

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie,
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. L. French

**Die problembehaftete Endoprothese:
Diagnostik zur Abgrenzung von
periprothetischem Infekt, Allergie und unspezifischer Entzündung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der
Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu
München

vorgelegt von

Benjamin Thomas

aus Augsburg

2019

**Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Thomas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Sandra Utzschneider
PD Dr. Christoph Reichel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Burkhard Summer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2019

„Ich habe keine besondere Begabung, sondern bin nur leidenschaftlich neugierig.“

- Albert Einstein -

In tiefer Dankbarkeit gewidmet
meinen lieben Eltern.

**Einleitende Zusammenfassung der schriftlichen,
kumulativen Dissertation**

gemäß § 4a der Promotionsordnung der LMU vom 1. Juni 1983 in der
konsolidierten Fassung der 11. Änderungssatzung vom 15. September 2016

Eidesstattliche Versicherung

Thomas, Benjamin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Die problembehaftete Endoprothese:
Diagnostik zur Abgrenzung von
periprothetischem Infekt, Allergie und unspezifischer Entzündung**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Mannheim, 21.05.2019

Ort, Datum

Benjamin Thomas

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Publikationsliste

Autoren	Titel	Jahr	Medium	Typ
<u>Thomas B.</u> , Kulichova B, Varga R, Summer B, Mahler V, Thomas P.	Knochenzementkomponenten und Knie-Endoprothetik- Unverträglichkeit: Hohe Gentamicinkontaktallergierate bei 250 beschwerdebehafteten KTEP-Patienten	2014	<i>Allergo Journal International</i>	Poster
<u>Thomas B.</u> , Kulichova B, Wolf R, Summer B, Mahler V, Thomas P.	High frequency of gentamicin allergy in cemented knee arthroplasty with complications: usefulness of late patch test reading for its detection.	2015	<i>Contact Dermatitis</i>	Originalarbeit
Thomas P, v d Helm C, Schopf C, Mazoochian F, Frommelt L, Gollwitzer H, Schneider J, Flaig M, Krenn V, <u>Thomas B.</u> , Summer B.	Patients with Intolerance Reactions to Total Knee Replacement: Combined Assessment of Allergy Diagnostics, Periprosthetic Histology, and Peri-implant Cytokine Expression Pattern.	2015	<i>BioMed Research International</i>	Originalarbeit
Banke I, Stade N, Prodinge P, Mühlhofer H, Thomas P, <u>Thomas B.</u> , Summer B, Griensven M, Eisenhart-Rothe R, Gollwitzer H.	Synoviale Biomarker für die Differenzialdiagnostik der schmerzhaften Endoprothese.	2015	<i>Orthopäde</i>	Originalarbeit
Benedikt M, <u>Thomas B.</u> , Hartmann D, Summer B, Thomas P	Gentamicin-haltiger Knochenzement und Knieendoprothetik-(KTEP-) Unverträglichkeit: Relevanz einer Gentamicin-Kontaktallergie	2015	<i>10. Dt. Allergie- kongress</i> <i>Köln (1.-3.10.15)</i>	Poster
<u>Thomas B.</u> , Banke I, Lausmann C, Prodinge P, Kendoff D, Gehrke T, Gollwitzer H, Frommelt L, Krenn V, Summer B, Thomas P	Charakteristika und Biomarker zur Abgrenzung von Metallimplantatallergie, Infekt und unspezifisch-anderweitiger Entzündung bei Verdacht auf Endoprothesenunverträglichkeit	2017	<i>10. Endo- prothetik- kongress</i> <i>Berlin (16.-18.2.17)</i>	Vortrag
Wittmann D, Summer B, <u>Thomas B.</u> , Halder A, Thomas P	Gentamicin allergy as unexpected "hidden" cause of complication in knee arthroplasty	2018	<i>Contact Dermatitis</i>	Fallbericht

Abkürzungsverzeichnis

Ag = Antigen

Ak = Antikörper

AL = aseptic loosening (Aseptische Lockerung)

AMV = Avian Myeloblastosis Virus

aROM = active range of motion (aktives Bewegungsausmaß)

BE = Blutentnahme

bspw. = beispielsweise

bzgl. = bezüglich

bzw. = beziehungsweise

Ca²⁺ = Calcium

CD = cluster of differentiation

cDNA = complementary DNA (komplementäre DNS)

CoCrMo = Kobalt-Chrom-Molybdän

D = Tag

DAMP = damage-associated molecular patterns (Gefahr-assoziierte molekulare Muster)

DDG = Deutsche Dermatologische Gesellschaft

DGAI = Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie

DKG = Deutsche Kontaktallergie-Gruppe

dL = Deziliter

DNA = deoxyribonucleic acid (DNS, Desoxyribonukleinsäure)

ECT = Epikutantest

EF1- α = eukaryotic translation elongation factor 1 alpha (Dehnungsfaktor 1-Alpha)

et al. = et alii

H-TEP = Hüft-TEP

Hist. = Histologie

IFN γ = Interferon Gamma

Ig = Immunglobulin

IL = Interleukin

ISO = International Organization for Standardization (Internationale Organisation für Normung)

i.d.R. = in der Regel

J. = Durchschnittsalter in Jahren

KMU = Kutane Metallunverträglichkeit
K-TEP = Knie-TEP
L = Liter
LPS = Lipopolysaccharid
LTF = Lactotransferrin
LTT = Lymphozytentransformationstest
Ly96 = Lymphozytenantigen 96
m = Prozentsatz männlicher Patienten
MD-2 = myeloides Differenzierungsprotein 2
MHC = Major Histocompatibility Complex (Hauptgewebeverträglichkeitskomplex)
MiBi = Mikrobiologie
µm = Mikrometer
mg = Milligramm
mL = Milliliter
Mol. = Molekularbiologie
n = Anzahl
neg. = negativ
NRG = Neuregulin
o.g. = oben genannt
PAMP = pathogen-associated molecular patterns (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBMC = peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
Periimpl. = periimplantär
Pg = Pikogramm
Pkt. = Synovialpunktion
pos. = positiv
postop = postoperativ
PPI = periprothetischer Infekt
PRR = pattern recognition receptor (Mustererkennungszepetor)
präop = präoperativ
Prof. = Professor
pROM = passive range of motion (passives Bewegungsausmaß)
RNA = ribonucleic acid (RNS, Ribonukleinsäure)

mRNA = messenger RNA (Boten-RNS)
Rkt. = Reaktion
RT-qPCR = real-time quantitative PCR (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
s. = siehe
Ser. = Serumzytokinanalyse
SID = Sepsis-induzierten-Immundefizienz
SIS = Sepsis-induzierten-Immunsuppression
SLIM = synovial-like interface membrane (periprothetische Neosynovialis)
sog. = sogenannt
Tab. = Tabelle
TEP = Totalendoprothese
TGF β = transforming growth factor beta (transformierender Wachstumsfaktor Beta)
TH₁ = T-Helfer-Zellen
THR = total hip replacement (Hüfttotalendoprothese)
TJR = total joint replacement (Totalendoprothese)
TKR = total knee replacement (Knieendoprothese)
TLR = toll-like receptor (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TNF α = Tumornekrosefaktor alpha
T_{reg} = regulatorische T-Zellen
u.a. = unter anderem
v.a. = vor allem
vgl. = vergleiche
vs. = versus
w = Prozentsatz weiblicher Patienten
WOMAC = Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index
z.B. = zum Beispiel
z.T. = zum Teil
+ = positiv
- = negativ

1	Einleitung	18
1.1	Begrifflichkeiten, Pathomechanismen und Definitionen	18
1.2	Epidemiologie und Inzidenz allergischer Erkrankungen	19
1.3	Potentielle Allergene in der Endoprothetik	20
1.4	Wechseloperationen und Endoprothesenrevisionen	21
1.5	Klinisches Erscheinungsbild der Implantatallergie	22
1.6	Diagnostik bei Verdacht auch Implantatallergie	23
2	Zielsetzung	25
2.1	Übergeordnete Fragestellung der Arbeit	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Knochenzementkomponenten und erweiterte Epikutantestung	27
3.2	Histologie und Molekularbiologie des periimplantären Gewebes	28
3.3	Synoviale Biomarker für die Differenzialdiagnostik des PPI	29
4	Zusammenfassung der Ergebnisse	30
4.1	Hohe Nickel- und Gentamicinkontaktallergieraten bei Spätablesung	30
4.2	Spezifische Histologie und Zytokinmuster bei Implantatallergie	32
4.3	Eignung antimikrobieller Peptide zur Diagnostik des PPI	36
4.4	Systemische Biomarker zur Abgrenzung von periprothetischem Infekt, Metallimplantatallergie und unspezifischer Entzündung	38
4.4.1	<i>Neue periimplantäre und systemische Marker der Metallimplantatallergie</i>	40
4.4.2	<i>Neue zirkulierende systemische Biomarker des periprothetischen Infekts</i>	43
4.5	Eigenleistung des Doktoranden	48
5	Synopsis of results	49
5.1	Importance of late patch test reading in contact allergy	49
5.2	Specific cytokine patterns in metal allergic patients	50
5.3	Antimicrobial peptides and other biomarkers for diagnosis of PPI	51
6	Literaturverzeichnis	53
7	Veröffentlichung I	58
8	Veröffentlichung II	66
9	Lebenslauf	76

1 Einleitung

1.1 Begrifflichkeiten, Pathomechanismen und Definitionen

Allergien und Unverträglichkeiten werden im laienhaften Umgang häufig synonym verwendet, beschreiben jedoch zwei unterschiedliche Pathologien, die je nach Ausprägungsgrad einen objektivierbaren Krankheitswert erreichen und einen mitunter nicht unerheblichen Leidensdruck für die Betroffenen bedeuten können. Der Begriff Unverträglichkeit, oder „Intoleranz“ (aus dem Lateinischen *tolerare* „aushalten“, „ertragen“), wird im Allgemeinen als unspezifischer Überbegriff für mannigfaltige Beschwerden unterschiedlichster Ursache gegenüber (Fremd-) Materialien verwendet.¹ Dies umfasst strukturelle, funktionelle, toxische und nicht-toxische Ursachen, wie bspw. Stoffwechseldefekte aufgrund von Enzymmängeln oder -defekten.² Der Begriff „Allergie“ (aus dem Altgriechischen *állos* „andersartig“, *érgon* „Reaktion“) wurde 1906 durch den Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet eingeführt und bezeichnet im Gegensatz dazu eine spezifische Veränderung der endogenen Reaktivität des Organismus auf exogene Substanzen, sogenannte „Allergene“.³ Unser heutiges Verständnis von Allergie umfasst eine sehr viel engere Definition und beschreibt eine reproduzierbare überschießende Reaktion des körpereigenen Immunsystems auf eigentlich ungefährliche körperfremde Stoffe. Bei dieser Überempfindlichkeit kommt es während eines symptomfreien Erstkontakts zur Sensibilisierung gegenüber dem allergieauslösenden Antigen, das als schädlich fehlgedeutet wird.¹ In dieser Fehlregulation begründet sich bei erneutem oder verlängerten Antigenkontakt die krankhafte Reaktivität, deren Symptome wir als „allergische Reaktion“ beobachten können. Den zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen Rechnung tragend, unterschieden Coombs und Gell 4 verschiedene Typen der allergischen Reaktionen (s. Tab. 1):⁴

Allergietyp	Pathomechanismus	Beispielkrankung
I. Sofort-Typ (humoral)	IgE-Ak → sofortige Freisetzung vasoaktiver Mediatoren durch aktivierte Mastzellen	Allergisches Asthma, Anaphylaxie
II. Antikörper-Typ (humoral)	IgG/M-Ak → Opsonierung von Zielstrukturen, Aktivierung von Komplementsystem (Lyse) oder Immunzellen (Phagozytose)	Autoimmunhämolytische Anämie
III. Immunkomplex-Typ (humoral)	Ag-Ak-Komplexe → Komplementaktivierung und Leukozytenrekrutierung	Systemischer Lupus erythematodes, Arthus-Rkt.
IV. Zellulär-Typ (zellulär)	Aktivierte T-Lymphozyten → T-Zell-vermittelte Zytotoxizität	Allergische Kontaktdermatitis

Tabelle 1: Die 4 Allergietypen nach Coombs und Gell (Ak = Antikörper, Ag = Antigen, Rkt. = Reaktion; modifiziert nach Kumar V, et al. 2014)⁵

Diese Klassifikation ist nach Erweiterungen bis heute gültig und unterscheidet anhand zweier übergeordneter Pathomechanismen vier Gruppen von allergischen Reaktionen. Beispiele der Antikörper-vermittelten Typen I-III sind die allergische Rhinokonjunktivitis und das allergische Asthma, viele Arzneimittelallergien und die Serumkrankheit. Die T-Zell-vermittelte Typ IV-Reaktion dagegen, aufgrund ihres zeitlichen Verlaufs auch Spät-Typ-Reaktion genannt, umfasst die große Gruppe der Kontaktallergien, z.B. das allergische Kontaktekzem. Spricht man allerdings von „Allergie“, so sind damit im Allgemeinen die IgE-vermittelten Soforttypreaktionen (Typ I) oder T-zellulären Spättypreaktionen vom Ekzemytyp gemeint

1.2 Epidemiologie und Inzidenz allergischer Erkrankungen

Epidemiologische Studien zum Auftreten von Allergien, u.a. auch aus Deutschland, zeigen, dass Frauen oft häufiger betroffen sind als Männer und jüngere Menschen häufiger als ältere. Verallgemeinernd korrelieren darüber hinaus ein hoher sozioökonomischer Status und das Leben in Ballungsräumen mit der Allergieprävalenz, die sich über das vergangene Jahrzehnt jedoch insgesamt leicht fallend von 32,7% auf 28,7% bewegte.⁶ Dabei sind Kontaktallergien, die sich überwiegend in Form von Ekzemen äußern, weit verbreitet und weisen hohe Prävalenzraten in der Allgemeinbevölkerung auf. Metalle wie Nickel, Kobalt und Chrom gehören zu den häufigsten Kontaktallergenen. Vor allem gegen Nickel sind 13% der Gesamtbevölkerung sensibilisiert (s. Tab. 2).⁷⁻⁹ Metall- und Allergenkontakt besteht sowohl über alltägliche Gebrauchsgegenstände als auch über Medizinprodukte wie Metallimplantate. Am häufigsten betroffen sind die Bereiche der Dentalimplantologie,^{10,11} sowie Unfallchirurgie (Osteosynthesen) und Orthopädie (Gelenkersatz).^{12,13} Das Sensibilisierungsrisiko und die Symptomatik bei erneutem Hautkontakt sind bspw. für Modeschmuck viel beforscht und haben u.a. zur europäischen Nickeldirektive als Initiative zur Risikominimierung geführt. Für Metallimplantate hingegen bleibt vieles jedoch noch gänzlich unklar.

Tabelle 2: Metallkontaktallergieraten in der Allgemeinbevölkerung der Bundesrepublik Deutschland (modifiziert nach Schäfer T, et al. 2001)⁸

Kontaktallergen	Reaktionshäufigkeit (%)		
	Gesamt	♂	♀
Nickel(II)Sulfat	13,1%	5,8%	20,4%
Kobalt(II)Chlorid	2,4%	1,4%	3,4%
Kaliumdichromat	1,1%	0,7%	1,5%

1.3 Potentielle Allergene in der Endoprothetik

Je nach Quelle werden in Deutschland derzeit pro Kalenderjahr zwischen 385.000 und 413.000 primäre Endoprothesenimplantationen durchgeführt, wovon etwa 42% Hüft- und 34% Knie-Totalendoprothesen sind.^{14,15} Durch stetige Weiterentwicklung der eingesetzten Materialien und verwendeten Endoprothesentypen ist die Zahl der implantierten Metall-Metall-Paarungen, die einen höheren Partikelabrieb und damit höhere Allergenexposition bedingen,^{16,17} stark zurück gegangen. Sie liegt bei Hüft-Totalendoprothesen (H-TEP) aktuell bei unter 0,1% und kommt bei Knie-Totalendoprothesen (K-TEP) nicht mehr zum Einsatz.¹⁴ Ebenso haben einige Hersteller bereits Implantatkomponenten auf den Markt gebracht, die geringere Mengen an oder z.T. gar keine allergenen Metalle mehr enthalten und in ersten Untersuchungen keine mechanische Unterlegenheit gegenüber den herkömmlichen Produkten zeigen.^{18,19} Gerade bei Knie-Prothesen bestehen die femorale und tibiale Komponente jedoch noch immer klassischerweise aus Kobalt-Chrom-(CoCr)-Legierungen, die bis zu 30% Chrom, bis zu 7% Molybdän und bis zu 1% Nickel enthalten (s. Tab. 3). Auch hier kann durch eine entsprechende Oberflächenbeschichtung die Metallionenfreisetzung deutlich reduziert werden.

CoCrMo-Legierung (gemäß ISO 5832: Implants for surgery)	
Element	Gewichtsanteil (%)
Nickel	1,0 max
Chrom	26,0-30,0
Molybdän	5,0-7,0
Eisen	0,75 max
Mangan	1,0 max
Silikon	1,0 max
Kohlenstoff	0,35 max
Stickstoff	0,25 max
Kobalt	Rest

Tabelle 3: Zusammensetzung von Kobalt-Chrom-Molybdän-(CoCrMo)-Legierungen gemäß International Organisation for Standardization Norm 5832 (ISO 5832:2016 Implants for surgery)

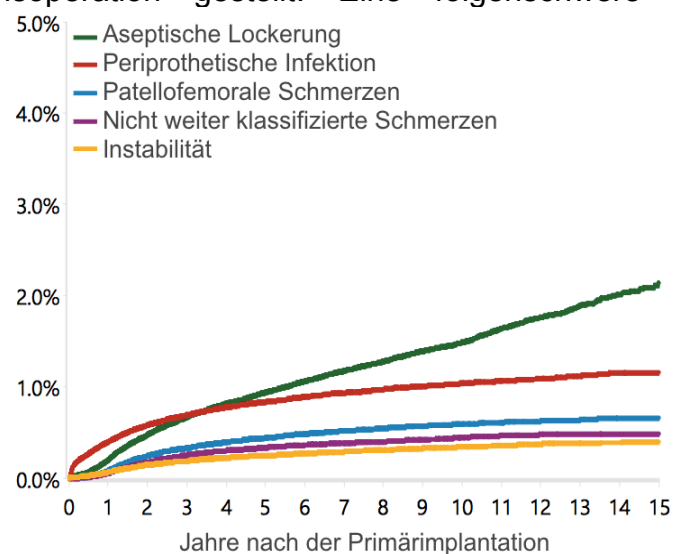
Zwischen beiden Metallkomponenten befindet sich ein sogenanntes „Inlay“ aus Polyethylen. Darüber hinaus kommen bei zementierten TEPs Knochenzemente zum Einsatz, die alle auf Polymermethacrylaten basieren, denen Initiatoren für die Polymerisationsreaktion beigemischt werden (bspw. Benzoylperoxid). Des weiteren sind Röntgenkontrastmittel, Stabilisatoren, Farbstoffe und meist auch Antibiotika enthalten (s. Tab. 4) – Stoffe, die, allen voran die verwendeten Antibiotika, ebenso als potentielle Allergene beschrieben sind.

Pulverinhaltsstoffe		Flüssigkeitsinhaltsstoffe	
Polymer:	Polymethylmethacrylat	Monomer:	Methylmethacrylat, Butylmethacrylat
Initiator:	Benzoylperoxid	Aktivator:	DmpT (N,N-Dimethyl-p-Toluidin), DMAPE (2-[4-(N,N-Dimethyl-amino) phenyl] ethanol)
Röntgenkontrastmittel:	Zirkoniumdioxid, Bariumsulfat	Inhibitor:	Hydrochinon
Antibiotikum:	Genta-, Clinda-, Tobra- oder Erythromycin		

Tabelle 4: Knochenzementbestandteile (modifiziert nach Breusch SJ, et al. 2003)²⁰

1.4 Wechseloperationen und Endoprothesenrevisionen

Totalendoprothesen sind sowohl effizient als auch kostengünstig und stellen zweifelsohne die erfolgreichste Therapieoption bei fortgeschrittener Gon- oder Coxarthrose dar.²¹ Allerdings bleiben die Versagensraten bei beiden Operationsmethoden hoch. So sind insbesondere bei K-TEPs bis zu 6% aller Implantationen Revisionsoperationen und es bleiben bis zu 20% der Patienten mit dem Ergebnis ihrer endoprothetischen Versorgung langfristig unzufrieden.^{22,23} Dabei herrscht Uneinigkeit darüber was ein Prothesenversagen ausmacht und wie dieses definiert sein sollte. So sind Schmerzpersistenz oder gar -zunahme, sowie ausbleibende Verbesserung oder gar Verschlechterung der aktiven und passiven Bewegungsausmaße (active und passive range of motion, aROM und pROM) häufige Probleme. Bei etwa einem Viertel aller beschwerdebehafteten TEPs wird im Verlauf die Indikation zur Revisionsoperation gestellt. Eine folgenschwere Entscheidung, die sowohl für den Patienten äußerst belastend, als auch für das Gesundheitssystem finanziell schwerwiegend ist. Dabei stellen periprothetische Infektionen (PPIs) den häufigsten Grund für frühe Wechsel innerhalb der ersten zwei Jahre nach Primärimplantation dar und aseptische Lockerungen überwiegen bei Spätrevisionen (s. Graph 1).²⁴



Graph 1: Kumulative Inzidenz von Revisionsindikationen für K-TEPs (modifiziert nach Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry, Annual Report 2016)²⁵

Auffällig bleibt dabei, dass ein nicht unerheblicher Anteil der Revisionen aufgrund von Beschwerdepersistenz nach Ausschluss der häufigsten Differentialdiagnosen (infektiöses Geschehen, Malpositionen oder andere mechanische Ursachen) ohne präoperativ eindeutige identifizierte Auslöser durchgeführt wird (s. Graph 2).

Periprothetische Infektion	19,3 %	73 J.	m48 / 52w
Aseptische Lockerung	34,5 %	71 J.	m38 / 62w
Periprothetische Fraktur	3,6 %	77 J.	m22 / 78w
Bandinstabilitäten	9,4 %	69 J.	m27 / 73w
Implantatverschleiß	6,8 %	71 J.	m34 / 66w
Versagen einer Komponente	2,3 %	71 J.	m39 / 61w
Malposition	2,5 %	69 J.	m35 / 65w
Bewegungseinschränkungen	3,8 %	64 J.	m43 / 57w
Progressive Gonarthrose	2,9 %	67 J.	m40 / 60w
Andere Gründe	10,3 %	71 J.	m39 / 61w

Graph 2: Prozentuale Anteile der Revisionsgründe bei Kniewechseloperationen in Deutschland 2015 (J. = Durchschnittsalter, m = Prozentsatz männlicher Patienten, w = Prozentsatz weiblicher Patienten; modifiziert nach Grimberg A, et al. 2015)¹⁴

Als ursächlich für das Therapieversagen werden hier u.a. „adverse Reaktionen gegenüber Metallimplantaten“ diskutiert.²⁶ Diese umfassen sowohl unspezifische Reaktionen, wie bspw. toxische Wirkungen von Abriebpartikeln, als auch spezifische Hypersensitivitätsreaktionen gegenüber den enthaltenen Allergenen.

