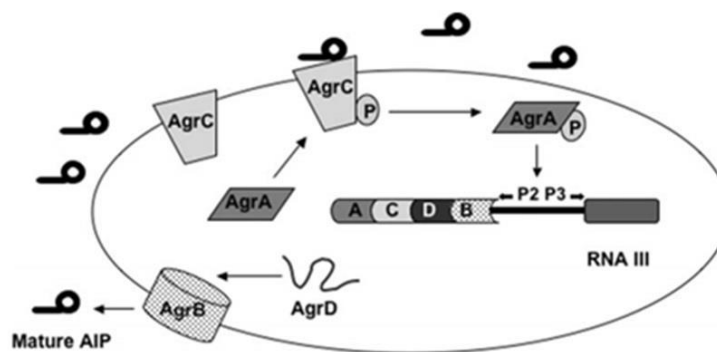
De biofilms die door de PJI verwekkers worden gevormd, leveren veel voordeel op voor de verwekkers. Ook signaleren de bacteriën die in biofilms leven, onderling naar elkaar, wat ten goede komt voor hun overleving in een infectie.

### **Quorum-Sensing**

De virulentie en groei van *S. aureus* zijn voor een groot deel afhankelijk van quorum-sensing (Pollitt *et al.*, 2014). Dit mechanisme reguleert genexpressie op een cel-dichtheid afhankelijke manier. Het quorum-sensing mechanisme in staphylococceen functioneert zoals eerder gezegd via het *agr*-locus in het genoom. Het upreguleert expressie van toxines en degradatieve enzymen, zoals proteases, en downreguleert vele oppervlakte adhesiemoleculen tot aan de stationaire groeifase (Otto, 2013). Het *agr*-locus bevat twee promotors (P2 en P3), die twee transcripten produceren: RNAII en RNAPIII (figuur 4). Het RNAII transcript bevat vier genen (in *S. aureus*) voor de biosynthese van autoinducerende peptiden (AIPs) en het *agr*-signaaltransductie systeem genaamd *agrA-D* (George & Muir, 2007). De cellen produceren AIPs en als deze ophopen, produceert de cel daarnaast een aantal



virulentiefactoren, zoals hemolysine  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  en  $\gamma$ , toxische schok syndroom toxine (TSST), enterotoxines, Pantan-Valentine leukocidine (PVL) en exfoliatines A en B (Pollitt *et al.*, 2014). Voordat een AIP gesecreteerd kan worden, dient er eerst een AgrD propeptide gevormd te worden. Het integrale membraanewit AgrA is bij dit proces betrokken (George & Muir, 2007). Als AIP een bepaalde concentratie heeft bereikt, bindt het aan AgrC, een transmembraan, receptor histidine-kinase. AgrC activeert AgrA, een respons regulatie eiwit, welke aan zowel de promotor van het Agr operon (P2), als aan de promotor van RNAIII (P3), de intracellulaire effector van het systeem, bindt (Otto, 2013). Door deze positieve terugkoppeling komen virulentiefactoren vrij.



Figuur 4: Schematisch overzicht van het *agr* signaleringscircuit. Als gematureerd AIP gesecreteerd wordt, bindt het aan AgrC in de membraan, welke AgrA door fosforylering activeert. AgrA bindt op beide promotors (P2 en P3) en transcriptie van virulentiefactoren vindt dan plaats (Otto, 2013).

Quorum-sensing is een coöperatieve sociale eigenschap in infecties met *S. aureus*, waarvan de hele celpopulatie profijt heeft. Uit onderzoek blijkt dat *Agr* mutanten, die geen quorum-sensing mechanisme hebben, minder kans hebben om te overleven in een celpopulatie, zoals in PJI, naar mate ze relatief meer voorkomen ten opzichte van het wild-type. In een dergelijke gecombineerde celpopulatie blijkt de virulentie van zowel de *agr* mutanten, als de wild-type bacteriën door de aanwezigheid van de *agr* mutanten af te nemen (Pollitt *et al.*, 2014).

Het *agr* systeem van *S. epidermidis* verschaft resistentie tegen antimicrobiële peptiden, die door polymorfonucleaire leukocyten van de gastheer geproduceerd worden. Het verschaft de populatie ook bescherming tegen reactieve zuurstofsoorten (ROS). Quorum-sensing biedt zo de organismen bescherming tegen antimicrobiële mechanismen van de gastheer (Yao *et al.*, 2006).

### Pathogenese en Virulentiefactoren

De pathogenese van *S. aureus* in PJI en andere infecties wordt veroorzaakt door de expressie van een breed scala aan verschillende virulentiefactoren. In dit artikel ligt de focus op de celoppervlak

eiwitten, omdat deze als eerst in contact zullen komen met het immuunsysteem en prominent zijn in het veroorzaken van infecties, zoals PJI. Dit is een hele studie op zich en daarom worden andere eiwitten buiten beschouwing gelaten.

De virulentiefactoren kunnen worden gehecht aan het celoppervlak van *S. aureus*, maar ook worden gesecreteerd naar het interne milieu van de gastheer. De functies van de virulentiefactoren zijn (a) adhesie en induceren van kolonisering van de gastheer, (b) induceren van bacteriële verspreiding in weefsels, (c) inhiberen van opname door fagocytose, (d) biochemische eigenschappen, waardoor de overlevingskans in fagocyten van de bacterie verhoogd wordt, (e) de cel 'vermommen' om aan het immuunsysteem te ontkomen, (f) beschadigen van eukaryote membranen door toxines, (g) bijdragen aan symptomen van een septische schok en (h) antimicrobiële resistentie. Dit maakt de virulentiefactoren tot een groot aandachtspunt voor preventie van PJI.

Tijdens de groei van de *S. aureus* verandert zijn genexpressie, waardoor eiwitten in een bepaalde volgorde tot expressie komen en bovenstaande functies elkaar afwisselen. De best gekarakteriseerde virulentieregulatie-eiwitten worden gecodeerd door het eerdergenoemde gen *agr* en de staphylococcal accessory regulator (*sarA*). De expressie van de eiwitten is anders in een hoge optische dichtheid van de bacterie, dan in een lage (Sibbald *et al.*, 2006). *Agr* is een belangrijke positieve regulator voor eiwitten die tot expressie komen in hoge optische dichtheid, maar een negatieve regulator voor eiwitten die tot expressie komen in de exponentiële groeifase (Roux *et al.*, 2014).

In tegenstelling tot het *agr* systeem van *S. aureus*, wordt door het *agr* systeem in *S. epidermidis* een aantal oppervlakte-eiwitten ge-upreguleerd, zoals fenol-oplosbare moduline (PSM) peptides, welke ontstekingverwekkend zijn (Yao *et al.*, 2006)

De *cell-wal-anchored* (CWA) eiwitten zijn cruciale virulentiefactoren voor het succes van zowel een commensale bacterie als een pathogeen. Ze zijn covalent gehecht aan peptidoglycaan en komen tot expressie aan het oppervlak van de celwand. *S. aureus* kan tot 24 verschillende van deze eiwitten tot expressie brengen. De CWA eiwitten kunnen onderverdeeld worden in vier groepen: de MSCRAMMs, de *NEAT Motif* eiwitfamilie, de *Three-helical bundle* eiwitfamilie, zoals Protein A, en de G5-E-repeat eiwitfamilie. De meest voorkomende groep bestaat uit de MSCRAMMs, waarvan ClfA en ClfB eiwitten de meest bestudeerde zijn. Veel CWA eiwitten hebben meerdere functies, zoals adhesie, biofilm formatie, invasie en inflammatie. MSCRAMM's bevatten IgG-achtige structuren in twee subdomeinen in het N-terminale A gebied (Foster *et al.*, 2014).

