



Domenico Fenga¹ (foto)
Antonino Cantivalli²
Francesco Centofanti³
Michele Attilio Rosa¹

¹ Università degli Studi di Messina, Dipartimento di Scienze Biomediche, Odontoiatriche e delle Immagini Morfologiche e Funzionali, Sezione di Ortopedia e Traumatologia, Messina; ² Università degli Studi di Torino, Scuola di Specializzazione in Ortopedia e Traumatologia, Torino; ³ Istituto Codivilla-Putti, Divisione Osteomieliiti, Cortina d'Ampezzo (BL)

Indirizzo per la corrispondenza:

Domenico Fenga
via Duca degli Abruzzi, 6
98121 Messina
E-mail: Dfenga@gmail.com

Studio quantitativo e qualitativo sul rilascio di antibiotico dal cemento in diverse formulazioni: efficacia nell'eradicazione del biofilm nelle infezioni periprotetiche

Quantitative and qualitative study on antibiotic release from cement in different formulations: efficacy in periprosthetic joint infection treatment

Riassunto

Le infezioni periprotetiche rappresentano una complicanza severa in chirurgia ortopedica e, nonostante i progressi ottenuti nel campo della profilassi antibiotica e nella prevenzione, risultano ancora avere una elevata incidenza. Scopo dello studio è quello di verificare l'eluizione di antibiotico attraverso diverse preparazioni di cemento antibiotato testando l'efficacia contro la fase planctonica evitando altresì la formazione del biofilm batterico, consentendo di poter scegliere l'antibiotico migliore in base alla sua capacità minima inibente (MIC), in maniera prolungata nel tempo.

Parole chiave: infezioni periprotetiche, spaziatori antibiotati, biofilm

Summary

Periprosthetic infections (PJI) represent a severe complication in orthopedic surgery and, despite the progress made in the field of antibiotic prophylaxis and prevention, they are still having a high incidence. The aim of the study is to verify the elution of antibiotic through different antibiotic cement preparations by testing the efficacy against the planktonic phase, avoiding also the formation of bacterial biofilm, allowing to choose the best antibiotic based on its minimum inhibitory capacity (MIC), even prolonged over time.

Key words: periprosthetic joint infections, antibiotic loaded spacers, biofilm

Introduzione

Le infezioni periprotetiche continuano a essere una complicanza severa in chirurgia ortopedica e risultano ancora oggi avere una elevata incidenza. Il *gold-standard* nel trattamento è tuttora rappresentato dalla *two-stage surgery*¹. Ultimamente particolare attenzione si è posta riguardo lo studio dell'eluizione dell'antibiotico dal polimetilmetacrilato (PMMA), in particolare, sulla quantità di antibiotico rilasciato, sulla sua durata e sulla sua efficacia. Scarsa la letteratura riguardo le modalità di preparazione della miscela e su come essa possa influire sul rilascio dell'antibiotico. Dalla *Consensus Conference* del 2013² è emerso che non vi sono differenze tra l'uso di spaziatori antibiotati preformati e l'uso di spaziatori *custom made*, anche se in realtà questi ultimi consentirebbero di poter scegliere gli antibiotici da aggiungere e come facilitare la loro eluizione. Scopo del presente studio è quello di verificare l'eluizione di antibiotico attraverso diverse preparazioni di cemento testando l'efficacia contro la fase planctonica (fase in cui i batteri aderiscono alla superficie dei materiali, prima di formare il biofilm), seguito da una fase in vivo per verificare l'efficacia degli spaziatori nel contrastare la formazione del biofilm. Parallelamente

agli studi biochimici e microbiologici, verranno condotte analisi di superficie per poterne determinare la porosità e prove biomeccaniche. I dati ottenuti permetteranno di poter individuare quale possa essere la migliore metodica di preparazione della miscela di cemento antibiotato per ottenere un migliore controllo dell'infezione e, tramite prove fisiche, ottenere maggiori qualità biomeccaniche.