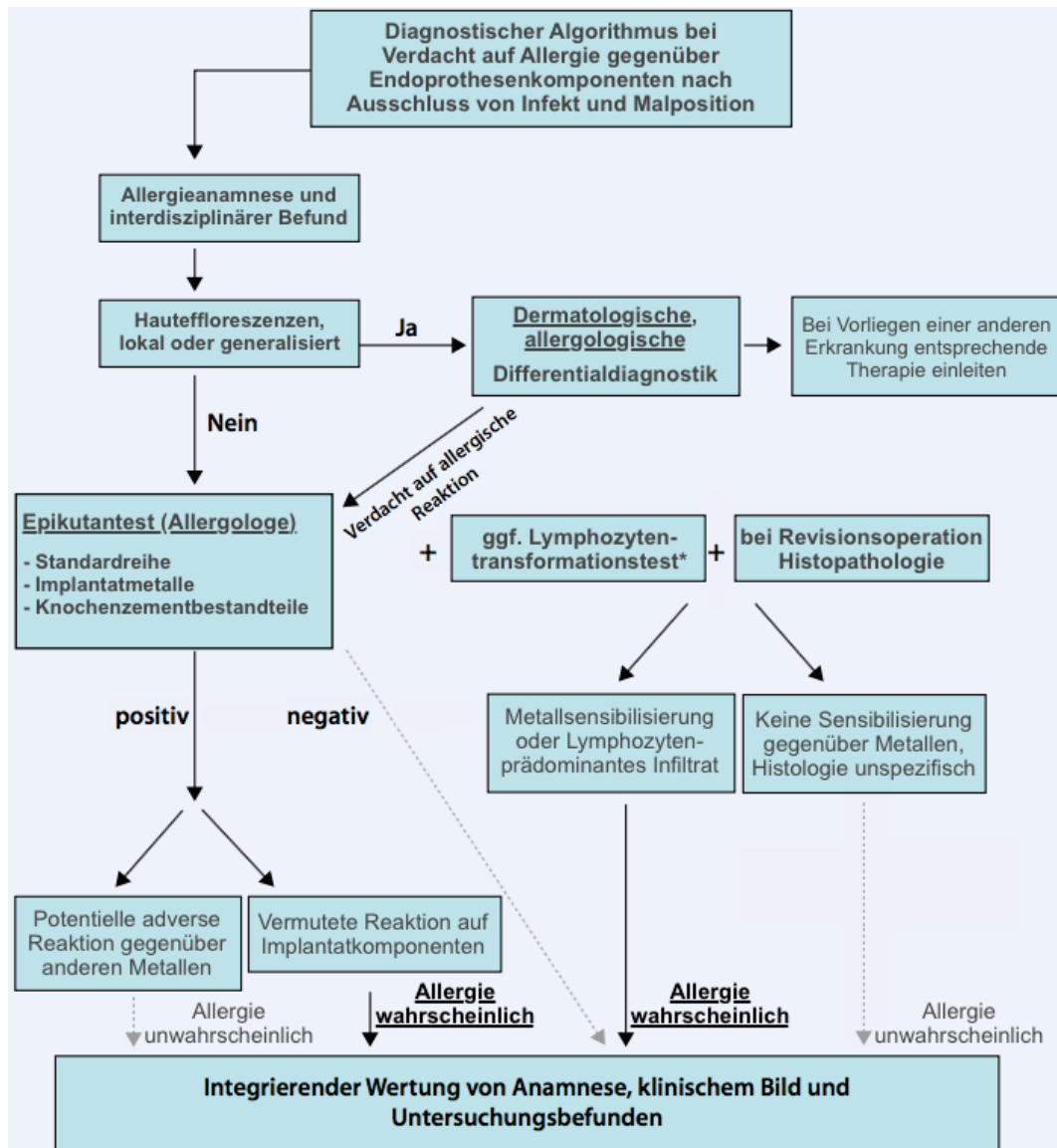
1.5 Klinisches Erscheinungsbild der Implantatallergie

Den hohen Raten an Kontaktallergien gegenüber Metallen in der Allgemeinbevölkerung entsprechend, gaben 14% der Patienten vor geplanter K-TEP bei einer präoperativen Befragung durch Bloemke et al. eine bekannte Metallallergie an.²⁷ Dass Metalle nicht nur durch Kontakt mit der Hautoberfläche, sondern auch nach Implantation zu symptomatischen Hypersensitivitätsreaktionen führen können, ist bereits seit einem halben Jahrhundert bekannt.²⁸⁻³⁰ Verschiedene Autoren berichteten u.a. über Instabilitäten, Lockerungen, chronische Schmerzen und

therapieresistente Bewegungseinschränkungen nach TEP-Implantationen bei Metallallergikern, z.T. in Kombination mit lokaler oder generalisierter Dermatitis, wobei sich die Symptome nach Wechsel auf allergenfreie Implantatkomponenten i.d.R. zurückbildeten.³¹⁻³³ Dabei scheint bei adversen Reaktionen gegenüber TEPs ein Zusammenhang zwischen weiteren charakteristischen Befunde wie periprothetischen Osteolysen und Implantatlockerungen, einer T-Lymphozyten-dominierten Synovialitis, auffällig hohen periprothetische Konzentrationen an metallenen Abriebpartikeln, sowie erhöhten Metallionenspiegeln im peripheren Blut vorzuliegen.³⁴⁻⁴² Ebenso zeigen Gewebeproben von Endoprothesenrevisionen ein charakteristisches Muster. So kann das histopathologische Erscheinungsbild des entnommenen periprothetischen Gewebes basierend auf einer 2006 erstmals vorgestellten und 2014 überarbeiteten Klassifikation des Reaktionsmusters des implantatnahen Bindegewebes in 4 Typen eingeteilt werden: Diese sogenannte „periprothetische Membran“ bezeichnet dabei eine zwischen Knochen und Prothesenkomponenten neu entstandene Bindegewebsschicht einschließlich der Neosynovialis, die anhand definierter Parameter einen Rückschluss auf den Grund eines Implantatversagens zulässt. Lymphozytenreiche Infiltrate, Nekrosen, Abriebpartikel und Fremdkörperreaktionen wie Granulome oder Riesenzellen lassen dabei auf eine adverse Gewebereaktion schließen.^{43,44}

1.6 Diagnostik bei Verdacht auch Implantatallergie

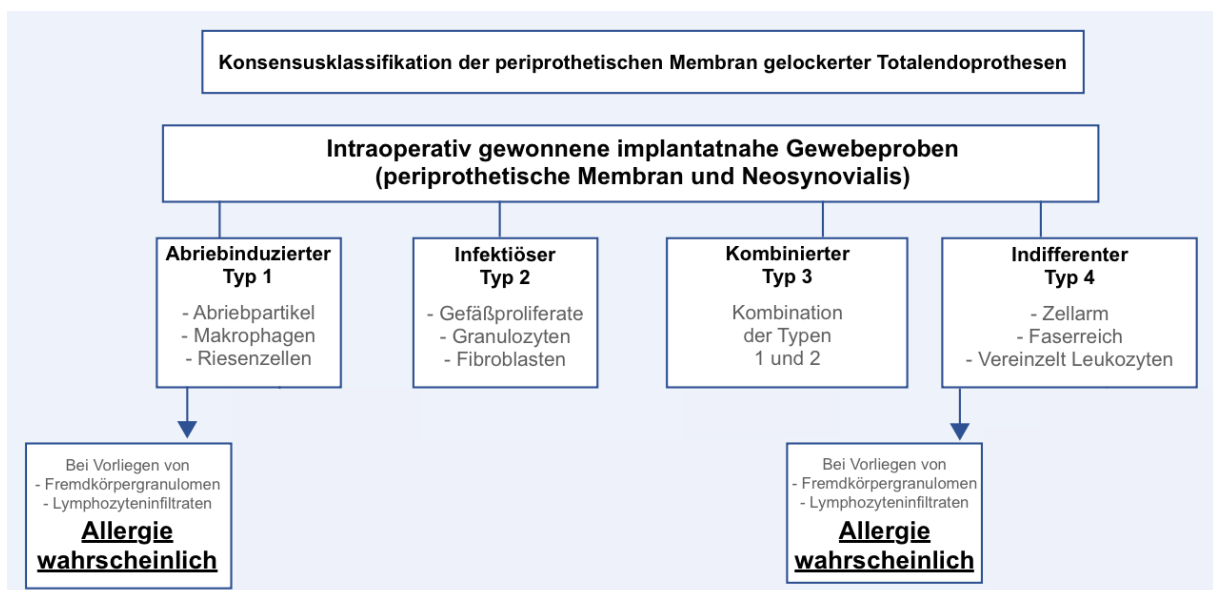
Da auch nach Ausschluss häufiger Auslöser der beschwerdebehafteten TEP, wie infektiöser oder mechanischer Ursachen, eine Allergie gegenüber Implantatkomponenten präoperativ nur schwer nachzuweisen ist, wurde bereits 2013 folgender diagnostischer Algorithmus vorgeschlagen:



Graph 3: Diagnostischer Algorithmus bei Verdacht auf Implantatallergie (* klinische Relevanz des Lymphozytentransformationstests nicht endgültig geklärt; modifiziert nach Thomas P, et al. 2013)⁴⁵

Jeder apparativen oder Labordiagnostik sollte eine lückenlose Anamnese mit besonderem Augenmerk auf vom Patienten berichtete kutane Metallunverträglichkeiten (KMU), sowie eine umfassende körperliche Untersuchung vorausgehen. Der klassische Test bei begründetem Verdacht auf T-Zell vermittelte Spät-Typ-Überempfindlichkeit stellt dann der Epikutantest (ECT) dar. Dabei werden potentielle Allergene in standardisierten Konzentrationen appliziert und die resultierenden Hautreaktionen an bestimmten Zeitpunkten abgelesen und quantifiziert (in Deutschland i.d.R. nach 48 und 72 Stunden). So lässt sich anhand der erhobenen Ergebnisse auf eine Kontaktallergie gegenüber der jeweiligen Testsubstanz schließen. Die Standardreihe der ECT umfasst dabei u.a. die Metalle

Nickel, Chrom und Kobalt. Eine international standardisierte Knochenzement-Testreihe ist bislang zwar noch nicht etabliert, allerdings können standardisierte Acrylate und Additiva aus bereits bestehenden Testreihen zu Dentalwerkstoffen übernommen werden. So enthält die an der Münchner Universitätshautklinik etablierte Testreihe u.a. Gentamicinsulfat und Benzoylperoxid. Ergänzend kann im Anschluss noch eine systemische Sensibilisierung mithilfe des Lymphozytentransformationstests (LTT) nachgewiesen werden. Dabei werden aus peripherem Blut des Patienten isolierte T-Lymphozyten durch *in vitro* Allergen-Zugabe stimuliert und die resultierende Proliferation quantifiziert. Beim LTT handelt es sich um eine bisher rein wissenschaftliche und klinisch unzureichend evaluierte Methode, die daher nur ergänzend zur Zusammenschau von Klinik und ECT beurteilt werden. Die klinische Relevanz bleibt v.a. aufgrund mangelnder Standardisierung häufig fraglich.^{46,47} Im Falle einer Wechseloperation sollte periimplantäres Gewebe gewonnen und entsprechend der o.g. Konsensusklassifikation von Krenn und Morawietz beurteilt werden.



Graph 4: Histopathologische Konsensusklassifikation der periprothetischen Membran gelockerter oder problembehafteter TEPs (modifiziert nach Krenn V, et al. 2014)⁴⁴

2 Zielsetzung

Obwohl Empfehlungen in Form eines diagnostischen Stufenschemas bei Verdacht auf Implantatunverträglichkeiten bestehen, existiert noch kein einheitlicher Konsensus und das Vorgehen bleibt im klinischen Alltag sehr uneinheitlich. In einer repräsentativen 2017 veröffentlichten Studie gaben lediglich 11% der befragten

Orthopäden an regelmäßig eine allergologische Anamnese zu erheben oder ihre Patienten präoperativ auf Metallunverträglichkeiten zu screenen. Ebenso wurden beschwerdebehaftete TEP-Träger nur von der Hälfte der behandelnden Ärzte zur ECT-basierten Allergiediagnostik überwiesen. Die Autoren um Hallock et al. folgerten schließlich, dass in der Praxis kein interdisziplinärer Konsensus bzgl. prä- und postoperativer Allergiediagnostik herrsche und forderten sowohl einen intensiven Dialog zwischen Orthopäden und Allergologen, als auch weitere klinische Studien um die Wertigkeit diagnostischer Tests zu validieren.⁴⁸

2.1 Übergeordnete Fragestellung der Arbeit

In dieser Forderung spiegelt sich das Ziel dieser Arbeit wider, deren übergeordnete Fragestellung sich in drei Teilaspekte unterteilen lässt:

Fragestellung und Zielsetzung	Resultierende Publikation	Art und Jahr
Evaluation der etablierten diagnostischen Tests und Validierung von Verbesserungsansätzen zur Erhöhung der Sensitivität im klinischen Alltag	Knochenzementkomponenten und Knie-Endoprothetik-Unverträglichkeit: Hohe Gentamicinkontaktallergie bei 250 beschwerdebehafteten KTEP-Patienten	Posterpräsentation 2014
	High frequency of gentamicin allergy in cemented knee arthroplasty with complications: usefulness of late patch test reading for its detection.	Originalarbeit 2015
Identifikation molekularbiologischer Muster im periimplantären Gewebe in Zusammenschau mit klinischer Beschwerdehaftigkeit und dermatologischer Allergiediagnostik	Patients with Intolerance Reactions to Total Knee Replacement: Combined Assessment of Allergy Diagnostics, Periprosthetic Histology, and Peri-implant Cytokine Expression Pattern.	Originalarbeit 2015
Identifikation von synovialen Biomarkern zur Verbesserung der differentialdiagnostischen Abgrenzung zwischen Metallallergie und periprothetischer Infektion	Synoviale Biomarker für die Differenzialdiagnostik der schmerzhaften Endoprothese.	Originalarbeit 2015
	Charakteristika und Biomarker zur Abgrenzung von Metallimplantatallergie, Infekt und unspezifisch-anderweitiger Entzündung bei Verdacht auf Endoprothesenunverträglichkeit	Kongressvortrag 2017

Die zugrundeliegenden Originalarbeiten sollen im Folgenden dargestellt und der Beitrag des Doktoranden zu den verfassten Fachartikeln erläutert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Knochenzementkomponenten und erweiterte Epikutantestung

In der retrospektiven Studie „High frequency of gentamicin allergy in cemented knee arthroplasty with complications: usefulness of late patch test reading for its detection“ wurde eine konsekutive Datenreihe von symptomatischen Patienten mit Zustand nach Implantation zementierter CoCrMo-basierter K- oder H-TEPs und Verdacht auf Implantatkomponentenunverträglichkeit analysiert. Es wurden 250 Personen eingeschlossen, die zwischen August 2010 und September 2013 im Rahmen der Implantatallergiesprechstunde in der Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie des Klinikums der Universität München untersucht worden waren. Die standardmäßige Datenerhebung umfasste zum Einen die klinisch-allergologische Diagnostik mit Fragebogen-gestützter Anamnese (hauseigener allergiespezifischer Fragebogen, Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis [WOMAC] Questionnaire, Operationsdokumentation, Implantatpass, Allergiepass, klinische Untersuchung, ECT) und zum Anderen die labordiagnostische Analytik mittels LTT. Der leitliniengerecht durchgeführte ECT enthielt die von der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) über ihre „Deutsche Kontaktallergie-Gruppe (DKG)“ und der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI) geforderte Standard- (enthält unter anderem Nickel, Chrom, Kobalt), sowie eine zusätzliche, erstmals in dieser Zusammensetzung anhand standardisierter Testpräparate etablierte, Knochenzementreihe. Diese enthält neben Acrylaten u.a. Additiva wie Gentamicinsulfat, Neomycinsulfat und Benzoylperoxid. Die Ablesung erfolgte dabei nicht nur an den in den deutschen Leitlinien verankerten Tagen 2 und 3 (nach 48 und 72 Stunden), sondern darüber hinaus auch an Tag 6 (nach 144 Stunden), nachdem vereinzelte internationale Publikationen auf höhere Allergiedetektionsraten durch späte Zusatzablesungen hingewiesen hatten. Mit Frau Prof. V. Mahler konnte für die Durchführung der Studie die Vorsitzende der DKG als Kooperationspartnerin gewonnen werden. Vor Beginn der Studie wurde die Genehmigung der lokalen Ethikkommission der Ludwig-Maximilian-Universität München eingeholt und alle Patienten gaben schriftlich ihre Einwilligung zur Verwendung der erhobenen Daten.

3.2 Histologie und Molekularbiologie des periimplantären Gewebes

Im Rahmen der experimentellen Originalarbeit „Patients with Intolerance Reactions to Total Knee Replacement: Combined Assessment of Allergy Diagnostics, Periprosthetic Histology, and Peri-implant Cytokine Expression Pattern“ erfolgte eine umfassende und integrierende Charakterisierung von allergiediagnostisch erhobener Daten und histopathologischer Untersuchungsergebnisse, sowie molekularbiologischer Analysen dreier Kollektive. Hierbei handelte es sich um Indexpatienten (symptomatische KTEP-Träger mit Verdacht auf Implantatunverträglichkeit nach erfolgter Indikationsstellung zur chirurgischen Prothesenerevision), eine negative Kontrollgruppe (symptomatische Gonarthrotiker nach erfolgter Indikationsstellung zum chirurgischen Gelenkersatz) und eine positive Kontrollgruppe (Individuen mit positiven Diagnosekriterien für eine Metallallergie ohne TEP). Insgesamt wurden 43 Patienten eingeschlossen, wovon 25 Indexpatienten waren und 18 entweder der negativen (n = 12) oder positiven (n= 6) Kontrollgruppe angehörten. Basierend auf den Ergebnissen der im Rahmen unserer Implantatallergiesprechstunde durchgeführten Diagnostik mittels ECT und LTT konnten darüber hinaus folgende Subgruppen der Indexpatienten definiert werden: allergische Indexpatienten (ECT+), sensibilisierte Indexpatienten (ECT- und LTT+), symptomatische Indexpatienten (ECT- und LTT-). Es erfolgte wiederum die unter 3.1 dargelegte klinisch-allergologische Diagnostik sowie labordiagnostische Analytik. Des weiteren erfolgten Probenentnahmen zur mikrobiologischen Untersuchung (MiBi), histopathologischen Klassifizierung und molekularbiologischen Analyse. Hierbei erfolgte die Entnahme entweder im Rahmen der Revisionsoperation aus der periprosthetischen Membran der Indexpatienten bzw. der entzündlich veränderten Synovialis der Gonarthrotiker im Rahmen der Primärimplantation, oder am letzten Tag der Ablesung als Stanzbiopsie aus dem reaktiven Epikutantestgewebe im Metalltestfeld der positiven Kontrollen. Je eine Probe wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, in 5 bis 10 µm Schichtdicke geschnitten, mittels Haematoxylin und Eosin gegengefärbt, sowie mittels einer Reihe von Antikörpern immunhistochemisch analysiert (anti-CD3 zur T-Zelldetektion, anti-CD20 zur B-Zelldetektion, anti-CD68 zur Makrophagendetektion und anti-CD15 zur Neutrophilendetektion) und nach Krenn und Morawietz klassifiziert.⁴⁴ Je eine weitere Probe wurde in RNAlater™ überführt, die enthaltene RNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und mittels Avian Myeloblastosis Virus (AMV) Reverse

Transkriptase in cDNA umgeschrieben, sowie die Genexpression relevanter Zytokine (IFN γ , TNF α , IL1- β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL17, und TGF β) in Relation zum Haushaltsgen EF1- α anhand der semiquantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) bestimmt. Zusammenfassend sollte diese Studie zeigen, inwiefern sich das periimplantäre Gewebe beschwerdebehafteter, infektfreier und metallallergischen K-TEP-Träger im Vergleich mit verschiedenen Kontrollgruppen histomorphologisch und molekularbiologisch charakterisieren lässt. Schließlich war von den betreuenden Orthopäden für die Revision bei metallallergischen Patienten ein Wechsel auf sog. „hypoallergene“ Implantate angedacht (bspw. beschichtete Prothesen). Zur Untersuchung dieser Fragestellung konnten wir Herrn Prof. V. Krenn, Referenzpathologe der orthopädischen Fachgesellschaft, als Kooperationspartner gewinnen. Vor Beginn der Studie wurde ebenfalls die Genehmigung der lokalen Ethikkommission der Ludwig-Maximilian-Universität München eingeholt und alle Patienten gaben schriftlich ihre Einwilligung zur Verwendung der erhobenen Daten.

3.3 Synoviale Biomarker für die Differenzialdiagnostik des PPI

Für das der Übersichtsarbeit „Synoviale Biomarker für die Differenzialdiagnostik der schmerzhaften Endoprothese“ zugrundeliegenden Kollektiv wurden 11 Patienten mit Verdacht auf sog. „low-grade“ PPI am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München zwischen Januar und März 2016 rekrutiert. Einschlusskriterien waren dabei ein Patientenalter >18 Jahren, die stattgehabte KTEP-Implantation aufgrund primärer oder sekundärer Gonarthrose, persistierende Beschwerden nach Ausschluss biomechanischer Gründe, eine unauffällige Anamnese bzgl. etwaiger Metallunverträglichkeiten, Mündigkeit und Einwilligung. Es musste eine oder mehrere Beschwerden wie Bewegungsschmerzen, Bewegungseinschränkungen, Knieschwellung, Gelenkerguss, lokale Überwärmung oder Rötung vorliegen. Ausschlusskriterien waren zudem vorbekannte Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und fulminante putride Infekte. Durch unsere Arbeitsgruppe erfolgte abermals die unter 3.1 dargelegte klinisch-allergologische Diagnostik sowie labordiagnostische Analytik. Zudem wurde durch Gelenkpunktionen Synovialflüssigkeit aller Patienten gewonnen und die Konzentration relevanter Zytokine mittels synovialen Multiplex-Assay bestimmt (IL-4, IL-8, IL-17A, IL-6, IL1- β , IL-10, IL-5, IFN γ , TNF α). Zusammenfassend sollte mit dieser Übersichtsarbeit der

aktuelle Wissensstand bzgl. mikrobieller Biomarker aufgezeigt werden und Daten einer ersten Patientenserie neue Untersuchungsansätze aufzeigen. Letztere sollten in die ab 4.4 beschriebene Studie einfließen, deren Veröffentlichung derzeit vorbereitet wird. Vor Beginn der Studie wurden die Genehmigungen der lokalen Ethikkommission der Ludwig-Maximilian-Universität München und der Technischen Universität München eingeholt und alle Patienten gaben schriftlich ihre Einwilligung zur Verwendung der erhobenen Daten.

4 Zusammenfassung der Ergebnisse

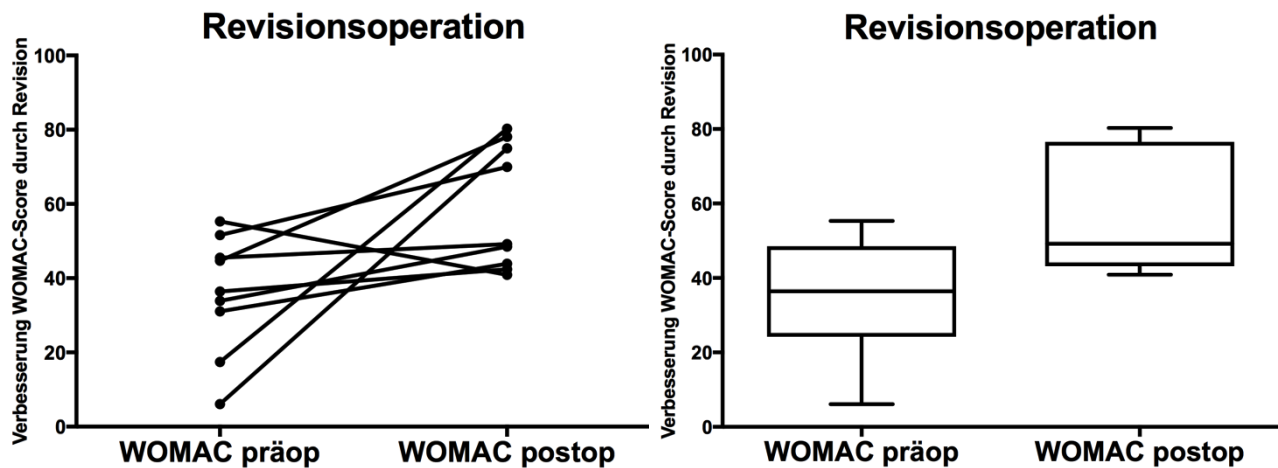
4.1 Hohe Nickel- und Gentamicinkontaktallergieraten bei Spätablesung

Das mittlere Alter der eingeschlossenen Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung betrug 65 Jahre (37 bis 84 Jahre). 164 Patienten bzw. 66% waren weiblich, 86 bzw. 34% männlich. Von 250 beschwerdebehafteten TEPs waren 189 Knie- (76%) und 61 Hüft-TEPs (24%), davon 191 (76%) Primärimplantationen. In 59 Fällen (24%) war bereits eine Prothesenrevision durchgeführt worden, allerdings ohne klinische Beschwerdebesserung. Alle rekrutierten Patienten hatten zementierte CoCrMo-basierte Prothesen. In 138 Fällen (55%) zeigten sich Kontaktallergien im Sinne positiver Ablesungsergebnisse, davon bei 73 Patienten 1 positive Reaktion, bei 31 Patienten 2 Reaktionen, bei 17 Patienten 3 Reaktionen und bei weiteren 17 Patienten 4 oder mehr Reaktionen. Für die im Rahmen der Implantatunverträglichkeit relevanten Allergene Nickel, Kobalt, Chrom und Gentamicin zeigten sich nach Beendigung der Ablesungen Kontaktallergieraten von 32/250 (13%), 5/250 (2%), 4/250 (2%) und 25/250 (10%). Bemerkenswert ist, dass für diese Allergene 11/32 (34%), 1/5 (20%), 2/4 (50%) und 17/25 (68%) positive Ergebnisse erst durch die Spätablesung an Tag 6 aufgedeckt wurden (s. Tab. 5).