Een andere functie van de *S. aureus* virulentiefactoren is opname door gastheercellen induceren, zelfs als deze cellen normaal niet fagocytotisch van aard zijn. Zo bevat *S. aureus* subpopulaties van facultatieve intracellulaire pathogenen, genaamd *small colony variants* (SCVs). SCVs veroorzaken

schade van binnenuit aan de gastheercel door cytotoxiciteit, maar het intracellulair bestaan brengt de SCVs bescherming tegen antibiotica. Deze pathogenen stimuleren niet altijd opname, maar ze vertonen wel verhoogde opname door gastheercellen, meer resistentie tegen intracellulaire beïnvloeding en ze stimuleren het afweermechanisme van de gastheer in mindere mate dan de *normal colony-size* bacteriën (Sendi & Proctor, 2009). De SCV wordt gekenmerkt door zijn langzame groei en verminderde grootte ten opzichte van de ouderstam. Ook deze subpopulaties spelen een rol bij infecties van implantaatmateriaal en vertonen verminderde gevoeligheid voor antibiotica (Tubby *et al.*, 2013). De eerdergenoemde FnBPs zorgen voor binding aan het oppervlak van gastheercellen, maar spelen ook een rol bij de internalisatie. Ook *fibrinogen-binding clumping factor* (zoals ClfA en ClfB) is in verhoogde mate aanwezig in SCVs en speelt een rol bij internalisatie (Sinha *et al.*, 1999 & Sendi & Proctor, 2009). De virulentiefactor ClfA bevordert overleving van de bacterie in het bloed, wat de kans op verspreiding in weefsels vergroot. Het bevordert ook abcesvorming in interne organen en gewrichten (Josefsson *et al.*, 2001).

Een virulentiefactor die de functie van het immuunsysteem beperkt, is Protein A. De beide IgG Fc domeinen van de MSCRAMM's worden door specifieke receptoren van neutrofielen herkend en geopsoniseerde bacteriën worden dan opgenomen. Deze opname wordt door Protein A verhinderd, doordat het aan een IgG Fc domein bindt. De cel wordt met verkeerd georiënteerd IgG bedekt, waardoor deze functioneel beperkt is. Als Protein A niet wordt geproduceerd door *S. aureus*, wordt deze beter herkend door neutrofielen en is deze gevoeliger voor opsonine-gemedieerde celdood. Door Protein A te inhiberen zou virulentie worden verminderd (Foster *et al.*, 2014).

## **Profylactische Medicatie**

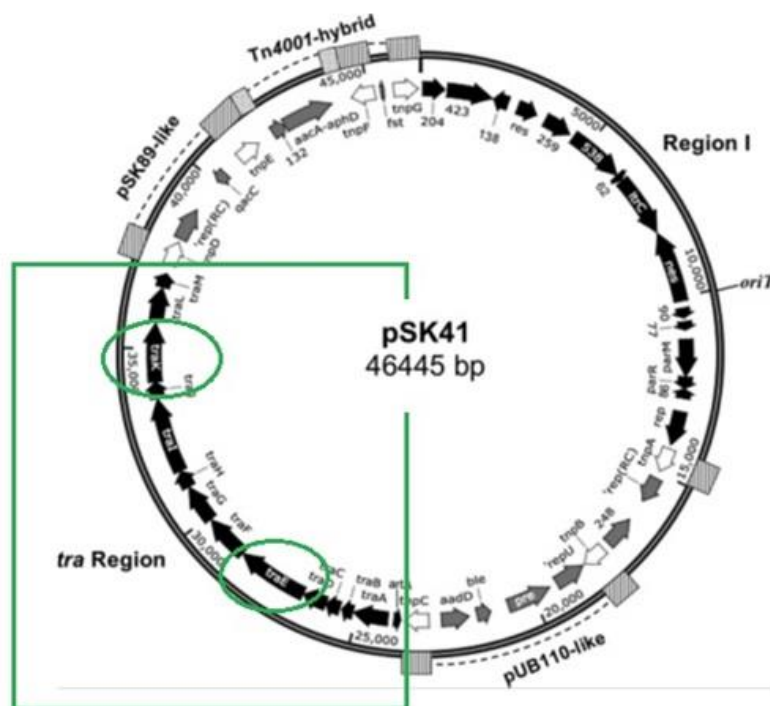
Normaal gesproken wordt bij infectie eerst gecontroleerd op vatbaarheid voor antibiotica van de infectieveroorzakende pathogenen met een conventionele gevoeligheidstest, alvorens er aan een patiënt profylactisch antibiotica worden toegediend bij een protheseplaatsing. Bij de gevoeligheidstesten wordt de ware vatbaarheid in de biofilm niet getest. De gebruikelijke antibiotica die tegen *S. epidermidis* en *S. aureus* gebruikt worden bij PJI, zijn alle niet volledig effectief tegen de resistentie die de biofilm met zich meebrengt. De negen veel gebruikte antibiotica zijn rifampicine, vancomycine, tigecycline, clindamycine, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin, cloxacilline, daptomycine en fosfomycine. Het Calgary Biofilm Device is een gevoeligheidstest, die rekening houdt met de biofilm (Molina-Manso *et al.*, 2013). Rifampicine bleek uit onderzoek het best te werken tegen biofilms. Hierbij dient echter rekening te worden gehouden met het feit dat dit antibioticum niet bij de biofilms komt zonder toxiciteit te veroorzaken. Andere vormen van behandeling, zoals

operatie, zullen daarom als toevoeging nodig zijn om de patiënt te genezen. *S. epidermidis* biofilms lijken minder resistent tegen antibiotica te zijn dan die van *S. aureus* (Molina-Manso *et al.*, 2013).

## Antiresistentie

### Conjugatie-gemedieerde Resistentie Verhinderen

Antibioticaresistentie wordt van bacterie op bacterie overgedragen door middel van conjugatieve plasmides (Edwards *et al.*, 2013). De meeste genen betrokken bij conjugatie van staphylococceen liggen in het *tra* domein van het betreffende plasmide, zoals het plasmide pSK41 van *S. aureus* dat te zien is in figuur 5 (Liu *et al.*, 2013). Het TraE eiwit is bijvoorbeeld een lid van de VirB familie van ATPases, welke betrokken zijn bij het vormen van transmembraankanalen waardoor DNA en andere macromoleculen getransporteerd kunnen worden. Het TraK eiwit lijkt in sequentie op een lid van de VirD4 familie van koppeliwitten, welke een multimeer porie-achtig complex vormen met zowel de DNA-intermediair, als met het relaxase (Liu *et al.*, 2013), een essentieel enzym voor conjugatieve overdracht. Het DNA gaat dan vervolgens door de porie heen voor translocatie. Het eiwit *nicking enzyme in S. aureus* (NES) is een dergelijk relaxase-enzym, welke de overdracht van antibioticum-resistentie plasmiden initieert en termineert (Edwards *et al.*, 2013). Een vergelijkbaar plasmide is het pLW1043 vancomycine-resistentieplasmide, dat codeert voor NES. Door het *tra* domein of het NES-



**Figuur 5:** Genetische kaart van plasmide pSK41. Te zien zijn de posities van de *origin of transfer* (*oriT*), de *open reading frames* (ORFs) aangegeven door pijlen die in de richting van transcriptie wijzen. Zwarte pijlen tonen ORFs die op de plasmide 'backbone' liggen, grijze pijlen zijn ORFs die tussen twee IS257 elementen liggen en de witte pijlen geven transposasegenen weer. Het *tra* domein bevat diverse genen die betrokken zijn bij conjugatie, zoals *traK* en *traE* (Liu *et al.*, 2013).

enzym te inhiberen, zou de overdracht van plasmiden, en daarmee resistentie, sterk bemoeilijkt worden in PJIs.

### *RNA Interferentie*

Ook het ontstaan van antibioticaresistentie zou kunnen worden verhinderd bij de staphylococce ten behoeve van de profylaxe van PJI door middel van antibiotica. Het 'small RNA' (sRNA) SprX is een antisense RNA, dat het *spoVG* gen inhibeert. Het SpoVG eiwit reguleert antibioticaresistentie in *S. aureus* en het *spoVG* gen bevindt zich in een bicistronisch operon (*yabj-spoVG*) op de tweede plaats. Het antisense SprX koppelt aan interne translatie-initiatiesignalen, zodat de expressie van *spoVG* geïnhibeerd wordt en antibioticaresistentie minder snel ontstaat (Eyraud *et al.*, 2014).