Materiali e metodi

Scelta dell'antibiotico

L'antibiotico scelto è la vancomicina (Hospira, ABBOT, 1 g polvere) in quanto è il più utilizzato per le infezioni periprotetichesche, mostra poche resistenze, è termostabile ed è particolarmente attivo contro i patogeni più comuni (*Staphylococcus spp.*)

Scelta del cemento

Il cemento usato è il G1-40 (G21 Srl), 40 g, viscosità standard.

Preparazione dei campioni

In ambiente sterile si sono uniti i vari componenti in sequenza ottenendo i campioni variando soltanto l'ordine con cui venivano aggiunti.

Tutti i campioni avevano pari forma e dimensione.

Campione # 1: vancomicina 4 gr. + monomero + cemento 40 gr.

Campione # 2: vancomicina 4 gr. + soluzione fisiologica (4ml) + cemento 40 gr + monomero.

Campione # 3: vancomicina 4 gr. + cemento 40 gr. + monomero.

I campioni al tempo "T0" sono stati posizionati in provette sterili, aggiungendo a ognuno 5 ml di tampone fosfato (PBS) e successivamente messi in stufa a 37°C per 24 ore per replicare le condizioni fisiologiche. È stato inoltre creato un campione di cemento senza antibiotico, considerato come "Tc" controllo.

Lo studio ha previsto due momenti evidenziabili: uno quotidiano, in cui veniva sostituito il PBS (5 ml), per ricreare le condizioni di ricambio del corpo umano, e l'altro a T1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, in cui sono stati prelevati i campioni di PBS, analizzati poi da un punto di vista biochimico.

Successivo prelievo del cilindro di cemento antibiotato e suo trasferimento in una nuova provetta sterile alla quale è stato aggiunto nuovamente 5 ml di PBS e riposizionamento in Stufa a 37°C per le successive 24 ore; valutazione qualitativa e quantitativa del liquido incubato con il cemento nelle precedenti 24 ore (volume e presenza di residui di cemento); prelievo di 2,5 ml del precedente liquido per la

fase microbiologica dello studio e conservazione a -80°C; prelievo del liquido residuo per l'analisi biochimica con cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

Studio microbiologico

L'attività biologica degli antibiotici rilasciati dai cilindri di cemento è stata studiata con un metodo standardizzato di micro-diluizione in brodo³. Sono stati impiegati i ceppi di *S. aureus* ATCC 25923 MSSA e ATCC 43300 MRSA e aliquote degli stessi campioni in cui era stata determinata la concentrazione dell'antibiotico. Sono state allestite sospensioni dei batteri con torbidità pari a 0,5 McFarland, diluite in modo da ottenere una concentrazione finale di 10⁵ unità formanti colonie (CFU) per pozzetto. 100 microlitri di ogni campione sono stati incubati a 37°C per 24 ore, in micropiastre per culture cellulari a 96 pozzetti, con 100 microlitri di brodo nutriente e 20 microlitri di una sospensione dei due ceppi di *S. aureus*. La crescita batterica nei pozzetti è stata determinata paragonando la torbidità con quella di pozzetti di controllo in cui i batteri erano incubati solo con brodo nutriente. L'organizzazione della piastra, è descritta in Figura 1. Nelle righe AB si è valutata l'azione battericida dell'eluato prelevato dal campione # 1 nei diversi tempi che, sono rappresentati nelle colonne (1-10); nelle righe CD l'azione dell'eluato dal campione # 2; nelle righe EF, l'azione dell'eluato del campione # 3.

Nella riga H si sono creati i controlli.

Nella piastra in cui si è studiato lo MRSA, invece, nella riga del controllo (H) soltanto i primi sei pozzetti sono stati allestiti con terreno di coltura e batteri, non ritenendo necessario fare ulteriori controlli.