Allergen	pos. an D2	pos. an D3	pos. an D6	Anzahl pos. Ablesungen	Spät positive Ablesungen nur an D6	
					n	%
Nickel(II)Sulfat	5	21	32	32	11	34
Kobalt(II)Chlorid	1	4	5	5	1	20
Kaliumdichromat	0	2	4	4	2	50
Gentamicinsulfat	0	8	25	25	17	68

Tabelle 5: Kontaktallergierate für Nickel, Kobalt, Chrom und Gentamicin im untersuchten Kollektiv, geordnet nach Detektionszeitpunkt (modifiziert nach Thomas B, et al. 2015)⁴⁹

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die Kontaktallergierate gegenüber Metallimplantat- und Knochenzementkomponenten bei symptomatischen TEP-Trägern nach Ausschluss biomechanischer Problematiken und infektiöser Genese hoch ist und die Metallallergierate in etwa der in der Gesamtbevölkerung vorherrschenden Kontaktallergieraten gegenüber Nickel, Kobalt und Chrom entspricht (vgl. 1.2).⁸ Es ist jedoch hervorzuheben, dass dabei eine verlängerte Testperiode mit Ableesungen über 72 Stunden essentiell ist um das gesamte Ausmaß der in Frage kommenden Kontaktallergieraten zu erfassen. Demzufolge lässt sich festhalten, dass mit der gängigen Praxis mit ECT-Ableesungen an Tag 2 und 3 etwa 1/3 der Metallallergiker und 2/3 der Gentamicinallergiker nicht erkannt werden. Man könnte in Anlehnung an etablierte serologische Untersuchungen von der diagnostischen Lücke bzgl. „später“ Antigene, wie bspw. Nickel- oder speziell Gentamicinsulfat, sprechen. Die weltweit erste Studie ihrer Art mit dem bisher größten Patientenkollektiv an Endoprothesenträgern fand großes Interesse und gab Zusatzimpulse zur aktuellen Leitlinienüberarbeitung „Durchführung des Epikutantests“ – so u.a. die enthaltene Empfehlung zur Spätablesung. Die klinische Relevanz der Detektion von Gentamicinkontaktallergien bei beschwerdebehafteten Prothesenträgern konnte darüber hinaus im Rahmen einer Nachuntersuchung der hier identifizierten 25 Allergiker aufgezeigt werden: 15 Patienten stimmten einer erneuten Untersuchung zu, wobei 9/15 (60%) einer Revisionsoperation zugeführt worden waren, bei der auf Gentamicin-haltigen Knochenzement verzichtet wurde. Dabei zeigte sich bei 8/9 revidierten Patienten (89%) eine signifikante Besserung der subjektiven Beschwerden (mittlerer initialer vs. postoperativer WOMAC-Score: 35,77 vs. 56,92; $p < 0,05$). Graph 5 fasst die bisher nur per Abstract zur deutschen Allergie-Jahrestagung vorgestellten Ergebnisse zusammen. Ein weiterer kürzlich veröffentlichter Fallbericht unserer Arbeitsgruppe zeigte außerdem, dass eine Gentamicinallergie „Arthritis“-Symptome bei K-TEP-Trägern hervorrufen kann.⁵⁰



Graph 5: Scatter- und Box-Plots der an 9 revidierten Patienten erhobenen WOMAC-Scores, jeweils vor und nach der Revisionsoperationen mit Wechsel auf Gentamicin-freien Knochenzement (als Abstract veröffentlicht, Publikation in Vorbereitung)

4.2 Spezifische Histologie und Zytokinmuster bei Implantatallergie

Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt der Untersuchung betrug 65 Jahre (37 bis 89 Jahre). 25 Teilnehmer bzw. 58% waren weiblich, 18 bzw. 42% männlich. Alle 25 revidierten Patienten hatten CoCrMo-basierte K-TEPs. Die mittlere Prothesenstandzeit vom Zeitpunkt der Primärimplantation bis zur Revisionsoperation betrug 26 Monate (6 bis 60 Monate). Die unter 1.6 dargelegte Allergiediagnostik mittels ECT und LTT erbrachte folgende Subgruppenzugehörigkeit: 11 allergische Patienten zeigten einen positiven ECT (10/11 Nickel, 6/11 Kobalt, 2/11 Chrom), 9 sensibilisierte Patienten zeigten eine erhöhte T-Zellproliferation im LTT (9/9 Nickel, 1/9 Kobalt), 5 symptomatische Indexpatienten blieben allergiediagnostisch unauffällig. Im Rahmen der Wechseloperationen der Indexpatienten wurden insgesamt 50 periimplantäre Gewebeproben zur histopathologischen Diagnostik entnommen (je zwei pro Patient und Knie), sowie insgesamt 50 periimplantäre Gewebeproben zur molekularbiologischen Untersuchung (je eine implantatnahe und eine implantatferne Probe). Alle 12 als negative Kontrolle eingeschlossenen Gonarthrotiker zeigten eine unauffällige Allergieanamnese, insbesondere lag keine KMU vor. Im Rahmen der Primärimplantationen wurden insgesamt 24 artikuläre Gewebeproben zur histopathologischen Diagnostik entnommen (je zwei pro Patient und Knie), sowie insgesamt 24 artikuläre Gewebeproben zur molekularbiologischen Untersuchung (je

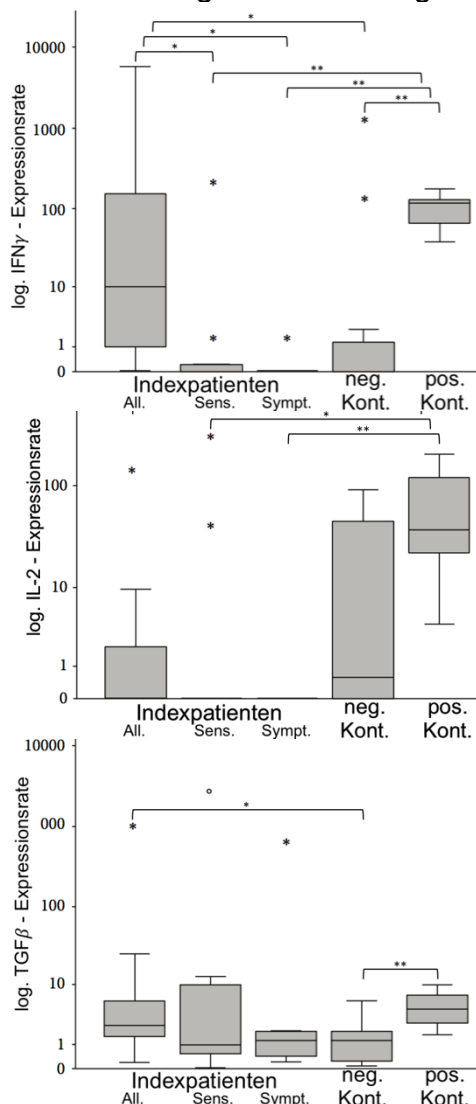
eine gelenknahe und eine gelenkferne Probe). Bei allen operierten Patienten wurden zudem je zwei mikrobiologische Gewebeproben in Kultur gebracht, die auch nach 14-tägiger Bebrütung kein Bakterienwachstum zeigten. Alle 6 als positive Kontrolle eingeschlossenen Metallallergiker zeigten zum einen eine positive Allergianamnese und zum anderen positive ECT-Reaktivität (6/6 Nickel und 1/6 Kobalt), besaßen jedoch keine TEP oder sonstigen Metallimplantate. Insgesamt wurden 14 Stanzbiopsien entnommen (je zwei pro Patient und ECT-Feld – reaktiv und unauffällig), wovon je eine der Histopathologie und Molekularbiologie zugeführt wurde. Tabelle 6 fasst die Charakteristika und Gruppenzugehörigkeit der Studienpopulation, sowie die entnommenen Proben zusammen:

Gruppe	Größe	Geschlecht		Alter [Jahre]	Standzeit [Monate]	Proben Histologie	Proben Molekularbiologie
		w	m				
Indexpatienten	25	9	16	64	26	50 Knie	50 Knie
allergisch	11	4	7	59	26	22 Knie	22 Knie
sensibilisiert	9	2	7	64	28	18 Knie	18 Knie
symptomatisch	5	3	2	70	23	10 Knie	10 Knie
Neg. Kontrolle	12	11	1	64	-	24 Knie	24 Knie
Pos. Kontrolle	6	5	1	69	-	7 Rücken	7 Rücken
<i>Total</i>	<i>43</i>	<i>25</i>	<i>18</i>	<i>65</i>	<i>26</i>	<i>81</i>	<i>81</i>

Tabelle 6: Gruppengröße und -charakteristika, sowie Zusammenfassung der entnommenen Proben (modifiziert nach Thomas P, et al. 2015)⁵¹

Die inkludierten Prothesenträger erreichten einen mittleren WOMAC-Score von 42,6 Punkten (12,1 bis 95,3). Die verschiedenen Patientengruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied bzgl. der präoperativ erhobenen Ausgangswerte des WOMAC-Questionnaire, weder im Vergleich untereinander ($p=0,285$) noch im Vergleich zum negativen Kontrollkollektiv der Gonarthrotiker ($p=0,359$). Die histologische Auswertung und Immunhistochemie der entnommenen Gewebeproben zeigte eine charakteristische Verteilung bei solchen Patienten, die im Rahmen der Allergiediagnostik die Kriterien für eine Kontaktallergie erfüllten (ECT+), oder zumindest eine Sensibilisierung zeigten (LTT+). Die periprothetischen Gewebeproben von 9 der 11 revidierten Allergiker (82%) zeigten das histologische Bild einer indifferenten Typ 4 Membran, welche mit ihrem vornehmlich bindegewebigen Fibrosierungsbild oft der klinischen Diagnose „Arthrofibrose“ entsprechen. Neben der allergietypischen Typ 1 Membran, welche man hier

eigentlich eher erwartet hätte, wiesen viele der histopathologischen Gewebeschnitte jedoch ebenfalls auffällige Lymphozyteninfiltraten auf. Des weiteren zeigte sich bei 6 der 9 sensibilisierten Indexpatienten (67%) im Revisionspräparat ebenso histologisch eine indifferente Typ 4 Membran mit auffälligen T-Zellinfiltraten. Die übrigen 5 Präparate beider Subgruppen (2/11 und 3/9) erbrachten Typ 1 Membranen mit deutlichen Makrophagenherden um zahlreiche Abriebpartikel und korrespondierende Lymphozyteninfiltrate. Die Synovialproben der operierten Gonarthrotiker zeigten, wie zu erwarten, das typische Bild einer degenerativen Osteoarthrose. Die Stanzbiopsien der im ECT reaktiven Hautareale der positiven Kontrollpatienten zeigten, einer Kontaktallergie entsprechend, perivaskuläre T-Zellinfiltrate, sowie vereinzelte eosinophile Granulozyten. Die vergleichende Untersuchung der Zytokinexpression aller gewonnenen Gewebeproben ergab mehrfache signifikante Unterschiede, von denen im Folgenden drei wegweisende aufgezeigt werden sollen (s. Graph 6):



Alle Metallallergiker des Kollektivs zeigten eine erhöhte Expressionsrate von Interferon Gama (IFN γ), die sowohl im Vergleich der allergischen Prothesenträger mit den restlichen Indexpatienten ($p=0,0011$ bis $0,012$) und Gonarthrotikern ($p=0,027$), als auch im Vergleich der positiven Kontrollen mit den nicht allergischen Indexpatienten ($p=0,007$ bis $0,008$) und Gonarthrotikern aufgezeigt werden konnte ($p=0,01$). Darüber hinaus fand sich eine signifikant erhöhte Interleukin 2 (IL2)-Expressionsrate im positiven Kontrollkollektiv der im ECT auffälligen Metallallergiker im Vergleich zu allen Indexpatienten des Kollektivs ($p=0,001$ bis $0,023$). Schließlich konnte eine erhöhte Transforming Growth Factor beta (TGF β)-Expression in den Gewebeproben aller Metallallergiker im Vergleich zum gonarthrotischen Gewebe nachgewiesen werden ($p=0,036$ und $0,007$).

Graph 6: Vergleich der Zytokinexpression im Studienkollektiv

(* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, modifiziert nach Thomas P, et al. 2015)⁵¹

Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems bilden das Zytokin IFN γ im Rahmen mannigfaltiger Erkrankungen. Im Kontext der Kontaktallergie führt die IFN γ -Produktion u.a. zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von CD4+ TH $_1$ Zellen, sog. „T-Helfer-Zellen“. In der Folge kommt es zur Hochregulierung der MHC-I/II-Expression (Major Histocompatibility Complex = Hauptgewebeverträglichkeitskomplex) und damit zur vermehrten Antigenpräsentation und -erkennung.⁵² Durch die deutlich verminderte epidermale Rekrutierung von Entzündungszellen in IFN γ -Rezeptor defizienten Mäusen nach experimenteller Sensibilisierung konnte gezeigt werden, dass IFN γ entscheidend für die Entstehung von Kontaktallergien ist.⁵³ Nach der initialen Sensibilisierungsphase wird die Entzündungsreaktion durch die lokale Infiltration von CD8+ T-Zellen, sog. „T-Effektor-Zellen“ verstärkt und durch die Sekretion sekundärer Zyto- und Chemokine von ortsständige Epithelzellen aufrecht erhalten.⁵⁴ Dieses sog. „Typ 1“ oder „TH $_1$ “-Muster mit histologisch hoher Gewebeakkumulation von CD4+ T-Lymphozyten und hoher IFN γ -Expression fand sich erwartungsgemäß auch in unserem positiven Kontrollkollektiv. Im Rahmen des Rezirkulierens könnten sich sensibilisierte T-Lymphozyten auch in verschiedene Gewebe des Organismus gezielt absiedeln. Interessanterweise zeigten auch jene Indexpatienten mit nachgewiesener KMU und positiven ECT eine signifikant erhöhte IFN γ -Expressionsrate im periprothetischen Gewebe. Im Rahmen der kontaktallergischen Entzündungsreaktion wird des weiteren IL-2 von Antigen-präsentierenden Immunzellen produziert und führt zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten. Die fehlgeleitete Immunreaktion verstärkt sich so weiter.⁵² Dies spiegelt sich in der signifikant erhöhten IL2-Expressionsrate unter Nickel-Exposition im dicht mit T-Lymphozyten durchsetzten ECT-Feld unserer Allergiekontrollgruppe wider. Unsere Beobachtungen bestätigen frühere Ergebnisse, die ebenfalls eine lokal erhöhte IL2-Expression in ECT-Patchproben zeigte.⁵⁵ Allerdings konnte im periimplantären Gewebe von Metallallergikern in unserem Kollektiv eine nur geringe Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur ECT-Hautstanze, welche 72 Stunden nach Allergen-Exposition inmitten der korrespondierenden akuten Entzündungsreaktion gewonnen wurde, handelt es sich hierbei jedoch um Proben aus chronisch exponiertem Gewebe. IL-2 könnte dementsprechend als früher Botenstoff in der Entstehung von metallallergischen Reaktionen gewertet werden. Experimentelle Expositionsstudien anderer Autoren stärken diese Vermutung.⁵⁶ Darüber hinaus

fungiert TGF β neben seiner profibrotischen Wirkung im Gegensatz zu den vorgenannten pro-inflammatorischen Zytokinen als regulatorisches Signal, indem es das Wachstum von Immunzellen senkt und die Differenzierung sog. „regulatorischer T-Zellen“ (T_{reg}) fördert.⁵² Diese können den Schweregrad der Kontaktallergie und die damit einhergehende Symptomatik entscheidend eindämmen, indem sie die Population an hauptverantwortlichen Effektorzellen dezimieren.⁵⁴ Die signifikant erhöhten Expressionsraten in den Gewebeproben der allergischen Studienteilnehmer könnte vor diesem Hintergrund als autoregulatorischer Feedbackmechanismus gedeutet werden.

Zusammenfassend konnte also histologisch und molekularbiologisch gezeigt werden, dass in der Tat sowohl spezifische zelluläre Infiltrations- und signifikante Zytokinexpressionsmuster in exponierten Geweben metallallergischer Prothesenträger identifiziert werden können. Dass die Identifikation potentiell diagnostisch nutzbarer Charakteristika eine hohe klinisch Relevanz hat, konnte schließlich mittels Nachuntersuchung und WOMAC-Erhebung revidierter allergischer Indexpatienten gezeigt werden: 9 metallallergische Indexpatienten unterzogen sich einer Revisionsoperation mit Wechsel auf „hypoallergene“ Prothesen (8/9 Titanbasiert und 1/9 Oxinium), woraufhin sich bei 8/9 revidierten Patienten (89%) eine signifikante Besserung einstellte.⁵¹ Die Ergebnisse dieser Studie haben u.a. dazu geführt, dass die Krenn-Klassifikation modifiziert wurde. In der 2014 publizierte Version wird nun eine Unterform des Typ 4 (Indifferenztyp) bei Vorliegen von Lymphozyteninfiltraten als „Allergie wahrscheinlich“ bezeichnet (s. Graph 4, S. 21).⁴⁴

4.3 Eignung antimikrobieller Peptide zur Diagnostik des PPI

Bei Studieneinschluss betrug das Durchschnittsalter der Patienten 62 Jahre (31 bis 77 Jahre). 7 Teilnehmer bzw. 64% waren weiblich, 4 bzw. 36% männlich. Noch am Untersuchungstag erfolgte die Revisionsoperation aller K-TEPs, die ausschließlich CoCrMo-basiert waren, nach einer mittleren Standzeit von 62 Monaten (15 bis 181). Die unter 1.6 dargelegte Allergiediagnostik mittels ECT und LTT in Kombination mit intraoperativ gewonnenen mikrobiologischen Proben erbrachte folgende Subgruppenzugehörigkeit: 6 Patienten wurden aseptisch gewechselt (keine KMU, LTT negativ, kein Keimnachweis), 4 sensibilisierte Patienten zeigten eine erhöhte T-

Zellproliferation im LTT (4/4 Nickel, 2/4 Kobalt), 1 allergische Patientin reagierte sowohl im ECT als auch im LTT auf Nickel. Intraoperativ wurden insgesamt 22 periimplantäre Gewebeproben zur histopathologischen Diagnostik entnommen (je zwei pro Patient und Knie), sowie insgesamt 22 periimplantäre Gewebeproben zur molekularbiologischen Untersuchung (je eine implantatnahe und eine implantatferne Probe) und ebenso viele zum mikrobiologischen Keimnachweis, die jedoch auch nach 14-tägiger Bebrütung kein Wachstum zeigten. Des Weiteren erfolgte präoperativ eine standardisierte Blutentnahme zur serologischen und molekularbiologischen Diagnostik, sowie zum Beginn der chirurgischen Maßnahmen eine Gelenkpunktion mit Synovialaspiration zur Proteinanalyse (s. Tab. 7).

Gruppe	n	Geschlecht		Alter [Jahre]	Standzeit [Monate]	Periimpl. Proben		Präop BE		Präop Pkt.
		w	m			Hist. Mol.	Ser. Mol.			
Patienten	11	7	4	62	62	22	22	11	11	11
allergisch	1	1	0	54	26	2	2	1	1	1
sensibilisiert	4	3	1	65	56	8	8	4	4	4
aseptisch	6	3	3	62	73	12	12	6	6	6
Total	11					44		22		11

Tabelle 7: Gruppengröße und -charakteristika, sowie Zusammenfassung der entnommenen Proben (w = weiblich, m = männlich, Periimpl. = periimplantär, Hist. = Histologie, Mol. = Molekularbiologie, BE = Blutentnahme, Ser. = Serumzytokinanalyse, Pkt. = Synovialpunktion).

Nummer	Geschlecht	Alter	präop WOMAC	Standzeit in Monaten	Gruppe	SLIM- Klassifikation
1	m	74	22	15	Aseptisch	4
2	w	77	44	67	Aseptisch	1
3	w	73	40	37	Sensibilisiert	4
4	m	66	45	181	Aseptisch	1
5	m	62	48	62	Sensibilisiert	1
6	m	62	37	62	Aseptisch	4
7	w	31	40	50	Aseptisch	1
8	w	65	54	86	Sensibilisiert	1
9	w	62	40	62	Aseptisch	4
10	w	58	36	38	Sensibilisiert	4
11	w	54	41	26	Allergisch	0

Tabelle 8: Individuelle Patienteninformationen, inklusive Subgruppenzugehörigkeit und histopathologische Klassenzuordnung nach Krenn und Morawietz⁴⁴.

Tabellen 8 und 9 fassen die patientenspezifischen Ergebnisse aus Allergiediagnostik, histopathologischer Klassifizierung nach Krenn und Morawietz,⁴⁴ sowie Zytokinanalyse der Synovialpunktate zusammen. Bei allen 11 Patienten war weder ein Infekt, noch eine Allergie nachgewiesen worden. Die zugrundeliegenden Daten wurden beim 10. Endoprothetik-Kongress im Februar 2017 als Vortrag vorgestellt, die entsprechende Publikation wird aktuell vorbereitet.

Nr	IL-4 [pg/mL]	IL-8 [pg/mL]	IL-17A [pg/mL]	IL-6 [pg/mL]	IL1- β [pg/mL]	IL-10 [pg/mL]	IL-5 [pg/mL]	IFN γ [pg/mL]	TNF α [pg/mL]
1	0,9	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3
2	0,0	85,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0,0	23,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
4	0,0	10,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	0,0	5,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
8	0,0	16,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
9	0,0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
11	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabelle 9: Patientenspezifische synoviale Zytokinkonzentration in pg/mL.

4.4 Systemische Biomarker zur Abgrenzung von periprothetischem Infekt, Metallimplantatallergie und unspezifischer Entzündung

Zur Erweiterung der o.g. Pilotstudie wurde eine Kooperation zwischen 3 Standorten etabliert (Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie; Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie; HELIOS ENDO-Klinik Hamburg, Abteilung Gelenkchirurgie) und eine Forschungsförderung eingeworben, die eine Ausweitung der Studie erlaubte. Beabsichtigt war der Einschluss einer ausreichenden Patientenzahl folgender Subgruppen, deren Definitionskriterien maßgeblich auf den unter 4.2 beschriebenen Vorarbeiten beruhen (+ = positiv, - = negativ):

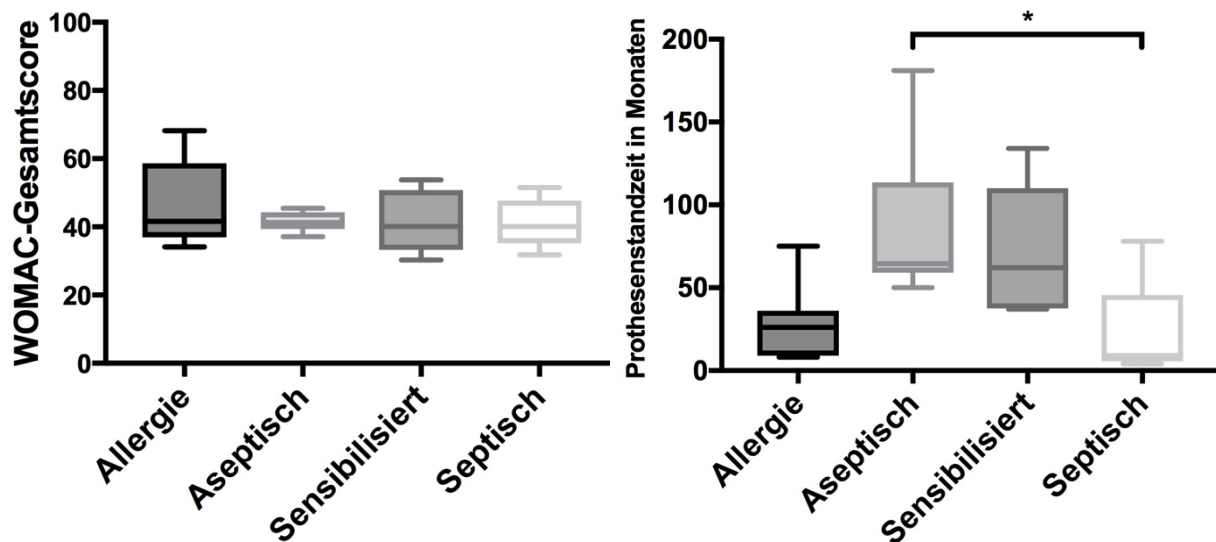
- Allergische Prothesen-Wechsel (KMU+ ECT+ LTT+ Mibi-)
- Aseptische Prothesen-Wechsel (KMU- ECT- LTT- Mibi-)
- Sensibilisierte Prothesen-Wechsel (KMU+/- ECT- LTT+ Mibi-)
- Septische Prothesen-Wechsel (KMU- ECT- LTT+/- Mibi+)

Im Rahmen der laufenden Studie wurden von weiteren 12 Patienten komplette Datensätze und Gewebeproben erhalten. Insgesamt wurden 13 weibliche (57%) und 10 männliche (43%) Teilnehmer mit einem Durchschnittsalter von 64 Jahre (31 bis 83 Jahre) vor Revisionsoperationen von CoCrMo-basierten K-TEPs nach einer mittleren Standzeit von 52 Monaten (4 bis 181 Monate) rekrutiert. Die unter 1.6 aufgeführte Diagnostik ermöglichte folgende Subgruppenzuordnung:

- 7 (30%) allergische Prothesenwechsel (KMU+ ECT+ LTT+ Mibi-)
- 6 (26%) aseptische Prothesenwechsel (KMU- ECT- LTT- Mibi-)
- 5 (22%) sensibilisierte Prothesen-Wechsel (KMU+/- ECT- LTT+ Mibi-)
- 5 (22%) septische Prothesen-Wechsel (KMU- LTT+/- Mibi+)

Neben den unter 3.3 genannten Methoden wurden außerdem präoperative Blut- und Gewebentnahmen zur molekularbiologischen Untersuchungen durchgeführt. Die Blutabnahme erfolgte mit dem PAXgene® Kit, die Gewebeentnahme mit Hilfe von RNeasy Lysis Buffer™. Nach Phenol-Chloroform-basierter RNA-Extraktion erfolgte die reverse Transkription in cDNA und Genexpressionshöhenbestimmung relevanter Zytokine (IFN γ , TNF α , IL1- β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL17, S100A8, LTF, S100P, LY96, NRG1) in Relation zum Haushaltsgen (house keeping gene) EF1- α mittels RT-qPCR.