Het eerdergenoemde pSK41 codeert in zijn replicatie gebied voor Rep, dat een voor replicatie essentieel eiwit is, en bindt vier tandem-repeat sequenties midden in het coderende gebied. Deze heeft een upstream A-T-rijke inverted-repeat sequentie nodig voor efficiënte replicatie. Voor deze upstream A-T-rijke inverted-repeat sequentie bestaat een antisense RNA, dat via het mechanisme van RNA interferentie werkt en zo de replicatie van het plasmide verhindert (Kwong *et al.*, 2004). Zonder dit plasmide ontstaat in de staphylococce minder resistentie en kunnen antibiotica beter hun werk doen ter preventie van PJI.

### **Antivirulentie Agenten**

Een andere mogelijkheid is de virulentie van de staphylococce tegen gaan. Antivirulentie-agenten verhinderen de productie van virulentiefactoren, die ziekte veroorzakend zijn en een rol spelen in biofilmvorming en ontsteking, en staan daarmee aan de basis van PJI. Een voorbeeld van antivirulentie-agenten tegen MRSA zijn verbindingen van kleine moleculen, die de productie van de toxines alfa-hemolysine en fenol-oplosbare moduline  $\alpha$  inhiberen. Deze verhinderen dat de respons regulator AgrA aan de P3 promotor kan binden (figuur 4) en zo transcriptie van virulentiefactoren induceert. De antivirulentie agenten verhinderen de toxines op een dosisafhankelijke manier zonder de bacteriële groei te beïnvloeden. Een van deze agenten heet diflunisal, een door de 'Food and Drug Administration' goedgekeurd anti-ontstekingsmedicijn. Een dergelijk product zou als profylaxe of als antibiotische adjuvans kunnen dienen voor PJI (Khodaverdian *et al.*, 2013).

### **Gericht tegen Bacteriële Groei en Overleving**

#### *Verhongering van nutriënten*

Groei van bacteriën kan worden tegengegaan door het wegnemen van belangrijke nutriënten uit de

omgeving. Een belangrijke voedingsstof is glucose. Uit dit molecuul wordt de energie om te leven geput. Als de bacterie deze nutriënt in eerste instantie niet tot zijn beschikking zou hebben op de plaats van een botgerelateerd implantaat, zou de bacterie moeite hebben met groeien en niet kunnen infecteren (Michalik *et al.*, 2009).

Naast glucose is ijzer een belangrijke voedingsstof. Bijna alle microbiële pathogenen hebben exogene bronnen van ijzer nodig om te overleven en te groeien. Ijzer is een essentiële elektronenacceptor in de oxidatieve fosforylering, waarbij ATP gegenereerd wordt als energie van de cel. Deze ATP generatie is cruciaal voor het elektronenpotentiaal over de celmembraan (membraanpotentiaal). Door ijzer weg te binden (*ijzersequestering*) wordt de groei en overleving van deze pathogenen verhinderd. Onder *ijzersequestering* wordt verstaan dat ijzerionen worden opgevangen en weggenomen uit het milieu van een bacterie. Zo zijn de ijzerionen niet meer beschikbaar voor de pathogeen (Lin *et al.*, 2014). In een onderzoek van Lin *et al.* uit 2014 is *S. aureus* blootgesteld is aan geconditioneerd medium met transferrine erin. De bacterie blijkt hier slecht kolonies op te vormen (Lin *et al.*, 2014). Een verklaring hiervoor is dat de *ijzersequestering*-activiteit van transferrine waarschijnlijk de membraanpotentiaal verstoort. *In vivo* testen van transferrine op muizen, die met onder andere *S. aureus* besmet waren, bleken zeer effectief. Na behandeling van 21 dagen had 40% van de muizen het overleefd en verkeerde in goede gezondheid (Lin *et al.*, 2014). Op deze manier zou infectie met *S. aureus*, zoals bij PJI, voorkomen of behandeld kunnen worden.

#### *Antisense peptide-nucleïnezuren*

De groei van de staphylococcen zou ook tegengewerkt kunnen worden via antisense inhibitie van RNA van essentiële genen. Een van de essentiële genen van *S. aureus* is de primaire sigma factor ( $\sigma^{70}$ ) van het RNA polymerase (RNAP). Deze is een sterk geconserveerd prokaryotische transcriptiefactor, die essentieel is voor transcriptie initiatie in exponentieel groeiende *S. aureus*.  $\sigma^{70}$  wordt gecodeerd door het gen *rpoD*, welk een veelbelovende target-kandidaat is voor nieuwe antisense antibiotica om MRSA te bestrijden. Via de 234-243 nucleotiden van het *rpoD* RNA kan het *rpoD* gen antisense worden geïnhibeerd door peptide-PNA conjugaten. Dat zijn oligomeren van peptide-nucleïnezuren, die aan een bacteriële cel worden aangeboden als conjugaten. Daarop volgt een blokkade op transcriptie in een concentratie- en tijdafhankelijke manier, waardoor er blokkade optreedt voor groei en genexpressie van de pathogeen (Bai *et al.*, 2012). Zo kan de pathogeen niet groeien en bijvoorbeeld geen PJI veroorzaken.

#### *Expressie toxine-antitoxine: apoptose*

Een andere manier om PJI te bestrijden is door geprogrammeerde celdood (apoptose) te induceren via het toxine-antitoxine (TA) systeem, dat bestaat uit een stabiele toxine en een instabiele

antitoxine. Het speelt een rol in normale fysiologie van de bacterie, maar ook in de pathogenese. Als de kortlevende antitoxine gedegradeerd raakt, waarvan de halfwaardetijd tien minuten is tegenover de drie uur van de toxine, dan wordt de toxine niet meer geremd en zal deze celdood induceren. Er zijn veel verschillende TA systemen aanwezig in *S. aureus*. *S. aureus* brengt een type I TA-systeem tot expressie, bestaande uit een RNA (SprA1) coderend voor een toxisch peptide (PepA1) en een antisense RNA antitoxine (SprA1<sub>AS</sub>) die translatie van de toxine inhibeert. Er vindt repressie plaats door het instabiel antisense RNA SprA1<sub>AS</sub>, dat de PepA1 translatie initiatie inhibeert, totdat de cel getriggerd wordt door specifieke omgevingsignalen. Het PepA1 is hydrofobisch en inserteert zich in de *S. aureus* membranen en induceert apoptose-achtige celdood door de membraan integriteit te verstoren. Tijdens de groei van *S. aureus* wordt de expressie van PepA1 verhinderd, maar door oxidatieve- en zuurstress wordt deze gestimuleerd (Sayed *et al.*, 2012). Mogelijk zou voor therapeutische toepassingen de apoptose-achtige celdood van *S. aureus* kunnen worden gestimuleerd door het antitoxine te inhiberen.

## Discussie

*Prosthetic Joint Infection* (PJI) veroorzaakt door staphylococcen vormt een probleem vanwege de steeds meer optredende antibioticaresistentie. Dit artikel geeft een breed beeld van de biologie van de twee bij PJI meest voorkomende bacteriën *Staphylococcus aureus* en coagulase-negatieve *Staphylococcus epidermidis*. PJI ontstaat doordat bacteriën aan de prothesen binden en daar biofilms vormen door middel van diverse virulentiefactoren. Zij kunnen zich hiermee binden aan de prothesen zelf of aan de conditioneringslaag. De biofilms verschaffen de pathogenen extra antibioticaresistentie en daardoor is de preventie van PJI een complex vraagstuk.

Naast biofilmvorming, dragen quorum-sensing via *agr*, antibioticaresistentie genen en conjugatie van multiresistentieplasmiden bij aan antibioticaresistentie. Om resistentie de kop in te drukken, zouden deze factoren aangepakt moeten worden. Daarnaast is de pathogenese van de PJI-verwekkers een probleem voor de patiënt, omdat de patiënt zich daardoor ziek voelt.

Virulentiefactoren liggen aan de basis van toxiciteit en de verspreiding in de gastheer. Als deze kunnen worden geremd, zou de patiënt minder last ondervinden van de infectie. Ten slotte zouden er steeds nieuwe manieren moeten worden onderzocht om de groei en verspreiding van PJI-verwekkers te remmen. Hier zijn voorbeelden gegeven van antisense peptide-nucleïne-zuren, het beperken van beschikbaarheid van nutriënten en het induceren van apoptose-achtige celdood.

Door middel van dit artikel is getracht een beeld te schetsen van diverse mogelijkheden om infecties die gepaard gaan met plaatsing van botgerelateerde implantaten te voorkomen. Locaties

van infectie zijn echter divers van aard en de keuze voor gewrichtsprothesen (PJI) is gemaakt vanuit de beschikbare literatuur. Het probleem is groter dan enkel PJI, waardoor uitspraken ten behoeve van preventie van infecties bij botgerelateerde implantaten nog te beperkt zijn. Daarnaast is de hoeveelheid infectieveroorzakers in PJI erg groot en onderzoek naar meerdere, diverse pathogenen zou een interessante vervolgstap zijn. Interessant is ook om nog te kijken naar de bacteriën, welke mindervoorkomend zijn, maar sterke resistentie vertonen; En daarnaast de cultuur-negatieve bacteriën, waarvan het onbekend is welke pathogeen de infectie veroorzaakt. Resultaten van dergelijk onderzoek zouden een nog breder en meer alomvattend beeld geven voor profylaxe van infecties van botgerelateerde implantaten.



## ***Integratie van de disciplines***

In een antwoord op de vraag naar preventiemogelijkheden voor infecties van botgerelateerde implantaten hebben zowel de microbiologie als de geneeskunde vanuit hun eigen discipline literatuuronderzoek verricht. De microbiologie heeft gekeken naar de belangrijkste infectieverwekkers en mogelijke preventie van hun groei en pathogenese. De geneeskunde heeft gekeken naar de perioperatieve factoren en de mogelijke invloed op het ontstaan van de infecties.

Het antwoord van de microbiologie heeft vooral vele deuren geopend naar verder onderzoek. Het erkent het ontstaan van resistentie tegen antibiotica in bacteriën als een groot probleem zowel nu, als in de nabije toekomst. De snelle groei van bacteriën en hun evolutie is noodzakelijk bij te benen om gehele resistentie te voorkomen. Nieuwe mogelijkheden zijn te vinden in het voorkomen van biofilms. De eerste stappen, aanhechting en maturatie, van biofilmvorming zijn potentiële processen waartegen nieuwe profylaxe gericht kan worden. Het is noodzakelijk om infecties te voorkomen, maar ook om resistentie van bacteriën tegen antibiotica te omzeilen.

Het antwoord op de geneeskundige deelvraag is dat vooral de kwaliteit van de weke delen, het niet-bot, rondom een botbreuk in sterke mate de genezing en de afweer tegen infecties bepaalt. Het ontwerp van de implantaten en het bijbehorend succes hangen af van de mate waarin ze het weefsel beschadigen of verstoren. Het uitruimen van ontstoken of afstervend weefsel en het desnoods transplanteren van gezond weefsel naar die plek, beïnvloeden de infectiekans. Daarnaast is perioperatief antibioticagebruik erg belangrijk, maar ook de geneeskunde erkent de hiermee verbonden toenemende resistentie.

### ***Theoretisch kader***

Het is opvallend hoe beide disciplines overlappen in de algemene concepten. De geneeskunde, bestaande uit vele subdisciplines, gebruikt op microscopisch gebied de termen uit de microbiologie en heeft vrijwel geen vervangende termen. De microbiologie kent daarentegen het vocabulaire uit andere subdisciplines van de geneeskunde veel minder. Hoewel de microbiologie diepgaander is, hoeft er in het overlappende gebied geen miscommunicatie te ontstaan, wat het bespreken van elkaars uitkomsten eenvoudiger maakt.

Toch zijn er in wat onderlinge verschillen. Allereerst verschilt de richting van het redeneren. Op de denkbeeldige schaal tussen de zieke patiënt en het ziekteverwekkende organisme opereert de geneeskunde vanuit de patiënt naar zowel zijn macroscopische, als microbiologische omgeving. Dit gebeurt echter enkel vanuit een vastgesteld probleem. Voor de geneeskunde is de mens hoofdzaak en de ziekteverwekker interessant voor onderzoek, zolang deze schade aanricht. De manier waarop de ziekteverwekker kan worden bestreden, zal worden gewaardeerd aan de hand van het nut voor



**Figuur 6.** Organisatie van onderzoek van de geneeskunde en de microbiologie. Onderzoek van de geneeskunde (blauw) en van de microbiologie (groen) verhoudt zich tot elkaar als respectievelijk macroniveau ten opzichte van microniveau respectievelijk. Iedere grootschalige bevinding (macro) kent een micro-component en alle kennis van de kleinste dingen (micro) moet toepasbaar zijn op macroniveau. Zo zullen kennis over en toepassingen op bacteriën toegepast moeten kunnen worden op het lichaam.

de patiënt. Er wordt top-down geredeneerd en er is constant feedback naar dit macroniveau. De microbioloog neemt vanuit de ziekte een positie in op het niveau van de micro-organismen. Dit wordt teruggekoppeld naar de ziekte en de patiënt en daarmee draagt de microbioloog oplossingen aan voor de arts. Daarnaast doet deze veel breder onderzoek op een specifiek gebied naar micro-organismen. Microbiologische ontdekkingen, waar de geneeskunde op dit moment niets aan heeft, leveren wel kennis op voor de toekomst en kunnen zo bottom-up worden gebruikt bij bijvoorbeeld infectiepreventie.

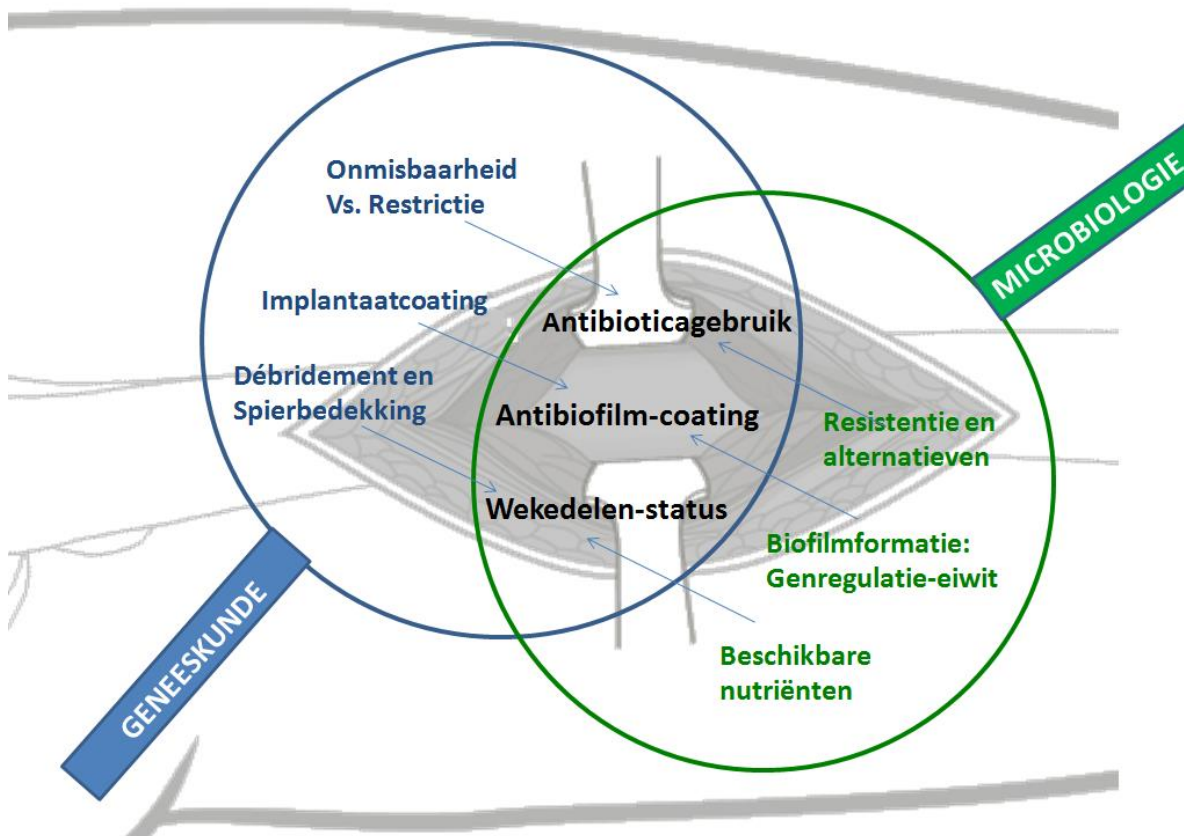
Daarnaast verschillen de microbiologie en de geneeskunde op het