Der mittlere präoperative WOMAC-Score-Wert betrug 42,8 Punkte (30,3 bis 68,2). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Patientengruppen untereinander ($p=0,917$). Die Prothesenstandzeiten unterschieden sich jedoch signifikant im Vergleich der Subgruppen ($p=0,021$): Patienten mit infizierten Prothesen wurden signifikant früher revidiert, als Patienten mit aseptischen Wechseln und negativer Allergiediagnostik ($p=0,045$). Graph 7 fasst die beiden Charakteristika des Kollektivs zusammen:



Graph 7: Verteilung der präoperativen WOMAC-Score-Punktwerte und Prothesenstandzeiten der Subgruppen des Studienkollektivs (insgesamt 23 Patienten mit Knie-Totalendoprothetik)

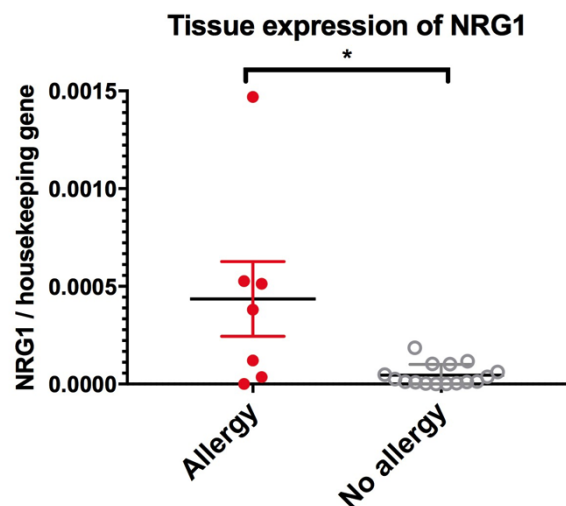
Die histopathologische Klassifizierung der entnommenen Gewebeproben, die wiederum in Kooperation mit Herrn Prof. V. Krenn, Referenzpathologe der orthopädischen Fachgesellschaft, durchgeführt wurde, war etwas heterogener als noch im vorhergehenden Kollektiv (vergl. 4.2). Jedoch zeigten Patienten mit positiven Kriterien für eine Kontaktallergie (4/7) oder Sensibilisierung (3/5) wiederum zumeist das Bild einer indifferenten Typ 4 Membran mit auffälligen Lymphozyteninfiltraten, wohingegen bei aseptischen Wechseln zumeist eine periprothetische Membran vom Typ 1 mit zahlreichen Abriebpartikeln vorlag (4/6). Dagegen imponierten bei allen septischen Prothesenwechseln die infektiösen Membrantypen 2 und 3 (5/5) mit deutlicher Gefäßproliferation und Granulozyteninvasion. Die vergleichende Untersuchung der synovialen Zytokinkonzentrationen, gewebsständigen Zytokinexpressionshöhen und peripheren Vollblut-RNA-Analysen ergab multiple signifikante Unterschiede. Eine Auswahl potentiell klinisch relevanter neuartiger Erkenntnisse soll im Folgenden dargelegt werden.

4.4.1 Neue periimplantäre und systemische Marker der Metallimplantatallergie

Im periimplantären Gewebe der Metallallergiker des Kollektivs zeigte sich eine signifikant erhöhte Expressionsrate von Neuregulin 1 (NRG1) im Vergleich zum Gewebe nicht allergischer Patienten ($p=0,023$). Außerdem ergab die Vollblut-Genexpressionsanalyse eine signifikant vermehrte Lactotransferrin-mRNA ($p=0,019$).

4.4.1.1 Neuregulin 1

Die Familie der Neuregulin (NRG)-Proteine wird in vielen Geweben exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und Migration ortständiger Zelltypen durch direkte Aktivierung von Tyrosinkinase. Aufgrund der Bedeutung von NRG1 im Rahmen der Organogenese ist der vielfach beschriebene Zusammenhang mit kongenitalen und neoplastischen Erkrankungen, sowie neurologisch-psychiatrischen Entwicklungsstörungen nicht verwunderlich.⁵⁷ Darüber hinaus postulierten Marballi et al. einen Zusammenhang zwischen NRG1-Mutationen und immunologischen Dysregulationen, da klar mit NRG1-Mutationen korrelierende Erkrankungen, wie Schizophrenie, Brustkrebs, und koronare Gefäßverschlüsse, eine deutliche inflammatorische Komponente aufweisen. In einer 2011 veröffentlichten Studie untersuchten sie eine Gruppe von NRG1-Mutationsträgern und konnten signifikant erhöhte Plasmaspiegel von Autoantikörpern und proinflammatorischen Zytokinen, wie bspw. IL-6, IL-8 und TNF- α , nachweisen.⁵⁸ Der aufgezeigte Zusammenhang zwischen NRG1 und der Entstehung eines proinflammatorischen Milieus, wie es ebenso bei der dysregulierten Überempfindlichkeitsreaktion einer Kontaktallergie vorherrscht, fand sich auch in unserem Kollektiv wieder (s. Graph 8).

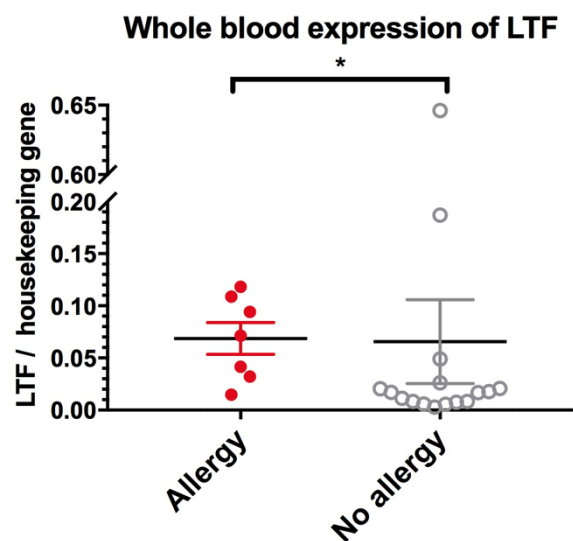


Graph 8: Im periprothetischen Gewebe der metallallergischen Subgruppe des Studienkollektivs (n = 7) fand sich eine signifikant erhöhte lokale Expression von NRG1

4.4.1.2 Lactotransferrin

Der Name Lactoferrin, oder auch Lactotransferrin (LTF), leitet sich von hohen Konzentrationen des Glykoproteins in der Milch laktierender Kühe und stillender Mütter ab. Darüber hinaus findet sich das Protein in den Vesikeln neutrophiler Granulozyten ebenfalls in hohen Konzentrationen. Wie das bekanntere Transferrin gehört es zur Gruppe der Eisentransportproteine, erreicht jedoch nur im Rahmen von Immunreaktionen durch Neutrophilendegranulation nachweisbar erhöhte Plasmaspiegel.⁵⁹ Neben seiner Rolle als antimikrobielles Akute-Phase-Protein mit

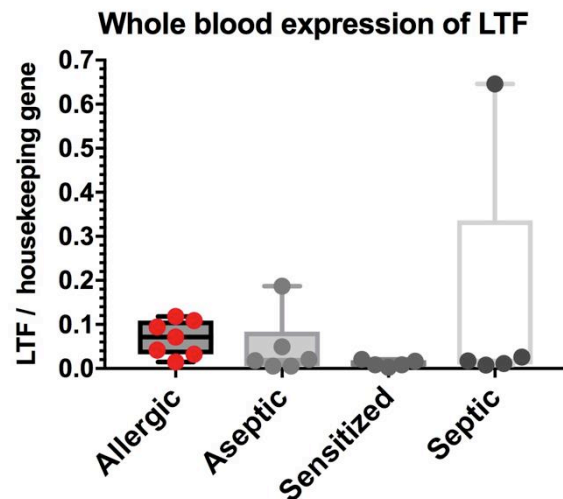
Bedeutung für die Ausbildung pathologischer Zustände wie SIRS und Sepsis, weist das Peptid gewichtige immunmodulatorische Eigenschaften auf. So wird LTF eine Sensorfunktion im Bezug auf den immunologischen Aktivierungszustand des Organismus zugeschrieben, ebenso wie eine damit einhergehende Kontrollfunktion über die immunologische Homöostase.⁶⁰ Im Falle von Dysregulation und Dysbalance wirkt LTF regulierend und schränkt bspw. die Migration und Infiltration von eosinophilen Granulozyten *in vitro* ein.⁶¹ Als Stabilisator im Rahmen fehlgeleiteter Immunreaktionen hemmt es außerdem CD4⁺ TH₁Zellen *in vivo* und unterdrückt Hypersensitivitätsreaktionen durch die Reduktion von Leukozyteninfiltraten und Stimulation regulatorischer T-Zellen.^{62,63} In einer 2009 publizierten Arbeit konnte der Nutzen von Lactoferrin als Biomarker für eine Erkrankung des atopischen Formenkreises erstmals gezeigt werden. Nach Allergenstimulation durch nasale Provokation konnten Choi et al. einen signifikanten LTF-Anstieg sowohl im lokalen Sekret, als auch im Serum der untersuchten Atopiker feststellen.⁶⁴ Im peripheren Blut der Metallallergiker unseres Kollektivs konnten wir ebenso eine signifikant erhöhte LTF-Expression nachweisen, die in diesem Zusammenhang als Ausdruck einer fehlgeleiteten Immunantwort in Form der vorherrschenden Kontaktallergie interpretiert werden könnte (s. Graph 9).



Graph 9: Im peripheren Blut der metallallergischen Subgruppe des Studienkollektivs (n = 7) fand sich eine signifikant erhöhte Expression von LTF-mRNA

Zur vorbeschriebenen Beobachtung, dass LTF als Regulator auf leukozytärer Ebene wirkt, passt die fehlende Expressionserhöhung im periprothetischen Gewebe der Allergiker. Eine wichtige Limitation der LTF-Erhöpfung spiegelt sich jedoch in seiner Funktion als antimikrobielles Peptid und der konsekutiven Erhöhung im Rahmen bakterieller Infektionen wider. So zeigte 1 Patient mit PPI ebenfalls eine starke LTF-Erhöpfung, bei jedoch im Mittel niedrigerer Expressionsrate aller nicht allergischen Subgruppen (s. Graph 10).

Graph 10: Eine erhöhte Genexpression von LTF zeigte sich auch im Fall eines der insgesamt 5 septischen Wechsels im Vollblut des Probanden



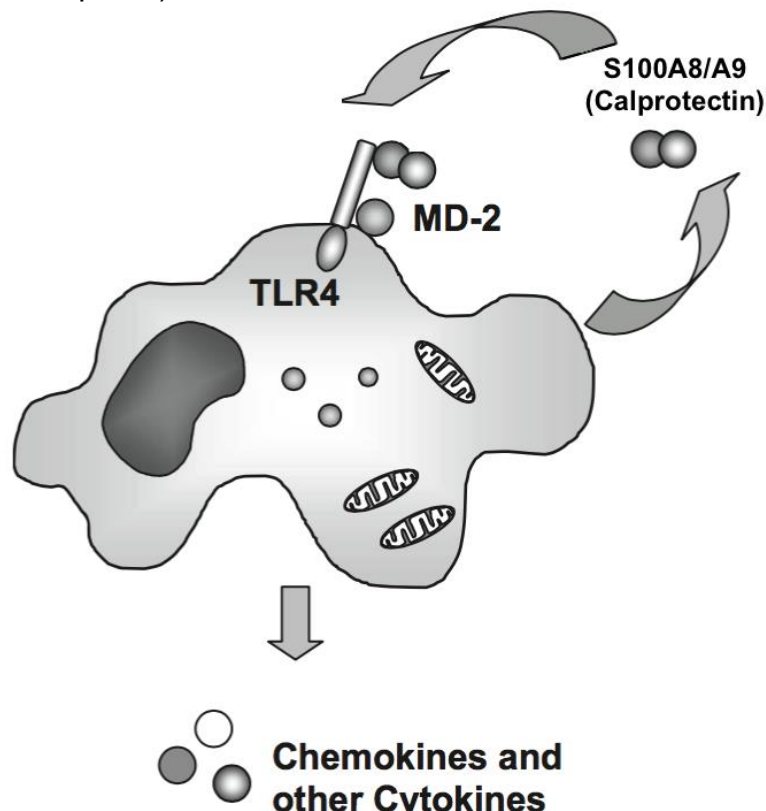
4.4.2 Neue zirkulierende systemische Biomarker des periprothetischen Infekts

Patienten mit low-grade PPI zeigten signifikant erhöhte mRNA-Kopien dreier potentieller Biomarker im mittels PAXgene® Kit analysierten Vollblut. Die RNA-Sequenzen zweier Vertreter der S100-Protein-Familie zeigten sich hoch signifikant überexprimiert (S100P, $p=0,004$ und S100A8, $p=0,007$). Darüber hinaus war eine signifikante Hochregulation des Lymphozytenantigens 96 (Ly96, $p=0,019$) zu beobachten.

4.4.2.1 S100P und S100A8

Phagozyten und Makrophagen sind als Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems entscheidend an der Mikrobenabwehr des Organismus beteiligt. Diese sog. unspezifische Immunantwort wird durch körperfremde PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster) oder körpereigene DAMPs (damage-, also Gefahr-assoziierte molekulare Muster) über PRRs (pattern-recognition-, also Muster-Erkennungsrezeptoren) induziert. DAMPs oder auch Alarmine, also endogene Gefahrenbotenstoffe, die entweder aktiv sezerniert oder aus dem Inneren untergegangener Zellen frei werden, binden bspw. an Toll-ähnliche Rezeptoren (toll-like-receptor, TLR) und bewirken lokale und systemische Entzündungsreaktionen. Eine Vielzahl der S100-Proteine, die eine Familie von 25 niedermolekularen Peptiden umfassen, können in o.g. Weise als Gefahrensignal wirken. In Stresssituationen werden S100A8 und S100A9 aktiv von Phagozyten sezerniert und zirkulieren als sog. „Calprotectin“-Dimere im Blut. Calprotectin wirkt zum einen als endogener TLR-Aktivator und zum anderen direkt antibakteriell, bspw. auf Staphylokokken.⁶⁵ Neben einer Vielzahl intra- und extrazellulärer biologischer Funktionen, wie bspw.

Zellproliferation und -differenzierung, Steuerung von Apoptose, Kontrolle des Ca^{2+} -Haushaltes und des zellulären Metabolismus, regulieren die S100-Proteine Inflammationsreaktionen, induzieren Zellmigration und bewirken Immunzellrekrutierung und -invasion. S100A8 ist dabei bereits im Zytoplasma nicht aktivierter neutrophiler Granulozyten vorhanden und lässt sich in zunehmendem Maße auch in Makrophagen und Phagozyten nach Kontakt mit pro-inflammatorischen Stimuli, wie bakteriellen Proteinen, nachweisen. Steigende Serumspiegel sind dabei Zeichen akuter Entzündungsreaktionen.⁶⁶ Systemisch erhöhte Immunzellmotilität und lokale Leukozytentransmigration *in vitro* und *in vivo* konnten als Folge gezeigt werden.⁶⁷ Ausgehend von niedrigen Basalwerten unstimulierter Monozyten, werden hohe Expressionsniveaus in aktivierten Granulozyten erreicht, welche im peripheren Blut des betroffenen Organismus nachgewiesen werden können. Als systemische Amplifikatoren der bakteriellen Immunabwehr steigern S100A8 und S100A9 die Antwortkaskaden auf bakterielle Endotoxine und Lipopolysaccharide und wirken außerdem lokal chemotaktisch auf Makrophagen. S100A8 konnte dabei als aktive Komponente des Calprotectin-Dimers identifiziert werden, welche spezifisch an den wichtigen Toll-ähnlichen Rezeptor 4 (TLR4) bindet (s. Graph 11).⁶⁸

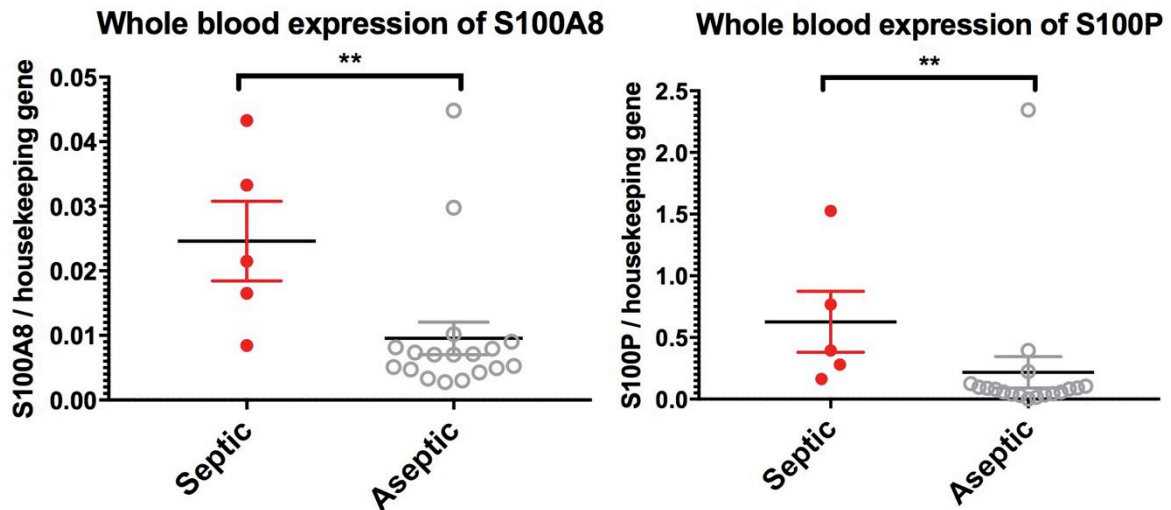


Graph 11:
Darstellung der

Aktivierung des TLR4 durch zirkulierende Calprotectin-Dimere und Verstärkung der Immunantwort durch aktivierte Monozyten (modifiziert nach Ehrchen J, et al. 2009)⁶⁵

Schematische
endogenen

Die Bedeutung der in der Hauptsache *in vitro* und tierexperimentell entschlüsselten Mechanismen konnte bereits in multiplen klinischen Studien bestätigt werden. So konnten Payen et al. eine signifikante S100A8-Vollblut-Expressionserhöhung bei im septischen Schock verstorbenen Patienten im Vergleich zu überlebenden Patienten zeigen. Darüber hinaus fielen sowohl das S100A8-Expressionsniveau, als auch der S100A8-Proteinplasmaspiegel nach Ablauf einer Woche im Vollblut genesender Patienten stark ab.⁶⁹ Eine andere Gruppe um Fontaine et al. konnte im Vergleich von gesunden Probanden und Patienten in der Frühphase eines septischen Schocks zum einen zeigen, dass das Vollblutexpressionsniveau von S100A9 im Patientenkollektiv signifikant erhöht war. Zum anderen war ein fehlender Abfall des Expressionsniveaus nach Ablauf einer Woche ein signifikanter unabhängiger Prädiktor für nosokomiale Superinfektionen. Die Autoren schlussfolgerten, dass ein prolongiert erhöhter S100A9-Expressionslevel eine septische Immunsuppression der betroffenen Patienten nicht nur anzeigt, sondern auch vorhersagen kann.⁷⁰ Eine mögliche Erklärung für das Phänomen der Sepsis-induzierten-Immundysfunktion bzw. -suppression (SID/SIS) bietet das *in vitro* Modell der Endotoxin-Toleranz. Dabei werden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) von Spendern unter Laborbedingungen durch Kokultur mit bakteriellen Endotoxinen in niedriger Dosierung an die pathogenen Proteine gewöhnt. Nach konsekutiver Stimulation mit hohen Dosen der mikrobiellen Peptide zeigen sie in der Folge im Vergleich zu unbehandelten Monozyten eine inadäquate Immunantwort. Fontaine konnte im vorbeschriebenen Modell interessanterweise eine signifikante monozytäre mRNA-Erhöhung von S100A8 und S100A9 nachweisen und damit den Nachweis des Zusammenhangs der beiden Marker mit der klinisch auffälligen Immundysfunktion seiner Patienten herstellen.⁷¹ In einer prospektiven klinischen Studie konnte schließlich kürzlich in Synovialproben von 19 Endoprothesenträgern mit PPI eine signifikante Calprotectin-Erhöhung gegenüber Patienten mit aseptischen Revisionen nachgewiesen werden. Der synoviale Calprotectin-Spiegel erwies sich bei einem Wert von >50 mg/L als brauchbarer lokaler diagnostischer Marker mit einer Sensitivität und Spezifität von 89% und 90% für die Erkennung des PPI.⁷²



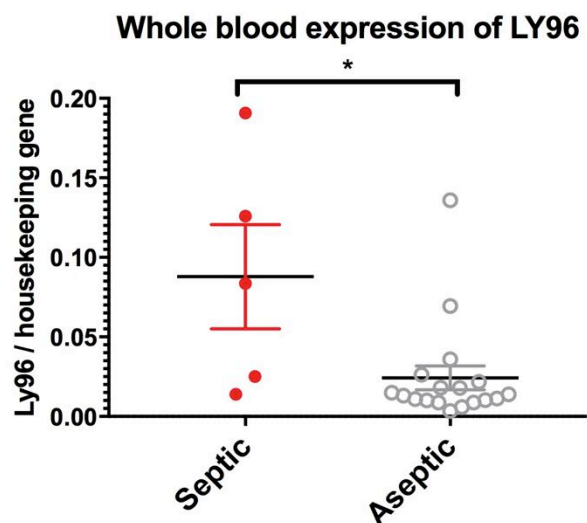
Graph 12: Im peripheren Blut der Patienten mit PPI fand sich eine signifikant erhöhte Expression von S100A8- und S100P-mRNA

Im Vollblut der Prothesenträger mit nachgewiesenem „low-grade“ PPI unseres Kollektivs konnten wir eine hoch signifikante Überexpression der beiden Alarmine S100A8 und S100P nachweisen. In allen Fällen lag eine Prothesenbesiedelung mit *Staphylococcus epidermidis* vor. Koagulase-negativen Staphylokokken machen zum einen den Großteil aller TEP-Infekte in Europa aus und führen zum anderen durch die Fähigkeit zur Biofilmbildung zu niedrig-virulenten, jedoch langwierigen und therapieresistenten Verläufen.^{73,74} Nach Ausschluss anderweitiger lokaler oder systemischer Entzündungsreaktionen, wie bspw. maligne Neoplasien oder Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, könnten die beiden Gene exzellente systemisch-zirkulierende Biomarker zur Erkennung eines PPI darstellen, welche mit einer einfachen Blutabnahme bestimmbar sind.

4.4.2.2 Ly96 (MD-2)

Ly96, oder das Lymphozyten-Antigen 96, codiert für das myeloide Differenzierungsprotein 2 (MD-2), welches als wichtiger membranständiger Co-Faktor die Erkennung Gram negativer (Gram-) Bakterien über TLR4 und Gram positiver (Gram+) Bakterien über TLR2 durch monozytäre Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems ermöglicht.⁷⁵ MD-2 ist zum einen für die zelluläre Oberflächenexpression von TLRs essentiell und zum anderen für die TLR-Ligandenerkennung und somit Rezeptoraktivierung unerlässlich.⁷⁶ Das niedermolekulare Glykopeptid wird sowohl membranständig in direktem Bezug zu TLRs exprimiert, als auch als lösliches Protein aktiv sezerniert.⁷⁷ Im Falle der

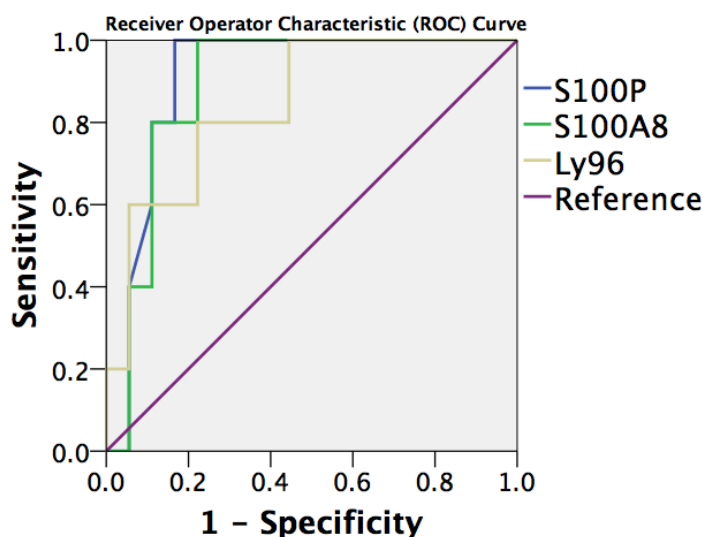
Erkennung Gram- Bakterien bindet mikrobielles LPS an Lipopolysaccharid-bindende Proteine, die wiederum die Interaktion mit MD-2 ermöglicht, welches die TLR4-Dimerisierung und konsekutive Rezeptoryrosinkinasenaktivierung vermittelt und damit die inflammatorische Signalkaskade in Gang setzt. Im Rahmen lokaler oder systemischer Infektionen wird MD-2 in der Folge im entzündeten Gewebe hochreguliert und vermehrt ins Blut des betroffenen Organismus als antimikrobielles Akute-Phase-Protein sezerniert.⁷⁸ Pugin et al. konnten zeigen, dass das Plasma septischer Patienten mit fulminanten Infektionen durch Gram+ und Gram- Erreger signifikant erhöhte MD-2-Spiegel aufweist. Nach LPS-Zugabe war dieses im Vergleich zum Plasma gesunder Probanden in der Lage TLR4-exprimierende Zellen *in vitro* zu aktivieren und inflammatorische Immunantworten zu induzieren. Interessanterweise, ließ sich dieser Effekt nach Apherese von löslichem MD-2 bzw. Inaktivierung durch monoklonale MD-2-Antikörper wieder umkehren. Darüber hinaus fand sich analog zu unserem Kollektiv eine signifikante Überexpression von MD-2-mRNA in Monozyten peripheren Vollbluts septischer Patienten.⁷⁹ Durch vergleichende ELISA-basierte Serumspiegelbestimmung konnten Viriyakosol et al. aufzeigen, dass die gemessenen MD-2-Spiegel nicht mit der Schwere der Infektion und systemischen Inflammation korrelieren, sondern vielmehr lediglich eine mikrobielle Infektion anzeigen.⁸⁰ Zusammenfassend scheint die Ly-96-Genexpression bei Vorliegen bakterieller Infektionen in mononukleären Zellen des angeborenen Immunsystems hochreguliert zu werden, was zu einem messbaren MD-2-Plasmaspiegelanstieg führt, der den Organismus für die Erkennung und konsekutive Abwehr mikrobieller Pathogene sensibilisiert. Diese signifikante und selektive Expressionsänderung des Ly96-Gens im peripheren Blut von Patienten mit bakteriellen Infekten – bestimmbar mittels einer einfachen Blutentnahme – macht diese neue Erkenntnis zu einem weiteren vielversprechenden Kandidaten als Biomarker für PPIs im Kontext der beschwerdebehafteten Endoprothese (s. Graph 13).