niveau van onderzoek doen. Kort samengevat worden door de geneeskundige de omgevingsfactoren rond een operatie en lokale factoren op het niveau van de wond onderzocht, zoals de betrokken verwekkers, de gebruikte coating en de kwaliteit van de weke delen. De microbiologie kijkt eveneens op dit niveau mee, maar bekijkt de infectieveroorzakers op moleculair en cellulair niveau. De interactie tussen de niveaus staat weergegeven in figuur 6.

Tenslotte verschillen de onderzoekstechnieken. De geneeskunde onderzoekt aan de hand van klinische trials en heeft dus veel *experience based* uitkomsten. Dit maakt enerzijds uitkomsten aannemelijk, maar geeft weinig idee van de reden van de uitkomst. Klinische onderzoeken, met name retrospectieve onderzoeken, zijn bovendien beperkt te standaardiseren, waardoor er inmenging is van andere, moeilijk te meten invloeden. De microbiologie onderzoekt niet in de mens, waardoor deze minder beperkt is in het doen van onderzoek en kan daardoor meer onderbouwde uitspraken doen. Hoe dit echter zal uitpakken in de mens, is hier juist niet bekend.

### Common Ground

Wanneer de twee discipline inzichten naast elkaar worden gezien kunnen verschillende verbindingen worden gelegd. Hierbij is gebruik gemaakt van de technieken zoals beschreven door Allan F. Repko in zijn boek *Interdisciplinary Research* (2012). De met behulp hiervan gegenereerde, zogeheten *common ground* staat weergegeven in figuur 7.



**Figuur 7:** Commonground-schema van de geneeskundige en microbiologische concepten betreffende preventie van infectieziekten bij botgerelateerde implantaten. Een geneeskundige loep en een microbiologische loep worden gericht op een met implantaten gestabiliseerde beenbreuk, waarbij het omliggende weefsel open wordt gehouden. De eerste vergroting valt door de loep van de geneeskunde. Deze discipline bekijkt onmisbaarheid van preoperatief toegediende antibiotica, coating van implantaten en de manier van débridement en toedekken van de wond. De microbiologie vergroot sterker en ziet door zijn loep de antibioticaresistentie van de meest voorkomende infectieveroorzakers (de staphylococcen), de mechanismen achter de aanhechting en maturatie van biofilms en beïnvloeding van lokale factoren, zoals beschikbare nutriënten. De loepen overlappen elkaar wat betreft het gebruik van antibiotica, de coating tegen het vormen van een biofilm en de toestand van de weke delen.

Wat betreft antibioticagebruik adviseert de geneeskunde een zo snel mogelijke toediening van een korte kuur van een antibioticum dat gericht is tegen met name Gram-positieve bacteriën. Hier vallen

ook de staphylococcon onder, waar de microbiologie zich op heeft gericht. Alle onderzoeken tonen aan dat antibioticagebruik zeer effectief is en niet achterwege kan worden gelaten gezien de noodzaak tot de beste behandeling van iedere zieke patiënt. Wel wordt het probleem van resistentie erkend. Het grootste advies is de therapieduur minimaliseren en niet onnodig met breedgerichte antibiotica behandelen. De microbiologie bevestigt de werking van antibiotica, maar is pessimistischer ten opzichte van het gebruik en is strenger in het afzweren ervan. Het grootste gevonden probleem met betrekking tot de mechanismen die ten grondslag liggen aan resistentie, is de overdracht van resistentie van bacteriën in biofilms. Zoals eerder vermeld, is *Nicking- Enzyme in S. Aureus* (NES) van essentieel belang in de overdracht van plasmiden met antibioticaresistentie binnen de soort, maar ook naar andere soorten zoals de *E. coli*, een Gram-negatieve bacterie.

Het overdrachtsmechanisme op microniveau zou de door de geneeskunde waargenomen trend van resistentie op macroniveau kunnen verklaren. Bovendien vullen de inzichten elkaar aan in het feit dat specifieke behandeling vereist is. De organisatie (Repko, 2012) van disciplinaire inzichten betreffende het antibioticagebruik Een mogelijkheid tot alternatieve aanpak, aangedragen vanuit de microbiologie, is de blokkade van enzymen zoals NES. De overdracht van resistentie wordt zo bemoeilijkt en daarmee blijft de antibiotische preventiemogelijkheid toepasbaar. Dit is op zichzelf al gunstig, maar vergroot bovendien de tijd voor de zoektocht naar overige alternatieven.

Een bevinding die in beide disciplines naar voren komt, is dat bacteriën in biofilms resistenter zijn. De microbiologie behandelt de theorie achter dit mechanisme en onderzoekt biofilmvorming, waarbij de processen aanhechting en maturatie aanpakpunten vormen voor preventie van infectie en resistentie. De geneeskunde vat dit kort samen, maar doet dit verder af als toekomstig onderzoek. Er zijn namelijk nog nauwelijks klinische trials mee gedaan. Verder behandelt de geneeskunde het algemene concept van het aanbrengen van een coating op implantaten. Het is duidelijk dat de kennis over biofilmvorming vanuit de microbiologie, de klinische ervaring en de gevolgen hiervan voor de patiënt vanuit de geneeskunde samengevoegd kunnen worden. Het voorkomen van biofilmvorming met behulp van een coating van de implantaten kan een belangrijke rol spelen in bij infectiepreventie. Dit principe herdefiniëren (Repko, 2012) tot de term antibiofilmcoating.

Eveneens opvallend is het raakvlak tussen de twee disciplines op het gebied van lokale wondfactoren. De geneeskunde benoemt het belang van gezond omliggend weefsel, de weke delen. Alle genoemde maatregelen hebben als doel de weke delen zo min mogelijk te beschadigen en 'gezond' hun werk te laten doen. De microbiologie benoemt factoren uit die weke delen, zoals ijzer en glucose, die infecties bevorderen. Er is een therapie voorhanden, weliswaar in de kinderschoenen, met transferrine, een stof die ijzer uit de omgeving van de bacterie wegneemt en zo zijn groei belemmert.

De een stelt voor de weefsels met rust te laten, terwijl de ander factoren wil wegnemen die iedere gezonde cel nodig heeft. Ziet problemen in de toepasbaarheid van beide therapieën gezien de basale behoefte aan glucose van iedere gezonde cel. Door middel van transformatie (Repko, 2012) zijn beide uitkomsten als uitersten te plaatsen op 'de schaal van gezondheid' betreffende de cellen uit de omliggende weke delen. Op deze schaal is mogelijk een perfect balans te vinden waarin de weke delen minimaal worden geschaad en toch de bacteriën beperkt worden in hun nutriënten. Dit nader te definiëren punt op deze schaal beschrijven wij met wekedelen-status.

### ***'A more comprehensive understanding'***

De geïntegreerde begrippen antibioticagebruik, antibiofilm-coating en wekedelen-status tonen drie elkaar aanvullende richtingen waarin naar preventiemogelijkheden kan worden gezocht.

Om toch een praktische toepassing te geven, wordt bij dezen een voorstel gedaan van een geïntegreerde profylaxe. Een mogelijkheid ligt in het ontwerp van antibiofilm-coating bestaande uit een 'cocktail', een combinatie van nieuwe antibiotica, volgens antibioticagebruik, en middelen van de wekedelen-status. Met deze cocktail worden de verwekkers geremd, hun resistentie verminderd, de wekedelenschade beperkt en de hoeveelheid nutriënten gelimiteerd, zodat het ontstaan van infectie tot een minimum wordt gedreven.

### **Conclusie en Discussie**

Vanwege een verhoogd aantal medische ingrepen, toenemende resistentie en desastreuze gevolgen bij geïnfecteerde implantaten, is het van belang onderzoek te blijven doen naar preventiemogelijkheden voor deze infecties. Door middel van disciplinaire onderzoeken van de geneeskunde en de microbiologie is in deze scriptie een theoretisch kader geschetst waarbinnen de mogelijkheden voor de toekomst liggen. Infecties van botgerelateerde implantaten kunnen worden voorkomen door toepassing van de geïntegreerde concepten antibioticagebruik, antibiofilm-coating en wekedelen-status. In de praktijk kan men denken aan een cocktail waarin eigenschappen van deze drie worden samengevoegd.

Een sterke nuance is bij dit plan vereist. Niet voor niets blijkt een specifieke aanpak van bacteriën noodzakelijk in de strijd tegen antibioticaresistentie en worden brede behandelingen afgewezen gezien de verhoogde selectiedruk en daarmee versnelde resistentie. Wanneer verwekkers ook voor deze nieuwe cocktail resistent worden, is de mensheid nog veel verder van huis. Dit zou pleiten voor toepassing van slechts één van de drie mogelijkheden per patiënt, eventueel twee bij

hoogrisicopatiënten en de gehele cocktail als laatste redmiddel.

Hoopvol is wel dat niet alleen bacteriedodend wordt behandeld, maar dat ook de resistentie de kop in wordt gedrukt. Dit verlaagt juist de selectiedruk en zorgt voor een langere toepasbaarheid. Bovendien zouden bij groot succes van één van de drie toepassingen de overigen overbodig kunnen worden.

Opmerkelijk is dat het bedoelde preventie-onderzoek erg dicht in de buurt komt van behandelingsmogelijkheden. De cocktail voorkomt infectie, maar kan zeer waarschijnlijk ook worden toegepast als behandelingsmethode. Bij geconstateerde infectie zou de implantaat dan kunnen worden vervangen door een implantaat met antibiofilm-coating.

Dan is er nog de algemene nuancering dat de integratie voornamelijk beperkt is tot de onderwerpen die door de microbiologie zijn behandeld. De geneeskunde heeft breder onderzoek gedaan naar factoren die mogelijk ook perspectief bieden, maar die door beperkt, diepgaand onderzoek vanuit de microbiologie in de integratie geen plek kregen. Wanneer de microbiologie naar deze factoren wel onderzoek zou doen, liggen er ongetwijfeld nog vele andere mogelijkheden.

## Referenties: Inleiding

- Achermann, Y., Eigenmann, K., Ledergerber, B., Derksen, L., Rafeiner, P., Clauss, M., Nüesch, R., Zwellweger, C., Vogt, M. and Zimmerli, W. (2013). Factors associated with rifampin resistance in staphylococcal periprosthetic joint infections: a matched case-control study. *Infection*, 41:431-437.
- Benoit, S. R., Ellingson, K. D., Waterman, S. H. and Pearson, M. L. (2013). *Antimicrobial resistance in eight US hospitals along the US-Mexico border, 2000-2006*. *Epidemiology & Infection*. 1-10.
- CBS (2014). *Operaties in het ziekenhuis; soort opname, leeftijd en geslacht, 1995-2010*. *Centraal Bureau voor de Statistiek*. Last update 2014 Feb 5. Cited on 2014 Feb 21. Hyperlink: [http://statline.cbs.nl/StatWeb/publication/?DM=SLNL&PA=80386NED&D1=a&D2=0&D3=0&D4=a&D5=0,5,10,I&HDR=T&STB=G4,G1,G2,G3&VW=T]
- Jämsen, E., Furnes, O., Engesaeter, L.B., Konttinen, Y.T., Odgaard, A., Stefansdottir, A., and Lidgren, L. (2010). *Prevention of deep infection in joint replacement surgery*. *Acta Orthopaedica*. 81: 660-666.

## Referenties: Inzichten vanuit de Geneeskunde

- Abubaker, A. O. and Rollert, M. K. (2001). Postoperatieve antibiotic prophylaxis in mandibular fractures: A preliminary randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 59: 1415-9.
- Acello, A. N., Wallace, G.F. and Pachuda, N. M. (1995). Treatment of open fractures of the foot and ankle: a preliminary report. *The Journal of Foot and Ankle Surgery; Official Publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons*, 34: 326-46.
- Achermann, Y., Eigenmann, K., Ledergerber, B., Derksen, L., Rafeiner, P., Clauss, M., Zimmerli, W. (2013). Factors associated with rifampin resistance in staphylococcal periprosthetic joint infections (PJI): a matched case-control study. *Infection*, 41: 431-7.
- Ahmed, S. M. Y., Ahmad, R., Case, R. and Spencer, R. F. (2009). A study of microbial colonisation of orthopaedic tourniquets. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 91: 131-4.
- Belien, M. (2000). *Orthopedische chirurgie* (1st ed.). Maarssen: Reed Business.
- Benoit, S. R., Ellingson, K.D., Waterman, S. H. and Pearson, M. L. (2013). Antimicrobial resistance in eight US hospitals along the US-Mexico boerder, 2000-2006. *Epidemiology and Infection*, 1-10.
- Benson, D., Riggins, R., Lawrence, R., Hoeprich, P., Huston, A. and Harriton, J. (1983). Treatment of open fractures. A prospective study. *The Journal of Trauma*, 83: 25-30.
- Bhandari, M., Audige, L., Ellis, T. and Hanson, B. (2003). Operative treatment of extra-articular proximal tibial fractures. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 17: 591-5.
- Bumgardner, J. D., Adatrow, P., Haggard, W.O. and Norowski, P. A. (2011). Emerging antibacterial biomaterial strategies for the prevention of peri-implant inflammatory diseases. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 26: 553-60.