Graph 13: Im peripheren Blut der Patienten mit PPI (n = 5) fand sich eine signifikant erhöhte Expression von Ly96-mRNA

Zusammenfassend lassen sich die hier aufgeführten Ergebnisse als Weiterentwicklung der bisherigen Erkenntnisse (s. 4.1 und 4.2) interpretieren:

Trotz der einzigartigen Erfolgsgeschichte der Totalendoprothetik, geben nach wie vor gerade K-TEP-Träger in bis zu 20% nach Primärimplantation persistierende Beschwerden an, was in bis zu 6% der Fälle zu Revisionsimplantationen führt. Dabei sind low-grade Infektionen und aseptische, z.T. ungeklärte, Lockerungen für den Großteil der Revisionsgründe verantwortlich (vgl. 1.4). Bisher fehlen jedoch brauchbare präoperative diagnostische Marker um die zugrundeliegenden Ätiologien klar voneinander abgrenzen zu können. Die dargelegten Daten beinhalten allerdings ein vielversprechendes Portfolio neuartiger systemischer Biomarker, die es uns ermöglichen könnten, neben dem bereits etablierten Algorithmus der Allergiediagnostik (vgl. 1.6), die wichtige Gruppe der PPIs bereits vor der Revision abzugrenzen, bzw. einen solchen auszuschließen (s. Graph 14).



Graph 14: Die Expressionshöhen von S100P, S100A8 und Ly96 im peripheren Blut der Studienpatienten können als zirkulierende diagnostische Biomarker mit hervorragender Sensitivität und Spezifität für die Erkennung eines PPI herangezogen werden. Die Sensitivität und Spezifität für den relativen Expressionslevel von 0,2515 für S100P und 0,0133 für S100A8 betragen jeweils 80% und 89%.

4.5 Eigenleistung des Doktoranden

Die vorliegende Dissertation wurde von Herrn Benjamin Thomas unter Bezugnahme auf § 4a der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 1. Juni 1983 in der Fassung der zehnten Änderungssatzung vom 06. Juli 2012 gemäß der Richtlinien für die kumulative Dissertation an der medizinischen Fakultät (Stand: 10.11.2014) für die Verleihung des Grades Dr. med. verfasst. Die kumulative Dissertation besteht aus vier Publikationen, die in internationalen und nationalen Fachzeitschriften veröffentlicht

wurden. Es handelt sich um einen Fallbericht und drei Originalarbeiten. Zwei der drei Originalarbeiten weisen im Journal Citation Report (<http://admin-apps.webofknowledge.com/JCR/JCR>) einen fachspezifischen Impactfaktor auf, der sie unter die besten 80% listet (Thomas B et al. 2015 in *Contact Dermatitis*: Rang „Dermatology“ 2/61 und „Allergy“ 3/25; Thomas P et al. 2015 in *BioMed Research International*: Rang „Biotechnology & Applied Microbiology“ 82/161 und „Medicine, Research & Experimental“ 72/124). Eine der beiden vorgenannten Arbeiten liegt als Erstautorenschaft (Thomas B et al. 2015), die andere in Ko-Autorenschaft (Thomas P et al. 2015) des Doktoranden vor. Im Folgenden wird der Arbeitsanteil des Doktoranden an beiden Publikationen dargestellt. Dabei werden die einzelnen Arbeitsschritte genannt und der jeweilige Arbeitsanteil zugeordnet.

Publikation	Thomas B. et al. 2015		Thomas P. et al. 2015	
	Arbeitsanteile des Doktoranden	Konzeption	Überwiegend	Konzeption
Durchführung		Vollständig	Durchführung	Unterstützend
Datenerhebung		Vollständig	Datenerhebung	Unterstützend
Datenauswertung		Vollständig	Datenauswertung	Unterstützend
Ergebnisinterpretation		Überwiegend	Ergebnisinterpretation	Unterstützend
Literaturrecherche		Überwiegend	Literaturrecherche	Unterstützend
Formulierung des Manuskripts		Überwiegend	Formulierung des Manuskripts	Unterstützend
Revision des Manuskripts		Überwiegend	Revision des Manuskripts	Unterstützend

5 Synopsis of results

5.1 Importance of late patch test reading in contact allergy

The aim of this study was to measure positive patch test reactions to common arthroplasty materials in symptomatic patients with aseptic cemented knee and hip joint replacements. By adding an additional reading at day 6, the usefulness of late patch testing was to be assessed. To this end, a cohort of 250 consecutive patients

were questioned and patch tested with read-outs at 48, 72, and 144 hours. The WOMAC score and an allergy specific anamnesis questionnaire were analyzed, surgery reports and implant passports were reviewed, and test reactions to a baseline series of 29 common allergens and a bone cement series of 7 allergens were evaluated. 138 (55%) patients showed positive reactions: 41 patients reacted to metal components (nickel = 32, 13%; cobalt = 5, 2%; chromium = 4, 2%) and 49 to bone cement components, with gentamicin leading the way (n = 25, 10%). Interestingly, 11/32 (34%) reactions for nickel, 1/5 (20%) for cobalt, 2/4 (50%) for chromium, and 17/25 (68%) for gentamicin appeared only on day 6. Two conclusions can therefore be drawn: First, the rates of contact allergy to arthroplasty materials in symptomatic patients equals the incidence of metal contact allergy in the general population. Second, with the standard 72 hour patch testing period one third of metal allergic patients and two thirds of gentamicin allergic patients are missed. In summary, this emphasizes the importance of late patch test reading in general and in particular in cases of suspected allergic implant failure.

5.2 Specific cytokine patterns in metal allergic patients

In order to identify new diagnostic tools for the detection of metal implant allergy, we combined clinical, experimental, microscopic, and molecular analysis: after their history was taken, a total of 43 patients underwent patch testing for metal allergy and blood collection for lymphocyte transformation testing. Subsequently, either implant revision and joint replacement surgery or patch test specimens were obtained for histopathological classification of inflammatory cell infiltrates and semiquantitative real-time-PCR-based analysis of inflammatory cytokines (IFN γ , TNF α , IL1- β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL17, and TGF β). The study cohort consisted of 25 symptomatic index patients prior to knee arthroplasty revision surgery and a control group of 18 individuals without joint replacements, either presenting with gonarthrosis (n = 12) or uncomplicated metal allergy (n = 6). Histopathological analysis revealed noticeable lymphocyte conglomerates and a marked tissue fibrosis in allergic and sensitized patients, whereas non-allergic patients showed mostly macrophage recruitment. Moreover, further tissue analysis showed significantly elevated expression levels of interferon gamma, interleukin-2, and transforming growth factor beta in metal allergic patients. All of the aforementioned cytokines play important roles in the development, maintenance, and temporal pattern of contact allergy: IFN γ potentiates antigen and

thus allergen presentation, IL2 is subsequently secreted and leads to T cell proliferation and differentiation, and TGF β stimulates regulatory T cells, which may ultimately keep allergic reactions at bay. Therefore, it can be stated that a combination of multimodal tools in cases of suspected implant allergy allows for a better diagnostic approach.

5.3 Antimicrobial peptides and other biomarkers for diagnosis of PPI

Total joint replacement (TJR) surgery is an efficient, successful, and economical treatment modality for degenerative and inflammatory joint disorders. The procedure can improve joint function, relieve pain, and increase quality of life. Despite the overwhelming success of total hip (THR) and knee replacements (TKR), however, periprosthetic infection (PPI) and aseptic loosening (AL) are serious, yet frequent drawbacks, occurring in 1% to 4% of primary TJRs per year. Both are associated with poor outcomes, increased cost, and technically difficult revision surgery. Furthermore, revision treatment costs nearly amount to the fourfold of primary TJR. Although prompt and clear-cut diagnosis is crucial for any surgical decision-making, particularly so in revision surgery, without a single conclusive pre-operative test, PPI and AL remain an unsolved challenge. Reliable markers for the diagnosis of low-grade infection and implant allergy are still lacking, preventing the pre-operative differentiation between both entities. In the present study, we therefore sought to identify suitable biomarkers for pre-revisional distinction of implant failure etiology on the basis of four groups of index patients: allergic implant failure, aseptic implant loosening with or without metal sensitization, and periprosthetic joint infection. A total of 23 patients, 13 female and 10 male, with a mean age of 64 years, took part in the study, each completing a set of anamnesis and symptom questionnaires, followed by patch testing, blood sampling, and joint aspiration. After a mean prosthesis durability of 52 months before undergoing revision, operational specimens were obtained for microbiological and histopathological evaluation and semiquantitative real-time-PCR-based analysis of inflammatory cytokines (IFN γ , TNF α , IL1- β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL17, S100A8, LTF, S100P, LY96, NRG1). In allergic (n = 7) and sensitized (n = 6) patients, histopathology revealed predominantly lymphocytic cell infiltrates and accompanying tissue fibrosis, whereas infected periprosthetic tissues (n = 5) showed a marked accumulation of neutrophil granulocytes. Non-allergic aseptic specimens (n = 5), however, were classified mostly as wear particle induced periprosthetic

membranes with respective macrophage recruitment and debris. Further molecular analysis showed significantly elevated tissue expression levels of Neuregulin 1 (NRG1) and whole blood Lactotransferrin (LTF) mRNA in allergic patients ($p=0,023$ and $p=0,019$, respectively). Both genes have been linked to immunological dysregulation and chronic inflammation, as is the case in hypersensitivity and allergy: NRG1 mutations correlate with increased plasma levels of auto antibodies and inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-8, and TNF- α , whereas elevated serum LTF can be found in atopic patients after allergen exposition. Thus, it can be assumed that the aforementioned genes may both serve as diagnostic tools in discerning allergic implant failure, particularly so serum LTF, which can easily be measured pre-operatively. In patients with PPIs, on the other hand, an array of three genes was significantly over-expressed: S100P ($p=0,004$), S100A8 ($p=0,007$), and lymphocyte antigen 96 (Ly96, $p=0,019$). S100P and S100A8 are both members of the S100 protein family, a group of 25 peptides that act as damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs), or endogenous alarmins, i.e., they are secreted by neutrophils after recognition of bacterial endotoxins and lipopolysaccharides. In addition, Ly96 encodes for MD-2, an important protein associated with toll-like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4) on the cell surface, enabling the recognition of Gram-positive and Gram-negative bacteria. In summary, our data suggest that S100P, S100A8, and Ly96 may be promising markers for the diagnosis of PPI. Further confirmation is therefore needed to validate the clinical usefulness of these genes.

6 Literaturverzeichnis

1. Pschyrembel W. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2011*. 262nd ed. (Bach M, ed.). Berlin: de Gruyter; 2010.
2. Zopf Y, Baenkler HW, Silbermann A, Hahn EG, Raithel M. The differential diagnosis of food intolerance. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(21):359-69; quiz 369-70; 4 p following 370. doi:10.3238/arztebl.2009.0359.
3. Huber B. 100 Jahre Allergie: Clemens von Pirquet - Sein Allergiebegriff und das ihm zugrunde liegende Krankheitsverständnis: Teil 1: Leben und Werk. *Wien Klin Wochenschr*. 2006;118(19-20):573-579. doi:10.1007/s00508-006-0701-3.
4. Gell PGH, Coombs RRA. *Clinical Aspects of Immunology*. Oxford: Blackwell; 1963.
5. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins And Cotran Pathologic Basis Of Disease (9th Edition). Philadelphia, PA Saunders, Ipswich, MA. 2014:1-1408.
6. Langen U, Schmitz R, Steppuhn H. Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*. 2013;56(5-6):698-706. doi:10.1007/s00103-012-1652-7.
7. Thyssen JP, Linneberg A, Menné T, Johansen JD. The epidemiology of contact allergy in the general population--prevalence and main findings. *Contact Dermatitis*. 2007;57(5):287-299. doi:10.1111/j.1600-0536.2007.01220.x.
8. Schäfer T, Böhler E, Ruhdorfer S, et al. Epidemiology of contact allergy in adults. *Allergy*. 2001;56(12):1192-1196. doi:10.1034/j.1398-9995.2001.00086.x.
9. DeKoven JG, Warshaw EM, Belsito D V, et al. North American Contact Dermatitis Group Patch Test Results: 2013-2014. *Dermat contact, atopic, Occup drug*. 2016. doi:10.1097/DER.0000000000000225.
10. Kalimo K, Mattila L, Kautiainen H. Nickel allergy and orthodontic treatment. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2004;18(5):543-545. doi:10.1111/j.1468-3083.2004.01014.x.
11. Noble J, Ahing SI, Karaikos NE, Wiltshire WA. Nickel allergy and orthodontics, a review and report of two cases. *Br Dent J*. 2008;204(6):297-300. doi:10.1038/bdj.2008.198.
12. Hallab N, Merritt K, Jacobs JJ. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A(3):428-436. doi:10.1111/j.1600-0536.2011.01886.x.
13. Thomas P, Gollwitzer H, Maier S, Rueff F. Osteosynthesis associated contact dermatitis with unusual perpetuation of hyperreactivity in a nickel allergic patient. *Contact Dermatitis*. 2006;54(4):222-225. doi:10.1111/j.0105-1873.2006.0775j.x.
14. Grimberg A, Jansson V, Liebs T, Melsheimer O, Steinbrück A. Endoprothesenregister Deutschland - Jahresbericht 2015. 2016:64. http://www.eprd.de/fileadmin/user_upload/Dateien/Publicationen/Berichte/EPRD-Jahresbericht_2015_FINAL_Web.pdf.
15. Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen GmbH. AQUA - Qualitätsreport 2014. 2015:216. <https://sqq.de/upload/CONTENT/Qualitaetsberichte/2014/AQUA-Qualitaetsreport-2014.pdf>.
16. Lohmann CH, Singh G, Willert H-G, Buchhorn GH. Metallic debris from metal-on-metal total hip arthroplasty regulates periprosthetic tissues. *World J Orthop*.

- 2014;5(5):660-666. doi:10.5312/wjo.v5.i5.660.
17. Korovessis P, Petsinis G, Repanti M, Repantis T. Metallosis after contemporary metal-on-metal total hip arthroplasty. Five to nine-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(6):1183-1191. doi:10.2106/JBJS.D.02916.
 18. Inacio MCS, Cafri G, Paxton EW, Kurtz SM, Namba RS. Alternative bearings in total knee arthroplasty: Risk of early revision compared to traditional bearings. *Acta Orthop.* 2013;84(2):145-152. doi:10.3109/17453674.2013.784660.
 19. Vertullo CJ, Lewis PL, Graves S, Kelly L, Lorimer M, Myers P. Twelve-Year Outcomes of an Oxinium Total Knee Replacement Compared with the Same Cobalt-Chromium Design. *J Bone Jt Surg.* 2017;99(4):275-283. doi:10.2106/JBJS.16.00092.
 20. Breusch SJ, Kühn KD. Knochenzemente auf basis von polymethylmethacrylat. *Orthopäde.* 2003;32(1):41-50. doi:10.1007/s00132-002-0411-0.
 21. Ethgen O, Bruyere O, Richy F, Dardennes C, Reginster JY. Health-related quality of life in total hip and total knee arthroplasty. A qualitative and systematic review of the literature. *J Bone Jt Surg Am.* 2004;86-A(5):963-974. doi:10.2106/00004623-200405000-00012.
 22. Scott CEH, Howie CR, MacDonald D, Biant LC. Predicting dissatisfaction following total knee replacement: a prospective study of 1217 patients. *J Bone Joint Surg Br.* 2010;92(9):1253-1258. doi:10.1302/0301-620X.92B9.24394.
 23. Bourne RB, Chesworth BM, Davis AM, Mahomed NN, Charron KDJ. Patient satisfaction after total knee arthroplasty: Who is satisfied and who is not? In: *Clinical Orthopaedics and Related Research.* Vol 468. ; 2010:57-63. doi:10.1007/s11999-009-1119-9.
 24. Khan M, Osman K, Green G, Haddad FS. The epidemiology of failure in total knee arthroplasty: avoiding your next revision. *Bone Joint J.* 2016;98-B(1):105-112. doi:10.1302/0301-620X.98B1.36293.
 25. Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry. Annual Report 2016. *Adelaide AOA.* 2016. <https://aoanjrr.sahmri.com/de/annual-reports-2016>.
 26. Thomsen M, Krenn V, Thomas P. [Adverse reactions to metal orthopedic implants after knee arthroplasty]. *Hautarzt.* 2016;67(5):347-351. doi:10.1007/s00105-016-3793-3.
 27. Bloemke A, Clarke H. Prevalence of Self-Reported Metal Allergy in Patients Undergoing Primary Total Knee Arthroplasty. *J Knee Surg.* 2014;28(3):243-246. doi:10.1055/s-0034-1381959.
 28. Fousereau J, Laugier P. Allergic eczemas from metallic foreign bodies. *Trans St Johns Hosp Dermatol Soc.* 1966;52(2):220-225.
 29. McKenzie AW, Aitken C V, Ridsdill-Smith R. Urticaria after insertion of Smith-Petersen Vitallium nail. *Br Med J.* 1967;4(5570):36.
 30. Symeonides PP, Paschaloglou C, Papageorgiou S. An allergic reaction after internal fixation of a fracture using a vitallium plate. *J Allergy Clin Immunol.* 1973;51(4):251-252.
 31. Post ZD, Orozco FR, Ong AC. Metal sensitivity after TKA presenting with systemic dermatitis and hair loss. *Orthopedics.* 2013;36:e525-8. doi:10.3928/01477447-20130327-35.
 32. Bergschmidt P, Bader R, Mittelmeier W. Metal hypersensitivity in total knee arthroplasty: revision surgery using a ceramic femoral component - a case report. *Knee.* 2012;19(2):144-147. doi:10.1016/j.knee.2011.01.001.
 33. Gupta R, Phan D, Schwarzkopf R. Total knee arthroplasty failure induced by metal hypersensitivity. *Am J Case Rep.* 2015;16:542-547.

- doi:10.12659/AJCR.893609.
34. Goodman SB. Does the immune system play a role in loosening and osteolysis of total joint replacements? *J Long Term Eff Med Implant.* 1996;6(2):91-101.
 35. Goodman SB. Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. *Biomaterials.* 2007;28(34):5044-5048. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.06.035.
 36. Amstutz HC, Campbell P, Kossovsky N, Clarke IC. Mechanism and clinical significance of wear debris-induced osteolysis. *Clin Orthop Relat Res.* 1992;(276):7-18. doi:10.1097/00003086-199203000-00003.
 37. Hirakawa K, Bauer TW, Stulberg BN, Yamaguchi M, Koshino T, Saito T. Wear Debris Analysis for Total Hip and Total Knee Arthroplasty. In: *Joint Arthroplasty.* Tokyo: Springer Japan; 1999:36-45. doi:10.1007/978-4-431-68529-6_4.
 38. Abu-Amer Y, Darwech I, Clohisy JC. Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S6. doi:10.1186/ar2170.
 39. Gallo J, Goodman SB, Kontinen YT, Wimmer MA, Holinka M. Osteolysis around total knee arthroplasty: A review of pathogenetic mechanisms. *Acta Biomater.* 2013;9(9):8046-8058. doi:10.1016/j.actbio.2013.05.005.
 40. Hennig FF, Raithel HJ, Schaller KH, Döhler JR. Nickel-, chrom- and cobalt-concentrations in human tissue and body fluids of hip prosthesis patients. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 1992;6(4):239-243.
 41. Luetzner J, Krummenauer F, Lengel AM, Ziegler J, Witzleb W-C. Serum metal ion exposure after total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;461(461):136-142. doi:10.1097/BLO.0b013e31806450ef.
 42. Kretzer JP, Reinders J, Sonntag R, et al. Wear in total knee arthroplasty - Just a question of polyethylene?: Metal ion release in total knee arthroplasty. *Int Orthop.* 2014;38(2):335-340. doi:10.1007/s00264-013-2162-4.
 43. Morawietz L, Classen RA, Schroder JH, et al. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol.* 2006;59(6):591-597. <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2005.027458>. doi:10.1136/jcp.2005.027458.
 44. Krenn V, Morawietz L, Perino G, et al. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract.* 2014;210(12):779-786. doi:10.1016/j.prp.2014.09.017.
 45. Thomas P, Summer B, Krenn V, Thomsen M. [Allergy diagnostics in suspected metal implant intolerance]. *Orthopade.* 2013;42(1433-0431 (Electronic)):602-606. doi:10.1007/s00132-012-2033-5.
 46. Thomas P, Ständer S, Stauner K, et al. Arthroplasty patients and nickel sensitization: What do patch test and lymphocyte transformation test tell us. *Semin Arthroplasty.* 2013;24(4):261-264. doi:10.1053/j.sart.2014.01.012.
 47. Summer B, Stander S, Kapp F, Thomas P. [Role of the lymphocyte transformation test in the evaluation of metal sensitization]. *Hautarzt.* 2016;67(5):380-384. doi:10.1007/s00105-016-3791-5.
 48. Hallock K, Vaughn N, Juliano P, Marks J. Metal Hypersensitivity and Orthopedic Implants: Survey of Orthopedic Surgeons. *Dermatitis.* 2017;28(1):76-80. doi:10.1097/DER.0000000000000236.
 49. Thomas B, Kulichova D, Wolf R, Summer B, Mahler V, Thomas P. High frequency of contact allergy to implant and bone cement components, in particular gentamicin, in cemented arthroplasty with complications: Usefulness of late patch test reading. *Contact Dermatitis.* 2015;73(6):343-349.

- doi:10.1111/cod.12465.
50. Wittmann D, Summer B, Thomas B, Halder A, Thomas P. Gentamicin allergy as an unexpected “hidden” cause of complications in knee arthroplasty. *Contact Dermatitis*. 2018;78(4):293-294. doi:10.1111/cod.12930.
 51. Thomas P, Von Der Helm C, Schopf C, et al. Patients with intolerance reactions to total knee replacement: Combined assessment of allergy diagnostics, periprosthetic histology, and peri-implant cytokine expression pattern. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/910156.
 52. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(4):984-1010. doi:10.1016/j.jaci.2016.06.033.
 53. Saulnier M, Huang S, Aguet M, Ryffel B. Role of interferon-gamma in contact hypersensitivity assessed in interferon-gamma receptor-deficient mice. *Toxicology*. 1995;102:301-312. doi:10.1016/0300-483X(95)03101-K.
 54. Vocanson M, Hennino A, Chavagnac C, et al. Contribution of CD4(+) and CD8(+) T-cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2005;1(1):75-86. doi:10.1586/1744666X.1.1.75.
 55. Hoefakker S, Caubo M, van 't Erve EHM, et al. In vivo cytokine profiles in allergic and irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1995;33(4):258-266. doi:10.1111/j.1600-0536.1995.tb00478.x.
 56. Falsafi-Amin H, Lundeborg L, Bakhiet M, Nordlind K. Early DNA synthesis and cytokine expression in the nickel activation of peripheral blood mononuclear cells in nickel-allergic subjects. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;123(2):170-176. doi:10.1159/000024437.
 57. Williams S, Ryan C, Jacobson C. Agrin and neuregulin, expanding roles and implications for therapeutics. *Biotechnol Adv*. 2008;26(3):187-201. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.11.003.
 58. Marballi K, Quinones MP, Jimenez F, et al. In vivo and in vitro genetic evidence of involvement of neuregulin 1 in immune system dysregulation. *J Mol Med*. 2010;88(11):1133-1141. doi:10.1007/s00109-010-0653-y.
 59. Brock JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol*. 2002;80(1):1-6. doi:10.1139/o01-212.
 60. Kruzel ML, Zimecki M, Actor JK. Lactoferrin in a context of inflammation-induced pathology. *Front Immunol*. 2017;8(NOV). doi:10.3389/fimmu.2017.01438.
 61. Bournazou I, Mackenzie KJ, Duffin R, Rossi AG, Gregory CD. Inhibition of eosinophil migration by lactoferrin. *Immunol Cell Biol*. 2010;88(2):220-223. doi:10.1038/icb.2009.86.
 62. Zimecki M, Artym J, Kocięba M, Kruzel M. Effects of lactoferrin on elicitation of the antigen-specific cellular and humoral cutaneous response in mice. *Postepy Hig Med Dosw*. 2012;66(501):16-22. doi:10.5604/17322693.975145.
 63. Zimecki M, Artym J, Kocięba M, Kaleta-Kuratewicz K, Kruzel ML. Lactoferrin restrains allergen-induced pleurisy in mice. *Inflamm Res*. 2012;61(11):1247-1255. doi:10.1007/s00011-012-0522-y.
 64. Choi GS, Shin SY, Kim JH, et al. Serum lactoferrin level as a serologic biomarker for allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(3):403-410. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03414.x.
 65. Ehrchen JM, Sunderkotter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):557-566.