- Calhoun, J. H. (2014). Optimal Timing of Operative Debridement: A Known Unknown. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 90: 2-3.
- Chow, T. T. and Yang, X. Y. (2004). Ventilation performance in operating theatres against airborne infection: review of research activities and practical guidance. *The Journal of Hospital Infection*, 56: 85-92.
- Costerton, J. W., Montanaro, L. and Arciola, C. R. (2005). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *The International Journal of Artificial Organs*, 28: 1062-8.
- Court-Brown, C. M., McQueen, M. M., Quaba, A. A. and Christie, J. (1991). Locked intramedullary nailing of open tibial fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 73: 959-64.
- Crowley, D. J., Kanakaris, N. K. and Giannoudis, P. V. (2007). Debridement and wound closure of open fractures: The impact of the time factor on infection rates. *Injury*, 38: 879-89.
- Della Rocca, G. J. and Crist, B. D. (2006). External fixation versus conversion to intramedullary nailing for definitive management of closed fractures of the femoral and tibial shaft. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 14: 131-5.
- Dellinger, E. P., Caplan, E. S., Weaver, L. D., Wertz, M. J., Droppert, B. M., Hoyt, N. and Benirschke, S. K. (1988). Duration of preventive antibiotic administration for open extremity fractures. *Archives of Surgery*, 123: 333-9.
- DeLong, W. G., Born, C. T., Wei, S. Y., Petrik, M. E., Ponzio, R. and Schwab, C. W. (1999). Aggressive treatment of 119 open fracture wounds. *The Journal of Trauma*, 46: 1049-54.
- Duan, X., Al-Qwbani, M., Zeng, Y., Zhang, W. and Xiang, Z. (2012). Intramedullary nailing for tibial shaft fractures in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1: CD008241.
- Ellis, S. L., Finn, P., Noone, M. and Leaper, D. J. (2003). Eradication of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Pressure Sores Using Warming Therapy. *Surgical Infection*, 4: 53-55.
- Esnaola, N. F. and Cole, D. J. (2011). Perioperative normothermia during major surgery: is it important? *Advances in Surgery*, 45: 249-63.
- Fang, X., Jiang, L., Wang, Y. and Zhao, L. (2012). Treatment of Gustilo grade III tibial fractures with unreamed intramedullary nailing versus external fixator: a meta-analysis. *International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 18: 49-56.
- Forbes, S. S., Eskicioglu, C., Nathens, A. B., Fenech, D. S., Laflamme, C., McLean, R. F. and McLeod, R. S. (2009). Evidence-based guidelines for prevention of perioperative hypothermia. *Journal of the American College of Surgeons*, 209: 492-503.
- Friberg, B., Lindgren, M., Karlsson, C., Bergström, A. and Friberg, S. (2002). Mobile zoned/exponential LAF screen: a new concept in ultra-clean air technology for additional operating room ventilation. *The Journal of Hospital Infection*, 50: 286-92.
- Gastmeier, P., Breier, A. C. and Brandt, C. (2012). Influence of laminar airflow on prosthetic joint infections: a systematic review. *The Journal of Hospital Infection*, 81: 73-8.
- Giannoudis, P. V., Giannoudi, M. and Stavlas, P. (2009). Damage control orthopaedics: lessons learned. *Injury*, 40: 47-52.



- Gillespie, W. and Walenkamp, G. (2010). Antibiotic prophylaxis for surgery for proximal femoral and other closed long bone fractures (Review). *The Cochrane Library*, 3: 1-71.
- Gopal, S., Majumder, S., Batchelor, A. G., Knight, S. L. De Boer, P. and Smith, R. M. (2000). Fix and flap: the radical orthopaedic and plastic treatment of severe open fractures of the tibia. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 82: 959-66.
- Gosselin, R., Roberst, I. and Gillespie, W. (2004). Antibiotics for preventing infection in open limb fractures (Review). *The Cochrane Library*, 1: 1-29.
- Gustilo, R. B. and Anderson, J. T. (1976). Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 58: 453-8.
- Harley, B. J., Beaupre, L. a, Jones, C. A., Dulai, S. K. and Weber, D. W. (2002). The effect of time to definitive treatment on the rate of nonunion and infection in open fractures. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 16: 484-90.
- Hauser, C. J., Adams, C. a and Eachempati, S. R. (2006). Surgical Infection Society guideline: prophylactic antibiotic use in open fracutres: an evidence-based guideline. *Surgical Infections*, 7: 379-405.
- Hildebrand, F., Giannoudis, P., Krettek, C. and Pape, H. C. (2004). Damage control: extremities. *Injury*, 35: 678-89.
- Jaeger, M., Maier, D., Kern, W. V. and Südkamp, N. P. (2006). Antibiotics in trauma and orthopedic surgery – a primer of evidence-based recommendations. *Injury*, 37: 74-80.
- Jämsen, E., Furnes, O., Engesaeter, L. B., Konttinen, Y. T., Odgaard, A., Stefánsdóttir, A. and Lidgren, L. (2010). Prevention of deep infection in joint replacement surgery. *Acta Orthopaedica*, 81: 660-6.
- Jenkinson, R. J., Fracs, C., Kiss, A., Johnson, S., Stephen, D. J. G. and Kreder, H. J. (2014). Delayed wound closure increases deep infection rate associated with lower-grade open fractures, 96: 380-6.
- Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, 31: 224-45.
- Källicke, T., Schierholz, J., Schlegel, U., Frangen, T. M., Köller, M., Printzen, G., Arens, S. (2006). Effect on infection resistance of a local antiseptic and antibiotic coating on osteosynthesis implants: An in vitro and in vivo study. *Journal of Orthopaedic Research*, 24: 1622-1640.
- Kurz, A., Sessler, D. I. and Lenhardt, R. (1996). Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. *The New England Journal of Medicine*, 334: 1209-15.
- Leaper, D. (2006). Effects of local and systemic warming on postoperative infections. *Surgical Infections*, 7: 101-3.
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Revies. Microbiology*, 5: 48-56.
- Li, Y., Jiang, X., Guo, Q., Zhu, L., Ye, T. and Chen, A. (2014). Treatment of dital tibial shaft fractures by three different surgical methods: a randomized, prospective study. *International Orthopaedics*, Epub ahead of print.
- Maddikeri, R. R., Tosatti, S., Schuler, M., Chessari, S., Textor, M., Richards, R. G. and Harris, L. G. (2007). Reduced medical infection related bacterial strains adhesion on bioactive RGD modifid titanium surfaces: a first step toward cell selective surfaces, *Wiley InterScience*, Epub.

- Maffulli, N., Testa, V. and Capassa, G. (1993). Use of a tourniquet in the international fixation of fractures of the distal part of the fibula. A prospective, randomized trial. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 75: 700-3.
- Melling, A. C., Ali, B. Scott, E. M. and Leaper, D. J. (2001). Effects of preoperative warming on the incidence of wound infection after clean surgery: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 358: 876-80.
- Nanchahal, J., Nayagam, S. Khan, U., Moran, C., Barrett, S., Sanderson, F. and Pallister, I. (2009). Open fractures of the lower limb. Who should read this guide? *British Orthopedic Association*. 8-24.
- Nayagam, S. (2007). Safe corridors in external fixation: the lower leg (tibia, fibula, hindfoot and forefoot). *Strategies in Trauma and Limb Reconstructions (Online)*, 2: 105-10.
- Neuman, D. and Grzebieniak, Z. (2014). Surgical site infection – the author’s own prospective research. *Polski Przegląd Chirurgiczny*, 86: 26-32.
- Odinsson, A. and Finsen, V. (2006). Tourniquet use and its complications in Norway. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 88: 1090-2.
- Okike, K. (2006). Trends in the management of open fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 88: 2739-48.
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G. and Read, R. R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66: 86-92.
- Pape, H. C., Giannoudis, P. and Krettek, C. (2002). The timing of fracture treatment in polytrauma patients: relevance of damage control orthopedic surgery. *American Journal of Surgery*, 183: 622-9.
- Patzakis, M. J., Harvey, J. P. and Ivler, D. (1974). The role of antibiotics in the management of open fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 56: 532-41.
- Pollak, A. N., Jones, A. L., Castillo, R. C., Bosse, M. J. (2010). The relationship between time to surgical débridement and incidence of infection after open high-energy lower extremity trauma. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 92: 7-15.
- Rohde, C., Greives, M. R., Cetrulo, C., Lerman, O. Z., Levine, J. P. and Hazen, A. (2007). Gustilo grade IIIB tibial fractures requiring microvascular free flaps: external fixation versus intramedullary rod fixation. *Annals of Plastic Surgery*, 59: 14-7.
- Saied, A. and Zyaei, A. (2010). Tourniquet use during plating of acute extra-articular tibial fractures: effects on final results of the operation. *The Journal of Trauma*, 69: 94-7.
- Salvati, E. A., Robinson, R. P., Zeno, S. M., Koslin, B. L., Brause, B. D. and Wilson, P. D. (1982). Infection rates after 3175 total hip and Total knee replacements performed with and without a horizontal unidirectional filtered air-flow system. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 64: 525-35.
- Schenker, M. L., Yannascoli, S., Baldwin, K. D., Ahn, J. and mehta, S. (2012). Does timing to operative débridement affect infectious complications in open long-bone fractures? A systematic review. *The Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 94: 1057-64.
- Schlegel, U. and Perren, S. M. (2006). Surgical aspects of infection involving osteosynthesis implants: implant design and resistance to local infection. *Injury*, 37: 67-73.