- doi:10.1189/jlb.1008647.
66. Donato R, Cannon B, Sorci G, et al. Functions of S100 Proteins. *Curr Mol Med*. 2013;13(1):24-57. doi:10.2174/156652413804486214.
 67. Gross SR, Sin CGT, Barraclough R, Rudland PS. Joining S100 proteins and migration: For better or for worse, in sickness and in health. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(9):1551-1579. doi:10.1007/s00018-013-1400-7.
 68. Gazzar M El. Immunobiology of S100A8 and S100A9 Proteins and Their Role in Acute Inflammation and Sepsis. *Int J Immunol Immunother*. 2015;2(2). doi:10.1007/3-540-26616-X_14.
 69. Payen D, Lukaszewicz A-C, Belikova I, Faivre V. Gene profiling in human blood leucocytes during recovery from septic shock. *Intensive Care Med*. 2008;34:1371-1376. doi:10.1007/s00134-008-1048-1.
 70. Fontaine M, Pachot A, Larue A, et al. Delayed increase of S100A9 messenger RNA predicts hospital-acquired infection after septic shock*. *Crit Care Med*. 2011;39(12). doi:10.1097/CCM.0b013e3182282a40.
 71. Fontaine M, Planel S, Peronnet E, Turrel-davin F, Piriou V. S100A8 / A9 mRNA Induction in an Ex Vivo Model of Endotoxin Tolerance : Roles of IL-10 and IFN γ . *PLoS One*. 2014;9(6):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0100909.
 72. Wouthuyzen-Bakker M, Ploegmakers JJW, Kampinga GA, Wagenmakers-Huizenga L, Jutte PC, Muller Kobold AC. Synovial calprotectin. *Bone Jt J*. 2017;99B(5):660-665. doi:10.1302/0301-620X.99B5.BJJ-2016-0913.R2.
 73. Aggarwal VK, Bakhshi H, Ecker NU, Gehrke T, Kendoff D. Organism Profile in Periprosthetic Joint Infection: Pathogens Differ at Two Arthroplasty Infection Referral Centers in Europe and in the United States. *J Knee Surg*. 2014;27(5):6-12.
 74. Guo G, Wang J, You Y, Tan J, Shen HAO. Distribution characteristics of Staphylococcus spp . in different phases of periprosthetic joint infection: A review. *Exp Ther Med*. 2017;13(26):2599-2608. doi:10.3892/etm.2017.4300.
 75. Dziarski R, Wang Q, Miyake K, Kirschning CJ, Gupta D. MD-2 Enables Toll-Like Receptor 2 (TLR2)-Mediated Responses to Lipopolysaccharide and Enhances TLR2-Mediated Responses to Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria and Their Cell Wall Components. *J Immunol*. 2001;166(3):1938-1944. doi:10.4049/jimmunol.166.3.1938.
 76. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol*. 2004;12(4):186-192. doi:10.1016/j.tim.2004.02.009.
 77. Fitzgerald KA, Rowe DC, Golenbock DT. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD-2 complex. *Microbes Infect*. 2004;6(15):1361-1367. doi:10.1016/j.micinf.2004.08.015.
 78. Tissières P, Dunn-Siegrist I, Schächli M, et al. Soluble MD-2 is an acute-phase protein and an opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood*. 2008;111(4):2122-2131. doi:10.1182/blood-2007-06-097782.
 79. Pugin J, Stern-Voefferay S, Daubeuf B, Matthay MA, Elson G. Soluble MD-2 activity in plasma from patients with severe sepsis and septic shock. *Blood*. 2004;104(13):4071-4080. doi:10.1182/blood-2003-04-1290.
 80. Viriyakosol S, Mccray PB, Ashbaugh ME, Chu J. Characterization of Monoclonal Antibodies to Human Soluble MD-2 Protein. *Hybridoma*. 2006;25(6):349-357. doi:10.1089/hyb.2006.25.349.

7 Veröffentlichung I

Thomas B, Kulichova D, Wolf R, Summer B, Mahler V, Thomas P. High frequency of contact allergy to implant and bone cement components, in particular gentamicin, in cemented arthroplasty with complications: Usefulness of late patch test reading. *Contact Dermatitis*. 2015;73(6):343-349.

High frequency of contact allergy to implant and bone cement components, in particular gentamicin, in cemented arthroplasty with complications: usefulness of late patch test reading

Benjamin Thomas^{1,2}, Daniela Kulichova¹, Ronald Wolf¹, Burkhard Summer¹, Vera Mahler² and Peter Thomas¹

¹Department of Dermatology and Allergology, Ludwig-Maximilians-University, 80337 Munich, Germany and ²Department of Dermatology, University Hospital of Erlangen, Friedrich-Alexander-University, 91054 Erlangen, Germany

doi:10.1111/cod.12465

Summary

Background. Arthroplasty patients with complications may be sensitized to implant components.

Objectives. To quantify patch test reactions to implant materials in aseptic cemented arthroplasty patients with complications, and to evaluate the benefit of late patch test reading at D6.

Methods. Analyses of patch test reactions to baseline series and bone cement components and of the questionnaire-aided histories of 250 consecutive patients with suspected implant allergy were performed. Patch tests were read at D2, D3, and D6.

Results. There were 187 positive reactions to the 29 allergens of the baseline series, and 52 to the seven allergens of the bone cement series. Forty-nine of 250 patients reacted to the bone cement series. In contrast to 'early allergens' such as fragrance mix, late reading at D6 increased the number of positive reactions by 11/32 for nickel, 1/5 for cobalt, and 2/4 for chromium. With bone cement components, most reactions were to gentamicin (25 of 250 patients), and 17 of 25 appeared only at D6.

Conclusion. Late reading is useful for patch tests with metals and bone cement components. With only D2/D3 readings, 32 reactions to nickel, cobalt, chromium and bone cement components would have been missed. This underlines the utility of late reading in general and in complicated cemented arthroplasty patients, given the unexpectedly high number of gentamicin reactions.

Key words: allergy; bone cement; gentamicin; implant; late reaction; metal; nickel; patch test.

Artificial joint replacements are increasingly being performed, and for the large majority of patients this means an improvement in the quality of life. However, with

the increasing use of arthroplasty, a growing number of complications, for example implant failure and subsequent revision surgery, are to be expected. In 2011, the respective numbers of total hip replacements (THRs) and total knee replacements (TKRs) were reported to be 465 034 and 702 415 in the United States, and 232 320 and 168 486 in Germany (1) – approximately 9% of these were complication-related revision operations. Apart from infections and mechanical reasons, adverse reactions to implant components may also account for implant failure (2, 3). Accordingly, allergy to nickel, cobalt and chromium has been found in association with

Correspondence: Peter Thomas, Department of Dermatology and Allergology, Ludwig-Maximilians-University, Frauenlobstrasse 9-11, D-80337 Munich, Germany. Tel: +49 89 4400 56178; Fax: +49 89 4400 56158. E-mail: Peter.Thomas@med.uni-muenchen.de

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interests.

Accepted for publication 25 July 2015

implant-related dermatitis, persistent pain and swelling, recurrent effusions, and even aseptic loosening (4, 5). 'CoCrMo' alloy indicates the three major components of the different metals contained in this very frequently used implant alloy: cobalt (~65%), chromium (~28%), and molybdenum (~6%). All of the CoCrMo alloys also contain up to 1% nickel. In addition to alloy metals, bone cement constituents may potentially become relevant allergens (6, 7). Bone cements are typically polymethylmethacrylate (PMMA)-based, and result from mixing a liquid and a powdery component. The liquid contains acrylate monomers [e.g. methylmethacrylate (MMA)], activators (e.g. *N,N*-dimethyl-*p*-toluidine), inhibitors (e.g. hydroquinone), and colorants (e.g. chlorophyll-copper complex). The powder is made of acrylate polymer (e.g. PMMA) and benzoyl peroxide as an initiator (8, 9), so that all acrylate-based bone cements initially contain benzoyl peroxide; antibiotics – commonly gentamicin – are often added to prevent peri-implant infection (10), and radio-contrasting substances (such as zirconium oxide) are added to enhance visibility in radiography. Several of these substances found in bone cement are well-known allergens in other areas of application, for example acrylates in dental medicine (11, 12).

For several years, we have been running an outpatient clinic for suspected metal implant allergy patients. Most of the patients present with otherwise unexplained complicated artificial joint replacement. In the case of cemented arthroplasties, we have regularly included a bone cement test series in our patch test series. In general, two readings of patch test reactions are recommended, for example on D2 and D3 (13). As allergic patch test reactions to certain allergens, for example neomycin, cobalt, and gold salts, are known to potentially appear later (14–16), we decided to perform a third late reading on D6. In this study, we investigated, for the first time, the outcome of an additional late reading and its usefulness in detecting allergic sensitization to implant materials, in a large consecutive series of 250 patients with complications after cemented arthroplasty. On the basis of this study, we report an unexpectedly high number of positive patch test reactions exclusively seen on D6 – in particular to gentamicin, a frequently used bone cement additive.

Materials and Methods

Patients

Patch test data from 250 consecutive cemented arthroplasty-bearing patients suspected of having allergic reactions to the implant materials were analysed. The study period was from August 2010 to September 2013.

All 250 patients had a CoCrMo-based arthroplasty (189 TKRs; 61 THRs), 94 without and 30 with known titanium components; in 126, the presence of titanium components was unclear. The mean age was 64.8 years (range, 37–84 years), and 164 (65.6%) patients were female. The majority were patients with a first (primary) arthroplasty – 191 of 250. Fifty-nine patients had already undergone revision of the symptomatic joint, but had (otherwise unexplained) symptoms with the subsequent joint replacement, and were then sent for allergy work-up.

Of the 250 patients, 183 had no other metal implant. Of the 67 patients with other metal implants, 16 had problems with the other implant. Ten symptomatic knee arthroplasty patients had also undergone hip arthroplasty (9 of 10 symptom-free); 18 symptomatic knee arthroplasty patients had also undergone contralateral knee arthroplasty, of whom 8 were also symptomatic. A questionnaire-aided history was taken, and supplemented with information from the surgery protocol and implant passport, if available. Furthermore, a set of standardized questions, that is, the orthopaedic Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index questionnaire, was used to quantify the patient's self-reported view of the artificial joint performance, including items for pain, stiffness, and functional limitation (17). 'Classic' complication elicitors such as infection and mechanical causes had been previously excluded by the referring orthopaedic surgeons.

Our investigation was approved by the local ethics committee.

Allergens and patch testing

For testing, we used Almirall Hermal patch test preparations and Finn Chambers® on Scanpor® tape (Almirall Hermal, Reinbek, Germany). The substances were applied on the upper back on D0. Testing was started on Tuesdays. In accordance with the German Contact Dermatitis Research Group (DKG) criteria (13), the baseline series with 29 allergens and a routine supplemental series were tested in all patients. The supplemental series also contained neomycin sulfate, among other substances. In addition, a bone cement component series was tested.

Bone cement component series. Being available as standardized preparations, the following seven constituents were tested: 2-hydroxyethylmethacrylate 1.0% pet., copper(II) sulfate 1.0% aq., benzoyl peroxide 1.0% pet., gentamicin sulfate 20% pet., hydroquinone 1.0% pet., *N,N*-dimethyl-*p*-toluidine 2.0% pet., and MMA 2.0% pet.

Patch test reading. The reading was performed by physicians of the allergy unit, but not by the same physician who

initially saw the patient, in order to exclude an examiner bias. Test reading was performed in accordance with the guidelines of the DKG (13) on D2, D3, and additionally on D6, that is, on Monday of the subsequent week. The reactions reported as positive in this article were reactions classified as +, ++, and +++.

When patients showed a positive reaction to gentamicin sulfate, the records were checked, and – if necessary – the referring orthopaedic surgeon was contacted to ensure that the arthroplasty had been fixed with gentamicin-loaded bone cement.

Results

History of contact allergy to metals

Of the 250 patients, 72 had a history of 'problems' (such as pruritus, erythema, and eczema) upon skin contact with metallic articles such as jean buttons, wristwatches, and jewellery. However, only a minority of them had been patch tested in the past. In total, 48 of the 250 patients had been patch tested in the past, for several reasons. Among those 48, 21 had a proven metal allergy: 13 to nickel, 6 to cobalt, 2 to chromium, 1 to copper, 2 to palladium, and 2 to gold (some patients had more than one metal allergy found).

Patient complaints

The patient arthroplasty-related complaints – sometimes, more than one applied to an individual patient – were pain (90.5%), reduced range of motion (74%), swelling (67.5%), effusions (29%), loosening (16.5%), and arthroplasty-associated eczema (5.5%).

Patch test reactions

Of the 250 patients, 112 had no patch test reactions. Seventy-three had one reaction, 31 had two reactions, 17 had three reactions, and 17 had four or more reactions (in the last of these, reactions to related allergen preparations, for example related to fragrances, were commonly found).

Baseline series. The 250 patients had a total of 187 positive reactions to contact allergens of the baseline series. Among these, 25 appeared beyond D3, and were found only at the D6 reading. The allergens with the most frequently occurring delayed reactions beyond D3 were – apart from a few reactors to formaldehyde and jasmine absolute – potassium dichromate (50%), colophonium and Ylang-Ylang oil (40% each), nickel sulfate (34.4%), and lanolin alcohol (33.3%). With regard to

the three metal implant constituents cobalt, chromium, and nickel, the total numbers of positive reactions were, respectively, 5/250, 4/250, and 32/250. The data are summarized in Table 1.

Bone cement component series. A total of 49 of 250 patients reacted to one or more bone cement constituents. Positive reactions were predominantly found for two allergens: gentamicin sulfate (25/250; 10%) and benzoyl peroxide (9%). However, combined reactions to both were found in only 2 patients. Furthermore, only very few patients had positive reactions to other bone cement components. Table 2 gives an overview. In the 25 patients who reacted to gentamicin, it could be confirmed by the implant passport and/or by the referring orthopaedic surgeon that gentamicin-loaded bone cement had been used.

Increase in the number of positive reactions with an additional D6 reading

Table 3 shows the allergens with newly positive reactions at D6. However, the small sample size may result in an unjustified emphasis on reactions gained at the D6 reading. Thus, we focused only on allergens with positive reactions in at least 4 patients. The greatest number of newly positive reactions to any allergen was observed with gentamicin sulfate, that is, 17 of 25 (68%). The allergen with the second highest number of newly positive reactions was nickel(II) sulfate. Of the 32 positive reactions to this allergen, 11 (34.4%) appeared at D6. For colophonium, newly positive reactions occurred in 4 of 10 patients. Figure 1 shows a representative patient with a newly positive reaction to gentamicin sulfate.

Analysis of subgroups

We were interested in whether reactivity to neomycin sulfate was paralleled by positive reactions to gentamicin. However, of the 8 patients who reacted to neomycin sulfate, only 2 also reacted to gentamicin. Benzoyl peroxide elicited positive patch test reactions in 23 patients, and gentamicin in 25. In contrast, only 2 patients reacted both to benzoyl peroxide and gentamicin. In addition, global reactivity to bone cement components (49 patients) and implant metals, namely nickel (32 patients), was parallel as only 7 patients reacted to both, implant metals and bone cement components. The overall percentages of patients who were allergic to metals/to any bone cement components were 13.6%/21.5% among the 191 patients with primary arthroplasty, and 20.3%/13.6% among the 59 patients with preceding revision of the symptomatic joint. The overall percentages of patients who reacted to gentamicin and benzoyl peroxide, respectively, were 11%

Table 1. Positive reactions to 29 baseline series allergen preparations at D2, D3 and D6 in 250 patients with complicated cemented arthroplasty

Allergen	Concentration	Vehicle	D2	D3	D6	Total positive reactions (n)	Positive reactions only at D6	
							n	%
Potassium dichromate	0.50%	pet.	0	2	4	4	2	50
Thiuram mix	1.0%	pet.	0	2	1	2	0	0
Cobalt(II) chloride.6H ₂ O	1.0%	pet.	1	4	5	5	1	20
<i>Myroxylon perei</i>	25%	pet.	3	25	9	25	0	0
Colophonium	20%	pet.	2	6	10	10	4	40
<i>N</i> -isopropyl- <i>N'</i> -phenyl- <i>p</i> -phenylenediamine	0.10%	pet.	0	1	1	1	0	0
Lanolin alcohol	30%	pet.	0	2	3	3	1	33.3
Mercapto mix	1.0%	pet.	0	4	3	4	0	0
Epoxy resin	1.0%	pet.	3	6	7	7	1	14.3
Nickel(II) sulfate.6H ₂ O	5.0%	pet.	5	21	32	32	11	34.4
<i>p</i> -tert-Butylphenol formaldehyde resin	1.0%	pet.	0	0	0	0	0	0
Formaldehyde	1.0%	aq.	0	0	1	1	1	100
Fragrance mix I	8.0%	pet.	15	35	27	35	0	0
Turpentine	10%	pet.	1	1	1	1	0	0
Methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone	100 ppm	aq.	0	7	6	7	0	0
Paraben mix	16%	pet.	1	1	1	1	0	0
Cetearyl alcohol	20%	pet.	0	0	0	0	0	0
Zinc diethyldithiocarbamate	1.0%	pet.	0	0	0	0	0	0
Methyldibromo glutaronitrile	0.20%	pet.	0	5	1	5	0	0
Propolis	10%	pet.	4	10	6	10	0	0
Bufexamac	5.0%	pet.	0	0	0	0	0	0
Compositae mix II	5.0%	pet.	0	1	1	1	0	0
Mercaptobenzothiazole	2.0%	pet.	0	1	1	1	0	0
Hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldehyde	5.0%	pet.	0	7	3	7	0	0
2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol	0.50%	pet.	0	1	1	1	0	0
Fragrance mix II	14%	pet.	1	13	13	13	0	0
Ylang Ylang (I + II) oil	10%	pet.	0	3	5	5	2	40
Sandalwood oil	10%	pet.	1	4	2	4	0	0
Jasmine absolute	5.0%	pet.	0	0	2	2	2	100

Table 2. Positive reactions to seven bone cement components at D2, D3 and D6 in 250 patients with complicated cemented arthroplasty

Allergen	Concentration (%)	Vehicle	D2	D3	D6	Total positive reactions (n)	Positive reactions only at D6	
							n	%
2-Hydroxyethylmethacrylate	1.0	pet.	0	1	1	1	0	0
Copper(II) sulfate.5H ₂ O	1.0	aq.	0	0	0	0	0	0
Benzoyl peroxide	1.0	pet.	0	23	10	23	0	0
Gentamicin sulfate	20	pet.	0	8	25	25	17	68
Hydroquinone	1.0	pet.	0	1	0	1	0	0
<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -toluidine	2.0	pet.	0	0	0	0	0	0
Methylmethacrylate	2.0	pet.	0	1	2	2	1	50

and 10.5% among the patients with primary arthroplasty, and 6.8% and 10.2% among the patients with revised arthroplasty.

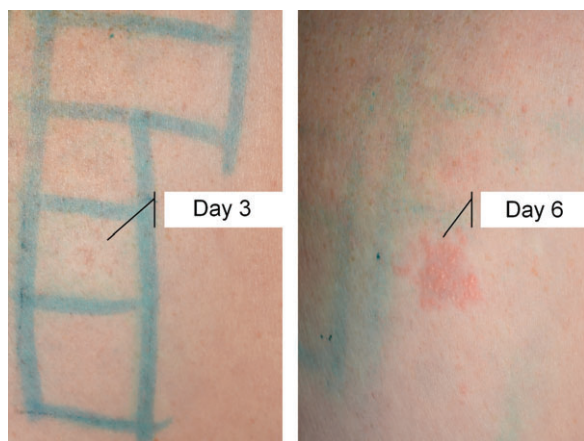
Discussion

To our knowledge, this is the first investigation assessing the patch test reactions to bone cement components in

complicated cemented arthroplasty in a large patient series. The retrospective analysis showed a high proportion, that is, 49 of 250, of patients with patch test reactions to bone cement components, in particular to gentamicin. Furthermore, the results of this study confirm the high relevance of delayed patch test reading, even though it is more burdensome for older people hindered by arthroplasty complications. With regard to

Table 3. Allergens with increases in the number of positive reactions at the late D6 reading, as compared with the D2/D3 reading

Allergen	Concentration (%)	Vehicle	D2/D3 (n)	D6 (n)	Increase (%)
Potassium dichromate	0.5	pet.	2	4	50
Cobalt(II) chloride.6H ₂ O	1.0	pet.	4	5	20
Colophonium	20	pet.	8	10	20
Epoxy resin	1.0	pet.	6	7	14.3
Nickel(II) sulfate.6H ₂ O	5.0	pet.	21	32	34.4
Ylang Ylang (I + II) oil	10	pet.	3	5	40
Gentamicin sulfate	20	pet.	8	25	68

**Fig. 1.** Positive reactions to gentamicin sulfate (comparison of D3 and D6 readings in the same patient).

gentamicin, more than two-thirds of the allergic patients would not have been identified within the usual testing time span. Further analysis of our data showed that metallic implant constituents, such as chromium, cobalt, and nickel, are also possible 'late allergens'. This is in line with previous reports (14, 15, 18–20). Neomycin sulfate is also well known for its ability to give late patch test reactions (15, 20, 21). However, we observed that reactions to gentamicin sulfate were mostly unrelated to neomycin sulfate sensitization.

In the arthroplasty patients tested here, complications such as pain, recurrent effusions, reduced range of motion, eczema or loosening had not previously been explained by orthopaedic diagnostic work-up. Thus, suspected implant intolerance reactions led to patch testing. However, positive reactions to implant components need to be evaluated for their clinical relevance. First, there should be ongoing exposure to the allergen in question. With regard to chromium, cobalt, and nickel, it is well known that both corrosion and wear particle formation lead to chronic internal exposure (22–24). Bone cement constituents may also be released. Both wear particles – produced by micro-movement of the

implanted device – and leakage of components might account for this. The role of benzoyl peroxide is controversial. Theoretically, it should be consumed by acrylate polymerization, and sensitization should therefore only occur, if at all, upon massive exposure in the course of *in vivo* cementing. Thus, the clinical significance of detected sensitization to benzoyl peroxide needs to be critically questioned. However, the presence of some residual benzoyl peroxide cannot be excluded, as exemplified by analysis of residual constituents such as hydroquinone, MMA and benzoyl peroxide in dental resins/bone cement (25–27). Correspondingly, Bircher et al. described a series of patients with arthroplasty complications, patch test reactions to benzoyl peroxide and symptom relief after bone cement-free arthroplasty replacement (28). However, the high irritative potential of benzoyl peroxide in patch testing has to be considered. On the other hand, as yet unpublished data (summarized in the doctoral thesis of C. Daun) may serve as a comparison: in 112 patients with suspected allergy to dental materials (oral lichen planus, stomatitis, glossodynia, and perioral eczema) tested in our same department in Munich and evaluated by the same staff and in almost the same time period, only two positive reactions to benzoyl peroxide were found. In contrast, gentamicin-loaded bone cement is designed for long-term prevention of periprosthetic infection (29, 30), and gentamicin release is therefore intended. In 1980, Wahlig and Dingeldein reported that, in peri-implant tissue samples, 'high gentamicin concentrations were measurable for a long period of time (up to 5.5 years)' (31). Of course, only a few cases have been reported in which bone cement components such as acrylates, *N,N*-dimethyl-*p*-toluidine, gentamicin or, rarely, benzoyl peroxide were suspected to have provoked arthroplasty complications (6, 7, 32, 33). Second, the clinical relevance of a detected contact allergy should be evaluated. Higher frequencies of cobalt, chromium and nickel allergy have been described in patients with arthroplasty failure than in symptom-free arthroplasty patients (34–36). Some patient series showing symptom relief after revision surgery with alternative/surface-coated implants have

been reported (37–39). By comparing symptom-free and complicated arthroplasty patients with regard to bone cement components, we previously found gentamicin contact allergy to be present only in the latter patient group (36). This observation prompted us to analyse a larger cohort of patients, in whom we extended patch test evaluation to a D6 reading. In the case of detected gentamicin contact allergy, patients were asked whether they recalled having used gentamicin-containing topical medicaments or remember any local ‘problems’ after the use of ‘antibiotic’ eyedrops/ointments etc. (if applied). Finally, in the case of detected gentamicin contact allergy (in 25 patients), we checked the records to ensure that, in those patients, gentamicin-containing bone cement was used. It should be stated that arthroplasty patients – at least in Germany – do not always have an ‘arthroplasty passport’, and are not followed by the same orthopaedic surgeon who initially performed the arthroplasty, so patient records with more detailed information on the materials and type of bone cement used are not always easily available. However, in the case of our patients, information on arthroplasty type and the use of bone cement was compulsory prior to testing. We are well aware that such patients are more time-consuming to follow, and that an additional appointment for a D6 reading is burdensome for them. However, the results presented here emphasize that late reading is important, because many positive reactions – in particular to metals and gentamicin as typical bone cement component – would have been missed completely. This finding may have

important implications, as it supports both a longer period of observation of patch tested patients in general, and considering gentamicin as a potential elicitor of complications in cemented arthroplasty. We would not generally propose changing an arthroplasty on the basis of only a positive patch test reaction. In general, we feel that (i) in patients with symptomatic arthroplasties, ‘common’ aetiologies, such as malpositioning, malalignment, infection, and neurology-related pain should first be excluded by the treating orthopaedic surgeons, and (ii) the severity of symptoms should direct the decision regarding implant exchange. With regard to gentamicin, we can give the patients a medical report indicating that – in the absence of alternative ‘problem elicitors’ – the gentamicin allergy might be a potential elicitor of the patient’s implant complication (under the above-discussed conditions). If the severity of symptoms leads to a decision to perform implant exchange – and this is always to be decided by the treating orthopaedic surgeon – we would recommend the use of bone cement without gentamicin.