- Shahrooei, M., Hira, V., Khodaparast, L., Stijlemans, B., Kucharíková, S., Eldere, J. van (2012). Vaccination with SesC decreases staphylococcus epidermidis biofilm formation. *Infection and Immunity*, 80: 3660-8.
- Thompson, S. M., Middleton, M., Farook, M., Cameron-Smith, A., Bone, S. and Hassan, A (2011). The effect of sterile versus non-sterile tourniquets on microbiological colonisation in lower limb surgery. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 93: 589-90.
- Tuttle, M. S., Smith, W. R., Williams, A. E., Agudelo, J. F. Hartshorn, C. J., Moore, E. E. and Morgan, S. J. (2009). Safety and efficacy of damage control external fixation versus early definitive stabilization for femoral shaft fractures in the multiple-injured patient. *The Journal of Trauma*, 67:602-5.
- Vallier, H. A., Cureton, B. A. and Patterson, B. M. (2011). Randomized, prospective comparison of plate versus intramedullary nail fixation for distal tibia shaft fractures. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 25: 736-41.
- Velhams, G. C., Toutouzas, K. G., Sarkisyan, G., Chan, L. S., Jindal, A. Karaiskakis, M., Demetraides, D. (2002). Severe trauma is not an excuse for prolonged antibiotic prophylaxis. *Archives of Surgery*, 137: 537-41.
- Webb, L. X., Bosse, M. J., Castillo, R. C. and MacKenzie, E. J. (2007). Analysis of surgeon-controlled variables in the treatment of limb-threatening type-III open tibial diaphyseal fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 89: 923-8.
- Yoshinari, M., Oda, Y., Kato, T., Okuda, K. and Hirayama, A. (2000). Influence of surface modifications to titanium on oral bacteria adhesion in vitro. *The Journal of Biomedical Materials Research*, 52: 388-94.
- Zelle, B. A., Bhandari, M., Espiritu, M., Koval, K. J. and Zlowodzki, M. (2006). Treatment of distal tibia fractures without articular involvement: a systemic review of 1125 fractures. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 20: 76-9.

### **Referenties: Inzichten vanuit de Microbiologie**

- Bai, H., Sang, G., You, Y., Xue, X., Zhou, Y., Hou, Z., Meng, J. and Lou, X. (2012). Targeting RNA polymerase primary  $\sigma^{70}$  as a therapeutic strategy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antisense peptide nucleic acid. *PLoS ONE*. 7: 1-10
- Becker, P., Hufnagle, W., Peters, G. and Herrmann, M. (2001). Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-differential analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2958-2965
- Chatterjee, I., Neumayer, D. and Herrmann, M. (2010). Senescence of staphylococci: using functional genomics to unravel the roles of ClpC ATPase during late stationary phase. *International Journal of Medical Microbiology*. 300: 130-136
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 881-890

- Edwards, J. S., Betts, L., Frazier, M. L., Pollet, R. M., Kwong, S. M., Walton, W. G., Ballentine III, W. K., Huang, J. J., Habibi, S., Campo, M. D., Meier, J. L., Dervan, P. B., Firth, N. and Redinbo, M. R. (2012). Molecular basis of antibiotic multiresistance transfer in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110: 2804-2809
- Eyraud, A., Tattevin, P., Chabelskaya, S. and Felden, B. (2014). A small RNA controls a protein regulator involved in antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research*. 1-14
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K. and Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews: Microbiology*. 12: 49-62
- George, E. A., and Muir, T. W. (2007). Molecular mechanisms of agr quorum sensing in virulent staphylococci. *ChemBioChem*. 8: 847-855
- Hellmark, B., Söderquist, B., Unemo, M. and Nilsson-Engel, A. (2013). Comparison of *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections and commensal isolates in regard to antibiotic susceptibility, agr type, biofilm production, and epidemiology. *International Journal of Medical Microbiology*. 303: 32-39
- Josefsson, E., Hartford, O., O'Brien, L., Patti, J. M. and Foster, T. (2001). Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A: a novel virulence determinant. *Journal of Infectious Diseases*. 184: 1572–1580
- Khodaverdian, V., Pesho, M., Truitt, B., Bollinger, L., Patel, P., Nithianantham, S., Yu, G., Delaney, E., Jankowsky, E. and Shoham, M. (2013). Discovery of Antivirulence Agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57: 3645-3652
- Kwong, S. M., Skurray, R. A. and Firth, N. (2004). *Staphylococcus aureus* multiresistance plasmid pSK41: analysis of the replication origin, initiator protein binding and antisense RNA regulation. *Molecular Microbiology*. 51: 497-509
- Lin, L., Pantapalangkoor, P., Tan, B., Bruhn, K., Ho, T., Nielsen, T., Skaar, E. P., Zhang, Y., Bai, R., Wang, A., Doherty, T. M. and Spellberg, B. (2014). Transferrin iron starvation therapy for lethal bacterial and fungal infections. *Journal of Infectious Diseases*. 1-31
- Liu, M. A., Kwong, S. M., Jensen, S. O., Brzoska, A. J., Firth, N. (2013). Biology of the staphylococcal conjugative multiresistance plasmid pSK41. *Plasmid*. 70: 42-51

- Michalik, S., Liebeke, M., Zühlke, D., Lalk, M., Bernhardt, J., Gerth, U. and Hecker, M. (2009). Proteolysis during long-term glucose starvation in *Staphylococcus aureus* COL. *Proteomics*. 9: 4468-4477
- Molina-Manso, D., Prado, G. del, Ortiz-Pérez, A., Manrubia-Cobo, M., Gómez-Barrena, E., Cordero-Ampuero, J. and Esteban, J. (2013). *In vitro* susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 41: 521-523
- Otto, A., Dijk, J. M. van, Hecker, M and Becher, D. (2014). The *Staphylococcus aureus* proteome. *Journal of Medical Microbiology*. 1-11
- Peel, T. N., Cheng, A. C., Buising, K. L. and Choong, P. F. M. (2012). Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: Are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56: 2386-2391
- Pollitt, E. J. G., West, S. A., Crusz, S. A., Burton-Chellew, M. N. and Diggle, S. P. (2014). Cooperation, quorum sensing, and evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*. 82: 1045-1051
- Rohde, H., Frankenberger, S., Zähringer, U. and Mack, D. (2010). Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *European Journal of Cell Biology*. 89: 103-111
- Roux, A., Todd, D. A., Velázquez, J. V., Cech, N. B. and Sonenshein, A. L. (2013). CodY-mediated regulation of the *Staphylococcus aureus* agr system integrates nutritional and population density signals. *Journal of Bacteriology*. 196: 1184-1196
- Sibbald, M. J. J. B., Ziebandt, A. K., Engelmann, S., Hecker, M., Jong, A. de, Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., Stokroos, I., Arends, J. P., Dubois, J. Y. F. and Dijk, J. M. van (2006). Mapping the pathways to *Staphylococcal* pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70: 755-788
- Sendi, P. and Proctor, R. A. (2009). *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol*. 17: 54-58

Sinha, B., François, P. P., Nüße, O., Foti, M., Hartford, O. M., Vaudaux, P., Foster, T. J., Lew, D. P., Herrmann, M. and Krause, K. (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *Cellular Microbiology*. 1: 101–117

Tubby, S., Wilson, M., Wright, J. A., Zhang, P. and Nair, S. P. (2013). *Staphylococcus aureus* small colony variants are susceptible to light activated antimicrobial agents. *BMC Microbiology*. 13: 1-4

Yao, Y., Vuong, C., Kocianova, S., Villaruz, A. E., Lai, Y., Sturdevant, D. E. and Otto, M. (2006). Characterization of the *Staphylococcus epidermidis* accessory-gene regulator response: quorum-sensing regulation of resistance to human innate host defence. *Journal of Infectious Diseases*. 193: 841-848

#### **Referenties: Integraties van de disciplines**

Repko, A., F. (2012). *Interdisciplinary Research. Process and Theory*. Los Angeles: Sage.