Finally, it is encouraging that dermatology-allergists can substantially contribute to the interdisciplinary work-up of suspected ‘implant intolerance reactions’.

Acknowledgement

We want to dedicate this manuscript to Professor Bernhard Przybilla on the occasion of his 65th birthday. In his role as head of the allergy department, he has promoted discussion on ‘implant allergy’.

References

- Wengler A, Nimptsch U, Manky T. Hip and knee replacement in Germany and the USA – analysis of individual inpatient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011. *Arztebl Int* 2014; **111**: 407–416.
- Fitzgerald SJ, Trousdale R T. Why knees fail in 2011: patient, surgeon, or device? *Orthopedics* 2011; **34**: e513–e515.
- Sharkey P F, Hozack W J, Rothman R H, Shastri S, Jacoby S M. Insall Award paper. Why are total knee arthroplasties failing today? *Clin Orthop Relat Res* 2002; **404**: 7–13.
- Basko-Plluska J L, Thyssen J P, Schalock P C. Cutaneous and systemic hypersensitivity reactions to metallic implants. *Dermatitis* 2011; **22**: 65–79.
- Thomas P, Summer B. Diagnosis and management of patients with allergy to metal implants. *Expert Rev Clin Immunol* 2015; **11**: 501–509.
- Haddad F S, Cobb A G, Bentley G, Levell N J, Dowd P M. Hypersensitivity in aseptic loosening of total hip replacements. The role of constituents of bone cement. *J Bone Joint Surg* 1996; **78**: 546–549.
- Thomas P, Schuh A, Eben R, Thomsen M. Allergy to bone cement components. *Orthopade* 2008; **37**: 117–120.
- Breusch S J, Kuhn K D. Bone cements based on polymethylmethacrylate. *Orthopade* 2003; **32**: 41–50.
- Kühn K. In: *PMMA Cements*, Kraplow D (ed): Berlin, Heidelberg, Springer Medizin, 2014: 21–30.
- Joseph T N, Chen A L, Di Cesare P E. Use of antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg* 2003; **11**: 38–47.
- Drucker A M, Pratt M D. Acrylate contact allergy: patient characteristics and evaluation of screening allergens. *Dermatitis* 2011; **22**: 98–101.
- Goon A T, Isaksson M, Zimerson E, Goh C L, Bruze M. Contact allergy to (meth)acrylates in the dental series in southern Sweden: simultaneous positive patch test reaction patterns and possible screening allergens. *Contact Dermatitis* 2006; **55**: 219–226.
- Schnuch A, Aberer W, Agathos M et al. Performing patch testing with contact allergens. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008; **6**: 770–775.
- Geier J, Gefeller O, Wiechmann K, Fuchs T. Patch test reactions at D4, D5 and D6. *Contact Dermatitis* 1999; **40**: 119–126.
- Madsen J T, Andersen K E. Outcome of a second patch test reading of TRUE Tests® on D6/7. *Contact Dermatitis* 2013; **68**: 94–97.
- Mitchell J C. Day 7 (D7) patch test reading – valuable or not? *Contact Dermatitis* 1978; **4**: 139–141.
- Stucki G, Meier D, Stucki S et al. Evaluation of a German version of

- WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities) Arthrosis Index. *Z Rheumatol* 1996; **55**: 40–49.
- 18 Ahlgren C, Isaksson M, Möller H, Axell T, Liedholm R, Bruze M. The necessity of a test reading after 1 week to detect late positive patch test reactions in patients with oral lichen lesions. *Clin Oral Investig* 2014; **18**: 1525–1531.
 - 19 Davis MD, Wang MZ, Yiannias J A et al. Patch testing with a large series of metal allergens: findings from more than 1,000 patients in one decade at Mayo Clinic. *Dermatitis* 2011; **22**: 256–271.
 - 20 Macfarlane A W, Curley R K, Graham R M, Lewis-Jones M S, King C M. Delayed patch test reactions at days 7 and 9. *Contact Dermatitis* 1989; **20**: 127–132.
 - 21 Massone L, Anonide A, Borghi S, Isola V. 4-day patch test reactions to neomycin and formaldehyde. *Contact Dermatitis* 1989; **21**: 344–345.
 - 22 Hart A J, Sabah S A, Bandi A S et al. Sensitivity and specificity of blood cobalt and chromium metal ions for predicting failure of metal-on-metal hip replacement. *Br J Bone Joint Surg Am* 2011; **93**: 1308–1313.
 - 23 Langton DJ, Joyce TJ, Jameson S S et al. Adverse reaction to metal debris following hip resurfacing: the influence of component type, orientation and volumetric wear. *Br J Bone Joint Surg Am* 2011; **93**: 164–171.
 - 24 Merritt K, Brown S A. Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions. *Clin Orthop Relat Res* 1996; **329** (Suppl.): S233–S243.
 - 25 Boeckler A F, Morton D, Poser S, Dette K E. Release of dibenzoyl peroxide from polymethyl methacrylate denture base resins: an in vitro evaluation. *Dent Mater* 2008; **24**: 1602–1607.
 - 26 Mikai M, Koike M, Fujii H. Quantitative analysis of allergenic ingredients in eluate extracted from used denture base resin. *J Oral Rehabil* 2006; **33**: 216–220.
 - 27 Milner R. The development of theoretical relationships between some handling parameters (setting time and setting temperature), composition (relative amounts of initiator and activator) and ambient temperature for acrylic bone cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; **68**: 180–185.
 - 28 Bircher A, Friederich N F, Seelig W, Scherer K. Allergic complications from orthopaedic joint implants: the role of delayed hypersensitivity to benzoyl peroxide in bone cement. *Contact Dermatitis* 2012; **66**: 20–26.
 - 29 Simpson P M, Dall G F, Breusch S J, Heisel C. In vitro elution and mechanical properties of antibiotic-loaded SmartSet HV and Palacos R acrylic bone cements. *Orthopade* 2005; **34**: 1255–1262.
 - 30 Srivastav A K, Nadkarni B, Srivastav S, Mittal V, Agarwal S. Prophylactic use of antibiotic-loaded bone cement in primary total knee arthroplasty: justified or not? *Indian J Orthop* 2009; **43**: 259–263.
 - 31 Wahlig H, Dingeldein E. Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthop Scand* 1980; **51**: 49–56.
 - 32 Haeberle M, Wittner B. Is gentamicin-loaded bone cement a risk for developing systemic allergic dermatitis? *Contact Dermatitis* 2009; **60**: 176–177.
 - 33 Treudler R, Simon J C. Benzoyl peroxide: is it a relevant bone cement allergen in patients with orthopaedic implants? *Contact Dermatitis* 2007; **57**: 177–180.
 - 34 Granchi D, Cenni E, Tigani D, Trisolino G, Baldini N, Giunti A. Sensitivity to implant materials in patients with total knee arthroplasties. *Biomaterials* 2008; **29**: 1494–1500.
 - 35 Hallab N. Metal sensitivity in patients with orthopedic implants. *J Clin Rheumatol: Pract Rep Rheum Musculoskelet Dis* 2001; **7**: 215–218.
 - 36 Thomas P, Stauner K, Schraml A et al. Characteristics of 200 patients with suspected implant allergy compared to 100 symptom-free arthroplasty patients. *Orthopade* 2013; **42**: 607–613.
 - 37 Bader R, Bergschmidt P, Fritsche A, Ansoorge S, Thomas P, Mittelmeier W. Alternative materials and solutions in total knee arthroplasty for patients with metal allergy. *Orthopade* 2008; **37**: 136–142.
 - 38 Dietrich K A, Mazoochian F, Summer B, Reinert M, Ruzicka T, Thomas P. Intolerance reactions to knee arthroplasty in patients with nickel/cobalt allergy and disappearance of symptoms after revision surgery with titanium-based endoprostheses. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009; **7**: 410–413.
 - 39 Thomsen M, Rozak M, Thomas P. Pain in a chromium-allergic patient with total knee arthroplasty: disappearance of symptoms after revision with a special surface-coated TKA – a case report. *Acta Orthop* 2011; **82**: 386–388.

TERMS AND CONDITIONS

May 21, 2019

This Agreement between Mr. Benjamin Thomas ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4593560266649
License date	May 21, 2019
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Contact Dermatitis
Licensed Content Title	High frequency of contact allergy to implant and bone cement components, in particular gentamicin, in cemented arthroplasty with complications: usefulness of late patch test reading
Licensed Content Author	Benjamin Thomas, Daniela Kulichova, Ronald Wolf, et al
Licensed Content Date	Aug 28, 2015
Licensed Content Volume	73
Licensed Content Issue	6
Licensed Content Pages	7
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Die problembehaftete Endoprothese: Diagnostik zur Abgrenzung von periprothetischem Infekt, Allergie und unspezifischer Entzündung
Expected completion date	May 2019
Expected size (number of pages)	78
Requestor Location	Mr. Benjamin Thomas
	Attn: Mr. Benjamin Thomas
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

8 Veröffentlichung II

Thomas P, Von Der Helm C, Schopf C, et al. Patients with intolerance reactions to total knee replacement: Combined assessment of allergy diagnostics, periprosthetic histology, and peri-implant cytokine expression pattern. *Biomed Res Int.* 2015;2015.

Research Article

Patients with Intolerance Reactions to Total Knee Replacement: Combined Assessment of Allergy Diagnostics, Periprosthetic Histology, and Peri-implant Cytokine Expression Pattern

Peter Thomas,¹ Christine von der Helm,¹ Christoph Schopf,² Farhad Mazoochian,² Lars Frommelt,³ Hans Gollwitzer,⁴ Josef Schneider,¹ Michael Flaig,¹ Veit Krenn,⁵ Benjamin Thomas,¹ and Burkhard Summer¹

¹ *Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), Frauenlobstraße 9-11, 80337 München, Germany*

² *Klinik und Poliklinik für Orthopädie der LMU, Marchioninistraße 15, 81377 München, Germany*

³ *Endoklinik, Abteilung für Mikrobiologie, Holstenstraße 2, 22767 Hamburg, Germany*

⁴ *Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität München (TU), Ismaninger Straße 22, 81675 München, Germany*

⁵ *Institut für Pathologie, Max-Planck-Straße 5, 54296 Trier, Germany*

Correspondence should be addressed to Peter Thomas; peter.thomas@med.uni-muenchen.de

Received 4 July 2014; Accepted 8 September 2014

Academic Editor: Thomas M. Grupp

Copyright © 2015 Peter Thomas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We performed a combined approach to identify suspected allergy to knee arthroplasty (TKR): patch test (PT), lymphocyte transformation test (LTT), histopathology (overall grading; T- and B-lymphocytes, macrophages, and neutrophils), and semiquantitative Real-time-PCR-based periprosthetic inflammatory mediator analysis (IFN γ , TNF α , IL1- β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL17, and TGF β). We analyzed 25 TKR patients with yet unexplained complications like pain, effusion, and reduced range of motion. They consisted of 20 patients with proven metal sensitization (11 with PT reactions; 9 with only LTT reactivity). Control specimens were from 5 complicated TKR patients without metal sensitization, 12 OA patients before arthroplasty, and 8 PT patients without arthroplasty. Lymphocytic infiltrates were seen and fibrotic (Type IV membrane) tissue response was most frequent in the metal sensitive patients, for example, in 81% of the PT positive patients. The latter also had marked periprosthetic IFN γ expression. 8/9 patients with revision surgery using Ti-coated/oxinium based implants reported symptom relief. Our findings demonstrate that combining allergy diagnostics with histopathology and periprosthetic cytokine assessment could allow us to design better diagnostic strategies.

1. Introduction

Hip and knee replacement are very successful surgical procedures to restore quality of life in osteoarthritis patients [1] and correspondingly implantation rates are steadily increasing [2]. However, in a substantial part of such patients implant failure leads to implant revision. A recent review lists a total knee replacement (TKR) revision rate of 9.5% in Germany and of 8.4% in the USA for the year 2011 [2]. Within the

spectrum of conditions leading to TKR failure [3] adverse reactions may be found, but the role of allergy is still a controversial issue. Cutaneous metal allergy is frequent in the general population, for example, approximately 13% to nickel (Ni), 2% to cobalt (Co), and 1% to chromium (Cr) [4]. Either wear or corrosion leads to peri-implant and systemic metal (particularly Ni, Cr, or Co) exposure of arthroplasty patients [5], and correspondingly, prevalence of metal sensitivity in patients with failed implant is reported to be increased [6–8].

With regard to total hip replacement, aseptic loosening was mostly attributed to wear associated macrophage dominated foreign body response as underlying mechanism [9, 10]. Over the last decade, attention has turned to the role of hypersensitivity in peri-implant inflammation. In particular in metal-on-metal arthroplasty a subgroup of patients was described showing rather peri-implant lymphocytic inflammation as potential elicitor of implant failure [11–13]. Described histologic changes include diffuse, perivascular or lymph-follicle (lymphoid) like infiltration of lymphocytes and few macrophages, high endothelial venules, and in part tissue necrosis [13–15]. Metal allergy as a contributing factor was suggested by the observed linkage between peri-implant lymphocytic inflammation, patch test reactivity to metals, and enhanced lymphocyte transformation test (LTT) response to metals in a series of such patients [16]. There is however still controversial discussion, as to which extent metal allergy contributes to the “umbrella term” adverse reactions in hip arthroplasty [17, 18]. In fact, metal allergic patients may well tolerate the respective metals containing implant [8, 19]. With regard to TKR there also exist reports on cutaneous metal allergy found in association with complications [20, 21], but it is not yet further investigated whether such metal allergy is responsible for the biological reaction. As we are seeing patients with suspected implant intolerance reactions in a special outpatient ambulatory, we wondered whether in a series of patients with complicated TKR a potential metal sensitivity could be linked to a particular peri-implant histological picture and cytokine expression pattern. To address potential clinical relevance of the findings we further contacted the patients to see if they have had some benefit from revision surgery with particular attention to the potential use of “hypoallergenic” materials upon revision surgery.

Thus, the aim of the investigation was to better prove allergic etiology in complicated TKR by combining different diagnostic steps and by assessing the clinical relevance of the findings in a followup.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Controls. A total of 45 patients took part in the study. The study was approved by the ethics committee. The following patient groups were analyzed.

25 knee arthroplasty patients (16 m, 9 f, 37–75 years) with CoCrMo based TKR and complications like loosening, recurrent effusions, and pain were presented by their treating orthopaedic surgeons to our ambulatory for allergy diagnostics, since preceding diagnostics gave no indication of problem elicitors like malpositioning/malalignment, fracture, or infection. According to the allergy diagnostics results, these patients were further assigned to three groups. *Group I*: 11 patients (patch test positive and LTT positive), *Group II*: 9 patients (patch test negative and LTT positive), and *Group III*: 5 patients (patch test negative and LTT negative).

The study included 12 patients (1 m, 52–89 years; “OA-control group”) without implant, but degenerative joint disease/osteoarthritis (OA) prior to knee arthroplasty.

The study included 8 patients (2 m, 53–75 years; “PT-control group”) without implant, but having undergone patch test (PT) for suspected allergic skin diseases. 6/8 had Ni-PT reactivity, 2/8 had no Ni-PT reactivity.

In the 25 TKR patients, potential metal sensitivity was assessed by PT and LTT; furthermore, periprosthetic tissue samples were obtained for histology, molecular analysis, and microbiology. In addition a WOMAC score was obtained at the ambulatory visit to have feedback on the patients’ perception of daily life activity and of pain. In the 12 OA patients (“OA-control group”), at primary TKR tissue samples were obtained for histology, molecular analysis, and microbiology. In the 8 “PT-control group” patients, biopsies were obtained from the 6 Ni-PT reactive and the 2 Ni-non reactive PT areas for histology and molecular analysis. The characteristics of the 45 patients are summarized in Table 1.

2.2. Patch Test (PT). In the 25 TKR patients an European standard series of 30 contact allergens including a Co, a Cr, and a Ni preparation (Hermal, Reinbek, Germany) supplemented by a metal allergen series (Brial Allergen GmbH, Greven, Germany) as well as a bone cement component series in case of cemented arthroplasty was tested on the patients’ back. Test preparations were applied in Finn chambers for 2 days and reactions were evaluated on the day of removal and at 3 days after application. In the patients with bone cement series testing, an additional reading was performed after 1 week. Grading of the skin reactions was as recommended by the German Contact Dermatitis Research Group.

2.3. Lymphocyte Transformation Test (LTT). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from the heparinized blood of the TKR patients by density centrifugation on Ficoll-Hypaque (Phadia, Freiburg, Germany). Cells (1×10^6 /mL) were cultured in RPMI1640 medium (Biochrom, Berlin, Germany) supplemented by autologous serum, glutamine, antibiotic-antimycotic-solution, and nonessential amino acids. All cultures were performed in quadruplicate in 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark). Stimuli were the pan T-cell mitogen phytohemagglutinin (PHA) 2.4 μ g/mL, tetanus toxoid (TT) 5 μ g/mL, NiSO₄, CrCl₃, and CoCl₂ (7 concentrations each from 1×10^{-4} M to 1×10^{-6} M) and culture medium alone as control. After 5 days, cells were pulsed with ³H thymidine overnight and proliferation was assessed by incorporated radioactivity. The stimulation index (SI) was calculated by the ratio of mean counts per minute (cpm) of stimulated to unstimulated cultures. SI > 3 was considered as positive.

2.4. Analysis of Peri-Implant Tissue. In the 25 TKR patients, tissue specimens were obtained from the newly formed articular capsule at the time of revision. At least 2 probes were sent for microbiological evaluation to the Endoklinik Hamburg. The other two probes were processed for histology and one probe for molecular analysis. In the 12 OA-patients tissue specimens were obtained at the moment of primary arthroplasty implantation for histology and molecular analysis as above. The 8 “PT-control group” patients underwent

TABLE 1: Patients characteristics.

	Sex		Age (years)	Tissue from	Implant survival (month)
Group I (revision surgery, patch test+, LTT+)	7 m	4 f	ø59.0 (37–75)	Knee	ø25.7 (6–30)
Group II (revision surgery, patch test–, LTT+)	7 m	2 f	ø64.2 (53–71)	Knee	ø28.0 (12–60)
Group III (revision surgery, patch test–, LTT–)	2 m	3 f	Ø69.8 (59–75)	Knee	Ø23.4 (7–42)
OA-control Group (gonarthrosis before arthroplasty)	1 m	11 f	69.2 (52–89)	Knee	—
PT-control Group (patch test+ biopsies)	1 m	5 f	64.25	Back	—
(patch test– biopsies)	1 m	1 w	(53–75)	Back	—

punch biopsy of their Ni-PT areas on the back after test reading on D3. One probe each was obtained for histology and molecular analysis.

2.5. Histological Examination. The formalin-fixed tissues were processed and stained with haematoxylin-eosin. Immunohistology was performed with antibodies to T-cell (α CD3), B-cell (α CD20), macrophage (α CD68 resp KPI), and neutrophil (α CD15) antigens. The sections were microscopically examined and the proportionate distribution of the tissue components including macrophages, diffuse or perivascular accumulation of T- or B-lymphocytes, and plasma cells as well as the overall reaction pattern of the tissue specimen were semiquantitatively assessed. The grading score was according to Krenn et al. [24] and in the case of the TKR-patient derived samples the consensus classification [24] was used. This consensus classification does subdivide the peri-implant tissue reaction patterns into a particle dominated foreign body like response (Type I), a granulocyte dominated infectious type (Type II), the mixture of Types I and II (combined Type, Type III), and a paucicellular and rather fibrotic reaction (Type IV, indifferent type).

2.6. Molecular Analysis. The following probes were obtained in RNA-conserving liquid for subsequent analysis: from each of the 25 TKR patients and 12 OA-control patients peri-implant and subcutaneous tissue (reference) probe; from the patch test control group 6 Ni-PT-positive probes and 2 probes from Ni-non-reactive test site (reference).

Total RNA was isolated from the tissue specimen by phenol/chloroform extraction and reverse transcribed into cDNA by the use of AMV reverse transcriptase. The expression of the following cytokines was analysed by semiquantitative RT-PCR in the LightCycler: IFN γ , TNF α , IL1- β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL17, and TGF β . The expression value was determined in comparison to the house-keeping gene EF1- α [25] by the $\Delta\Delta$ Ct-method by Schmittgen and Livak [22].

2.7. Comparison of Pre- and Postoperative WOMAC Score. A modified score system has been used in accordance with the publication of Roos et al. [23]. As from the Groups I and II patients preoperative WOMAC knee score was available, we further contacted patients after revision surgery to also get (at not less than 6 months after surgery) their postoperative WOMAC score information. Particular focus was put on patients with revision by use of “hypoallergenic” material.

3. Results and Discussion

Metal implant allergy still remains a diagnosis of exclusion, with a delay in diagnosis due to missing disease specific criteria and need of combining different diagnostic steps. Thus various complication elicitors are questioned first in TKR failure and metal implant allergy is diagnosed by a combination of PT, LTT, and histopathology [26, 27]. The study presented here aims to support improvement of diagnostic tools.

3.1. Allergy Diagnostics. Within the 20 patients with metal sensitivity, 11 (Group I) showed PT reactions to metals (in part multiple reactions): 10 to Ni, 6 to Co, 2 to Cr, and one of these 11 patients also showed PT reactions to bone cement components (to gentamicin and benzoyl peroxide). In 6/11 additional LTT data were available and showed 5x Ni reactivity and 1 nonreactive LTT. In the remaining 9 patients (Group II) with negative PT to implant components but positive LTT we found 9x LTT reactivity to Ni, 1x to Co. These data are summarized in Tables 2–4. In several studies increased metal sensitivity has been found in patients with arthroplasty [6, 7]. At a larger scale, when comparing 100 symptom-free to 200 complicated arthroplasty patients, such increased incidence of metal allergy—in particular to Ni—could be reproduced [21]. Most data on in vivo metal release conditions are derived from hip arthroplasty patients. However local Co and Cr release is seen also in TKR and respective systemic exposure of the patients is reported [28].

TABLE 2: Patch test/LTT results and histology grading, group I.

Patient number	Age, sex	Patch test reaction	LTT-reaction	CD3-infiltrate		KP1	CD20	CD15	Rating (Type I–IV according to [24])
				Qualitative	Quantitative				
10	37, m	Ni, Co, Cr	n.d.	Micronodal perivascular	+	++	–	–	Type 4
8	51, f	Ni,	Ni,	Micronodal perivascular	++	+	–	–	Type 4
15	59, f	Ni	n.d.	Micronodal perivascular	++	++	+	–	Type 4
9	74, m	Ni, Co	n.d.	Micronodal perivascular	+++	++	–	–	Type 4
3	51, m	Co	n.d.	Diffuse	–	+	–	–	Type 4
18	58, f	Ni,	Ni	Diffuse	–	–	–	–	Type 1 (Necrosis)
7	75, m	Ni	Ni	Diffuse	+	++	–	–	Type 4
1	63, m	Ni, Co, Ge, Be	Ni	Diffuse	+	++	+	+	Type 4
16	57, m	Ni, Co	Ni	Diffuse	+	+	–	–	Type 4
17	68, m	Ni, Co, Cr,	n.d.	Diffuse	+	+	–	–	Type 4
19	56, f	Ni,	neg	Diffuse	+	++	–	–	Type 1

Findings in 11 patients with CoCrMo based knee arthroplasty with complications and positive patch test reaction. Ni = nickel, Co = cobalt, Cr = chromium, Ge = gentamicin, B = benzoyl peroxide; n.d. = not done; LTT = lymphocyte transformation test.

TABLE 3: Patch test/LTT results and histology grading, Group II.

Patient number	Age, sex	Patch test reaction	LTT-reaction	CD3-infiltrate		KP1	CD20	CD15	Rating (Type I–IV according to [24])
				Qualitative	Quantitative				
11	61, m	neg	Ni	Diffuse	–	+	–	–	Type 4
12	65, f	neg	Ni	Diffuse	–	++	–	–	Type 1
14	66, m	neg	Ni, Co	Diffuse	–	++	–	–	Type 4
2	71, m	neg	Ni	Diffuse	+	++	+	–	Type 1
4	66, m	neg	Ni	Diffuse	+	+	–	–	Type 4
5	64, m	neg	Ni	Diffuse	+	+	–	–	Type 4
6	53, m	neg	Ni	Diffuse	+	++	–	–	Type 4
13	69, m	neg	Ni	Diffuse	+	–	–	–	Type 4
20	63, f	neg	Ni	Diffuse	+	++	–	+	Type 1

Findings in 9 patients with CoCrMo based knee arthroplasty with complications, negative patch test but positive lymphocyte transformation test (LTT); abbreviations see Table 2.

TABLE 4: Patch test/LTT results and histology grading, group III.

Patient number	Age, sex	Patch test reaction	LTT-reaction	CD3-infiltrate		KP1	CD20	CD15	Rating (Type I–IV according to [24])
				Qualitative	Quantitative				
IAR 6	59, f	neg	Neg	–	–	–	–	–	n.a.*
IAR 18	73, f	neg	Neg	–	–	–	–	–	Type 4
IAR 23	74, f	neg	Neg	–	–	–	–	–	Type 4
IAR 26	68, m	neg	Neg	–	–	–	–	+	Type 2
IAR 5	75, m	neg	Neg	Focal	+++	+++	+++	+++	Type 2

* n.a.: not applicable because of fibrinoid necrosis.

Findings in 5 patients with CoCrMo based knee arthroplasty with complications, negative patch test, and negative LTT; for abbreviations see Table 2.

Furthermore, also substantial Ni release might be observed in CoCrMo-arthroplasty patients [29]. The predominance of Ni allergy in our patient groups might thus not only reflect relative predominance of Ni allergy in the general population. On the other hand, even symptom-free patients with well

performing knee arthroplasty may have cutaneous metal allergy to implant alloy metals [8, 19]. Thus, as Granchi et al. stated in 2012 [30] that presence of metal sensitivity may not mean implant failure mechanism at the single patient level.

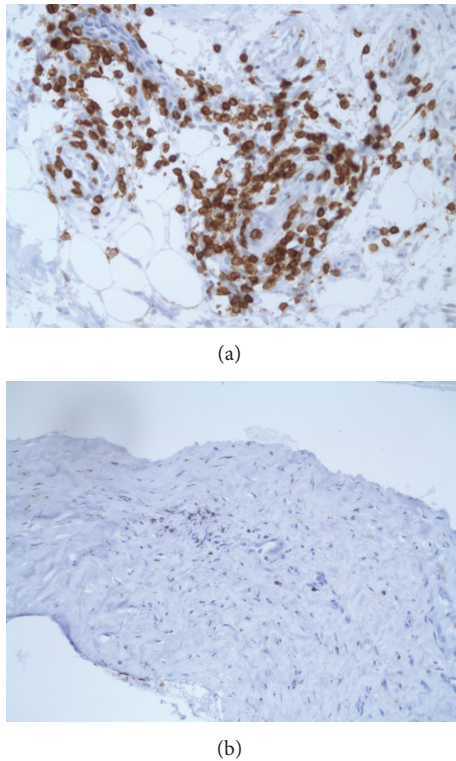


FIGURE 1: (a) Example of perivascular lymphocytic infiltrate; α CD3 stain. (b) Example of scattered periprosthetic lymphocytes; α CD3 stain.

3.2. Histological Examination. We next wondered if the periprosthetic tissue analysis would help to discriminate hyperergic tissue response. For this purpose, four conditions were chosen for comparative analysis of tissue specimen. For example, periprosthetic tissue samples were obtained from (1) the 20 TKR patients with complications and metal sensitivity (Groups I and II); (2) the 5 TKR patients with complications but no metal sensitivity (Group III); (3) 12 patients with degenerative knee joint disease/osteoarthritis (OA-control group) at primary arthroplasty; and (4) the cutaneous biopsies that were performed at PT sites in 8 PT patients (PT-control group) of whom 6 had positive, eczematous PT reaction to Ni and 2 had no PT reaction to Ni. The rating of periprosthetic/(neo) capsule tissue response was done according to the standardized consensus classification initially published by Morawietz et al. in 2006 [31] and revised by Krenn et al. [24]. In addition focus was put on the presence of T-lymphocytes, B-lymphocytes, neutrophils, and macrophages—and furthermore probes of Groups I, II, and III patients were also sent to microbiology evaluation. Several unexpected findings were made: 9/11 patients in Group I and 6/9 patients in Group II had a collagen fibre rich, connective tissue resembling periprosthetic tissue reaction (Type IV/indeterminate type). And only 5 of the 20 metal sensitive patients had the overall picture of the “wear particle induced type” with macrophage dominated response. This is in contrast to the general observation of mostly wear particle/foreign body response like tissue pattern in failed

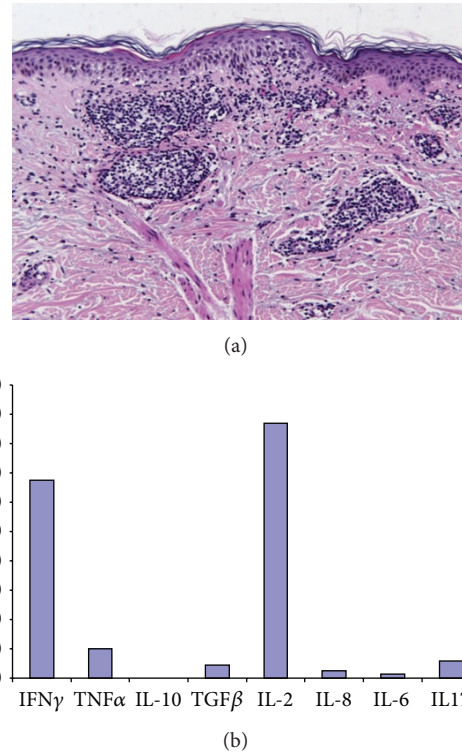


FIGURE 2: (a) Histology of patch test (PT) reaction to Ni showing perivascular T-lymphocytic infiltrates, scattered eosinophils, and epidermal “spongiotic” changes. (b) Relative inflammatory mediator expression in biopsy of positive PT reaction to Ni. Analysis based on semiquantitative real-time RT-PCR.

arthroplasty and to the only 15% Type IV (fibrotic) response reactivity in the 370 samples analysed by Morawietz et al. [31]. There were no signs of infections in these 20 samples of our Groups I and II patients. Despite being a predominant “arthrofibrosis”-like, paucicellular reactivity, presence of lymphocytes was noted in perivascular or scattered distribution (Figures 1(a) and 1(b)). In contrast, out of the 5 patients without metal sensitivity two showed infection and lymphocytic inflammation was only seen in one of these patients. In OA-patients, again, lymphohistiocytic infiltrates were noted together with absence of neutrophils. These findings are summarized in Tables 2, 3, and 4. Figures 1(a) and 1(b) are representative histology findings of patients in Groups I and II. Biopsies from Ni-induced allergic patch test reactions were characterized by perivascular and sometimes diffuse lymphohistiocytic infiltrates together with contact allergy-typical epidermal changes as shown in a representative sample (Figure 2(a)). Witzleb et al. speculated that perivascular or diffuse presence of (T-)lymphocytes in periprosthetic tissue could be interpreted as hyperergic response [15]. However, von Domarus and coworkers [32] described T lymphocyte infiltration as a common finding in tissue samples of retrieved aseptically loosened metal-on-polyethylene arthroplasties. Thus, they conclude that neither necrobiosis nor infiltration of T-lymphocytes should be considered to be specific for metal hypersensitivity reaction.

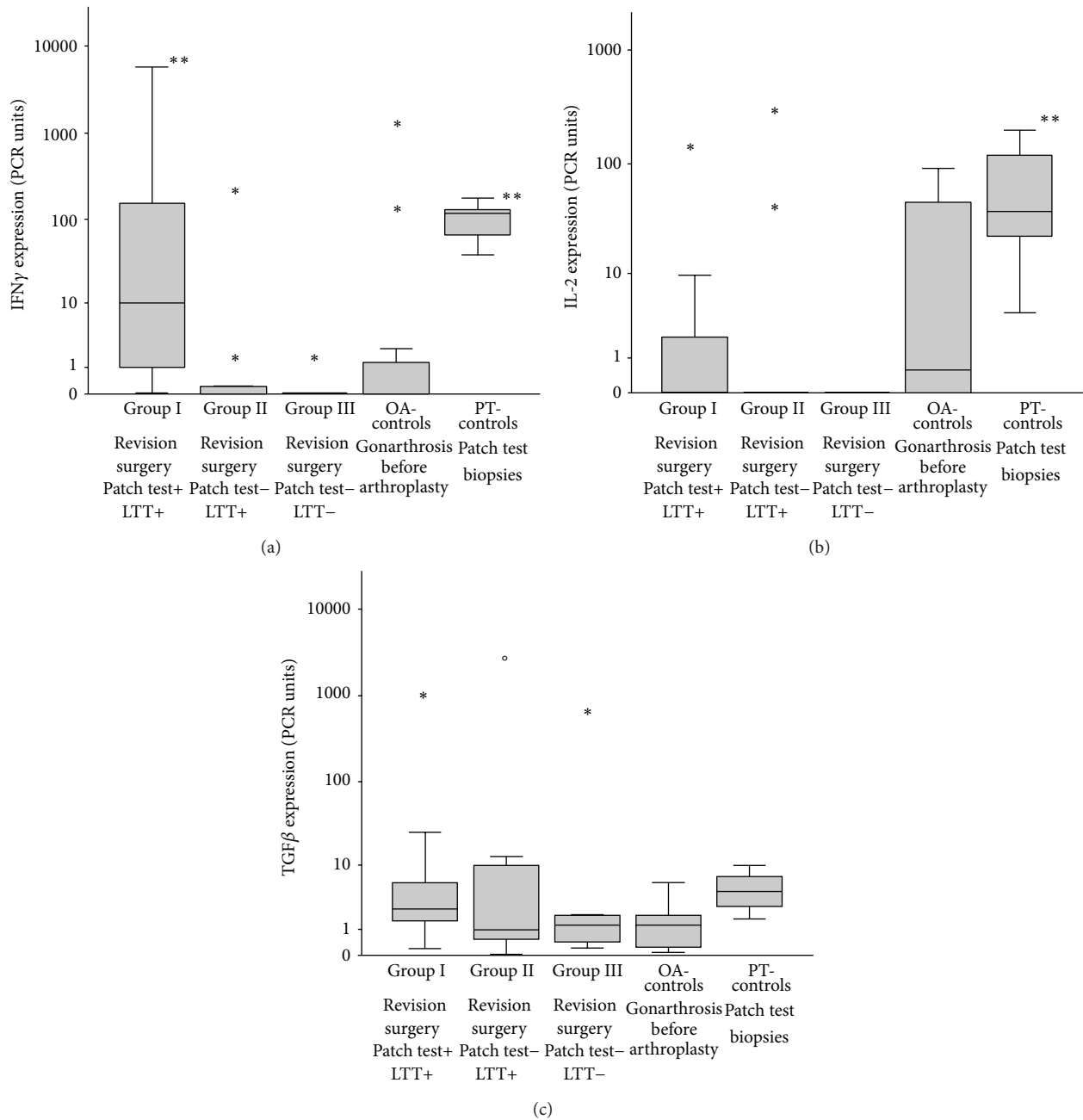


FIGURE 3: (a) Cytokine expression of IFN γ in the tissues of the 5 different patient groups; cytokine expression was analysed in comparison to the house-keeping gene EF-1 α and to the patients control tissue by the $\Delta\Delta$ Ct-method [22]; ** = $P < 0.005$ (Wilcoxon-Mann-Whitney-test done by SPSS statistical software). (b) Cytokine expression of IL-2 in the tissues of the 5 different patient groups; cytokine expression was analysed in comparison to the house-keeping gene EF-1 α and to the patients control tissue by the $\Delta\Delta$ Ct-method [22]; ** = $P < 0.005$ (Wilcoxon-Mann-Whitney-test done by SPSS statistical software). (c) Cytokine expression of TGF β in the tissues of the 5 different patient groups; cytokine expression was analysed in comparison to the house-keeping gene EF-1 α and to the patients control tissue by the $\Delta\Delta$ Ct-method [22] (Wilcoxon-Mann-Whitney-test done by SPSS statistical software).

3.3. *Cytokine Expression Profile.* In view of the partly inconclusive publications [27, 32–34] we next wondered whether assessment of inflammatory mediator expression could improve characterization of the tissue response pattern. In Figure 2(b) the cytokine RNA expression pattern of an acute ongoing specific cutaneous delayed type hypersensitivity reaction to Ni is shown. Major findings are the

marked upregulation of IFN γ as typical marker of the Th1-response stimulating the cellular immune response and of IL-2 indicating T-cell activation and proliferation [35]. When assessing the groups of metal TKR patients with/without metal sensitivity and OA-control group, such upregulation of IFN γ was also particularly visible in Group I patients, for example, TKR with complications and patch test reactivity

to metals. Out of the other mediators assessed, in the TKR patients IL-2 expression was more prominent in Group I and in OA-patient Group - and TGF- β expression slightly more in Groups I and II. This is the case also for IL-6 (in Groups I and II) and one patient in Group II (patient with periprosthetic infection). These other mediators are not shown as there was only some individual increase of TNF α in OA-patients but no major difference between the different groups. Increased TH1 lineage commitment is reflected by increased IFN γ expression. Here we found marked IFN γ upregulation not only typically in the Ni-induced PT reactions, but in particular also in the Group I TKR patients, suggesting its role in periprosthetic disease progression. Interestingly, Jämsen and coworkers recently reported that they found scattered CD3+ T cells in the interface tissue of aseptically loosened hip arthroplasty with predominant macrophage related wear particle response. However, neither by quantitative PCR nor by immunohistochemistry they could show significant TH1 (namely, IFN γ) or TH2 (IL-4) mediator expression [36]. Since apart from IL-6 [37] in particular TGF- β might play a central role in the onset and persistence of periprosthetic, articular fibrosis [38], we here analysed its respective expression in the different tissue samples. We observed an increase of TGF- β expression in the metal sensitive TKR patients with however interindividual variations. Figures 3(a)–3(c) summarize these findings.

3.4. Comparison of Pre- and Postoperative WOMAC Score. 19 of the 20 TKR patients responded to our request and completed a postoperative WOMAC scoring. 9 patients reported that at revision a “hypoallergenic” TKR had been implanted (8x Ti-based surface coating, 1x oxinium based implant). 8/9 patients did profit from this approach, as shown in Figure 4. So far there are only case reports or small patient series regarding the potential benefit from the use of “hypoallergenic” TKR [39, 40]. These results however stress the need of follow-up studies at a larger scale.

There are however limitations in the study: the facts that periprosthetic tissue samples may reflect only the actual stage of a dynamic process and that OA patients may not be as well a “control” as interface tissue probes from patients with well-functioning implants and the limited sample number in this investigations. Thus further studies are needed to validate the multimodular diagnostic approach in metal implant allergy.

4. Conclusions

This study demonstrates for the first time the potential of utilizing combined analytic steps to provide an approach to develop diagnostic characteristics of metal implant allergy. Allergy diagnostics (PT and LTT) and periprosthetic histology point to immunological response to implant alloy metals and the pattern of inflammatory mediator expression adds to functional differentiation.

Unexpected findings were the predominant “fibrotic” type IV interface response in the metal sensitized TKR patients and the marked IFN γ expression in the PT-positive TKR patients.

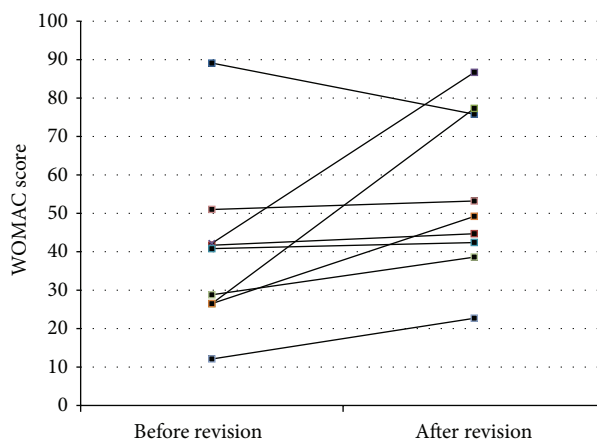


FIGURE 4: WOMAC score before and after revision surgery in 9 patients who received “hypoallergenic” material (8x titanium, 1x oxinium). The score-system has been used in accordance with the publication of Roos et al. [23].

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This study was supported by Grant of Endo-Stiftung, Hamburg, and Grant of B Braun-Aesculap, Tuttlingen and Ludwig-Maximilians-University of Munich.

References

- [1] I. D. Learmonth, C. Young, and C. Rorabeck, “The operation of the century: total hip replacement,” *The Lancet*, vol. 370, no. 9597, pp. 1508–1519, 2007.
- [2] A. Wengler, U. Nimptsch, and T. Mansky, “Hip and knee replacement in Germany and the USA: analysis of individual inpatient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011,” *Deutsches Ärzteblatt International*, vol. 111, no. 23-24, pp. 407–416, 2014.
- [3] P. F. Sharkey, W. J. Hozack, R. H. Rothman, S. Shastri, and S. M. Jacoby, “Why are total knee arthroplasties failing today?” *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 404, pp. 7–13, 2002.
- [4] T. Schäfer, E. Böhler, S. Ruhdorfer et al., “Epidemiology of contact allergy in adults,” *Allergy*, vol. 56, no. 12, pp. 1192–1196, 2001.
- [5] K. Merritt and S. A. Brown, “Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions,” *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 329 supplement, pp. S233–S243, 1996.
- [6] D. Granchi, E. Cenni, G. Trisolino, A. Giunti, and N. Baldini, “Sensitivity to implant materials in patients undergoing total hip replacement,” *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, vol. 77, no. 2, pp. 257–264, 2006.
- [7] N. Hallab, K. Merritt, and J. J. Jacobs, “Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants,” *The Journal of Bone and Joint Surgery A*, vol. 83, no. 3, pp. 428–436, 2001.

- [8] P. Thomas, K. Stauner, A. Schraml et al., "Characteristics of 200 patients with suspected implant allergy compared to 100 symptom-free arthroplasty patients," *Orthopade*, vol. 42, no. 8, pp. 607–613, 2013.
- [9] N. J. Hallab and J. J. Jacobs, "Biologic effects of implant debris," *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, vol. 67, no. 2, pp. 182–188, 2009.
- [10] R. J. Looney, E. M. Schwarz, A. Boyd, and R. J. O'Keefe, "Periprosthetic osteolysis: an immunologist's update," *Current Opinion in Rheumatology*, vol. 18, no. 1, pp. 80–87, 2006.
- [11] A. P. Davies, H. G. Willert, P. A. Campbell, I. D. Learmonth, and C. P. Case, "An unusual lymphocytic perivascular infiltration in tissues around contemporary metal-on-metal joint replacements," *Journal of Bone and Joint Surgery—Series A*, vol. 87, no. 1, pp. 18–27, 2005.
- [12] C. H. Lohmann, J. V. Nuechtern, H.-G. Willert, S. Junk-Jantsch, W. Ruether, and G. Pflueger, "Hypersensitivity reactions in total hip arthroplasty," *Orthopedics*, vol. 30, no. 9, pp. 760–761, 2007.
- [13] H.-G. Willert, G. H. Buchhorn, A. Fayyazi et al., "Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints: a clinical and histomorphological study," *Journal of Bone and Joint Surgery A*, vol. 87, no. 1, pp. 28–36, 2005.
- [14] S. Natsu, R. P. Sidaginamale, J. Gandhi, D. J. Langton, and A. V. F. Nargol, "Adverse reactions to metal debris: histopathological features of periprosthetic soft tissue reactions seen in association with failed metal on metal hip arthroplasties," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 65, no. 5, pp. 409–418, 2012.
- [15] W.-C. Witzleb, U. Hanisch, N. Kolar, F. Krummenauer, and K.-P. Guenther, "Neo-capsule tissue reactions in metal-on-metal hip arthroplasty," *Acta Orthopaedica*, vol. 78, no. 2, pp. 211–220, 2007.
- [16] P. Thomas, L. R. Braathen, M. Dörig et al., "Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and peri-implant T-lymphocytic inflammation," *Allergy*, vol. 64, no. 8, pp. 1157–1165, 2009.
- [17] H. J. Cooper, "The local effects of metal corrosion in total hip arthroplasty," *The Orthopedic Clinics of North America*, vol. 45, no. 1, pp. 9–18, 2014.
- [18] Y.-M. Kwon, P. Thomas, B. Summer et al., "Lymphocyte proliferation responses in patients with pseudotumors following metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 28, no. 4, pp. 444–450, 2010.
- [19] E. Thienpont and Y. Berger, "No allergic reaction after TKA in a chrome-cobalt-nickel-sensitive patient: case report and review of the literature," *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, vol. 21, no. 3, pp. 636–640, 2013.
- [20] D. Granchi, E. Cenni, D. Tigani, G. Trisolino, N. Baldini, and A. Giunti, "Sensitivity to implant materials in patients with total knee arthroplasties," *Biomaterials*, vol. 29, no. 10, pp. 1494–1500, 2008.
- [21] P. Thomas, A. Schuh, J. Ring, and M. Thomsen, "Orthopedic surgical implants and allergies: joint statement by the implant allergy working group (AK 20) of the DGOOC (German association of orthopedics and orthopedic surgery, DKG (German contact dermatitis research group) and dgaki (German society for allergology and clinical immunology)," *Orthopäde*, vol. 37, no. 1, pp. 75–88, 2008.
- [22] T. D. Schmittgen and K. J. Livak, "Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method," *Nature Protocols*, vol. 3, no. 6, pp. 1101–1108, 2008.
- [23] E. M. Roos, H. P. Roos, L. S. Lohmander, C. Ekdahl, and B. D. Beynon, "Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)—development of a self-administered outcome measure," *Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy*, vol. 28, no. 2, pp. 88–96, 1998.
- [24] V. Krenn, L. Morawietz, H. Kienapfel et al., "Revised consensus classification: histopathological classification of diseases associated with joint endoprostheses," *Zeitschrift für Rheumatologie*, vol. 72, no. 4, pp. 383–392, 2013.
- [25] H. K. Hamalainen, J. C. Tubman, S. Vikman et al., "Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR," *Analytical Biochemistry*, vol. 299, no. 1, pp. 63–70, 2001.
- [26] P. Thomas, B. Summer, V. Krenn, and M. Thomsen, "Allergy diagnostics in suspected metal implant intolerance," *Orthopade*, vol. 42, no. 8, pp. 602–606, 2013.
- [27] J. P. Thyssen, T. Menné, P. C. Schalock, J. S. Taylor, and H. I. Maibach, "Pragmatic approach to the clinical work-up of patients with putative allergic disease to metallic orthopaedic implants before and after surgery," *The British Journal of Dermatology*, vol. 164, no. 3, pp. 473–478, 2011.
- [28] J. P. Kretzer, J. Reinders, R. Sonntag et al., "Wear in total knee arthroplasty—just a question of polyethylene? Metal ion release in total knee arthroplasty," *International Orthopaedics*, vol. 38, no. 2, pp. 335–340, 2014.
- [29] F. Mazoochian, F. Schmidutz, J. Kiefl et al., "Levels of Cr, Co, Ni and Mo in Erythrocytes, serum and urine after hip resurfacing arthroplasty," *Acta Chirurgica Belgica*, vol. 113, no. 2, pp. 123–128, 2013.
- [30] D. Granchi, E. Cenni, A. Giunti, and N. Baldini, "Metal hypersensitivity testing in patients undergoing joint replacement: a systematic review," *The Journal of Bone and Joint Surgery B*, vol. 94, no. 8, pp. 1126–1134, 2012.
- [31] L. Morawietz, R.-A. Classen, J. H. Schröder et al., "Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 59, no. 6, pp. 591–597, 2006.
- [32] C. von Domarus, J. P. Rosenberg, W. Rüther, and J. Zustin, "Necrobiosis and T-lymphocyte infiltration in retrieved aseptically loosened metal-on-polyethylene arthroplasties," *Acta Orthopaedica*, vol. 82, no. 5, pp. 596–601, 2011.
- [33] C. H. Lohmann, H. Meyer, J. V. Nuechtern et al., "Periprosthetic tissue metal content but not serum metal content predicts the type of tissue response in failed small-diameter metal-on-metal total hip arthroplasties," *The Journal of Bone and Joint Surgery A*, vol. 95, no. 17, pp. 1561–1568, 2013.
- [34] P. Thomas, "Patch testing and hypersensitivity reactions to metallic implants: still many open questions," *Dermatitis*, vol. 24, no. 3, pp. 106–107, 2013.
- [35] M. Akdis, S. Burgler, R. Cramer et al., "Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 127, no. 3, pp. 701–721, 2011.
- [36] E. Jämsen, V.-P. Kouri, J. Olkkonen et al., "Characterization of macrophage polarizing cytokines in the aseptic loosening of total hip replacements," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 32, no. 9, pp. 1241–1246, 2014.
- [37] M. P. Bihl, K. Laule-Kilian, L. Bubendorf et al., "Progressive pulmonary sarcoidosis—a fibroproliferative process potentially triggered by EGR-1 and IL-6," *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases*, vol. 23, no. 1, pp. 38–50, 2006.
- [38] D. F. Remst, A. B. Blom, E. L. Vitters et al., "Gene expression analysis of murine and human osteoarthritis synovium reveals

elevation of transforming growth factor β -responsive genes in osteoarthritis-related fibrosis,” *Arthritis & Rheumatology*, vol. 66, no. 3, pp. 647–656, 2014.

- [39] K.-A. Dietrich, F. Mazoochian, B. Summer, M. Reinert, T. Ruzicka, and P. Thomas, “Intolerance reactions to knee arthroplasty in patients with nickel/cobalt allergy and disappearance of symptoms after revision surgery with titanium-based endoprostheses,” *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, vol. 7, no. 5, pp. 410–413, 2009.
- [40] M. Thomsen, M. Rozak, and P. Thomas, “Pain in a chromium-allergic patient with total knee arthroplasty: disappearance of symptoms after revision with a special surface-coated TKA—a case report,” *Acta orthopaedica*, vol. 82, no. 3, pp. 386–388, 2011.