Studio in vivo

Lo studio prospettico, è stato eseguito su 12 pazienti affetti da infezione peri-protetica (anca, ginocchio) ricoverati presso l'Istituto Codivilla-Putti di Cortina d'Ampezzo candidati a procedure di revisione. I criteri di inclusione sono stati: pazienti affetti da infezione periprotetica nota da *S. aureus* MS o MR (Tab. I). I criteri di esclusione considerati sono stati: mancato consenso all'indagine, procedura di sonicazione non effettuabile. Per tutti i pazienti è stata scelta la metodica # 1 per la preparazione dello spacer. Nella seconda fase, una volta ottenuta la guarigione clinica e alla normalizzazione degli indici di flogosi, lo spaziatore è stato rimosso, ed è stata impiantata la protesi definitiva. Tra le 2 fasi chirurgiche ogni paziente ha eseguito una terapia antibiotica mirata, in base all'esito dell'antibiogramma eseguito. Per la seconda fase ogni paziente ha eseguito una profilassi preoperatoria con 2 g di cefazolina sodica. A seguito della rimozione dello spaziatore, una parte è stata posizionata in un contenitore sterile con formalina, conservata in congelatore fino all'analisi. I campioni sono stati

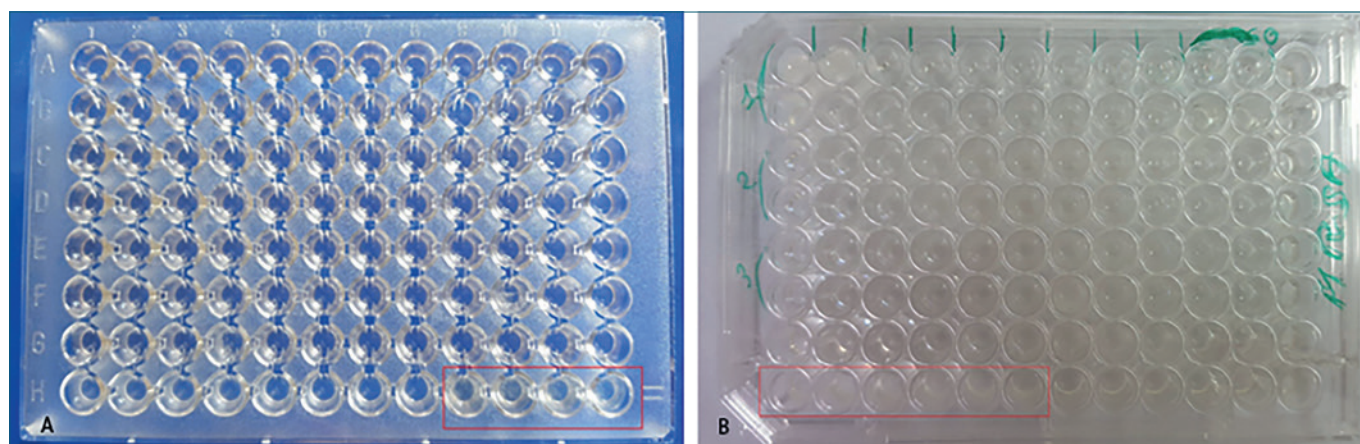


Figura 1. Pozzetti contenenti i ceppi di MSSA (A) e MRSA (B).

Tabella I. Pazienti trattati.

Name	Sex	Age	Localization	Spacer	Follow-up
A.F.	F	72	K	Dinamico	1y
F.D.D.	F	74	K	Dinamico	13m
T.M.	F	80	K	Statico	1y
C.M.	F	77	K	Dinamico	1y
N.B.	M	77	H	Dinamico	1y
G.M.	M	78	H	Dinamico	1y
R.S.	F	82	K	Dinamico	15m
N.S.	F	69	K	Statico	1y
N.B.	M	73	H	Dinamico	1y
C.B.	F	75	H	Dinamico	1y
D.G.A.	F	74	K	Dinamico	14m
P.R.	M	80	K	Statico	1y

sottoposti a sonicazione e il materiale prelevato è stato analizzato mediante analisi microbiologica classica. Una volta lavati con PBS e fissati con tetrossido di osmio al 2%, i campioni sono stati disidratati con una serie graduata di soluzioni acetone fino all'essiccazione. Essi sono stati poi montati su piastre metalliche e rivestiti con oro usando il "Polaron 5000 Sputtering System" (Watford, Inghilterra). I campioni sono stati quindi analizzati al microscopio elettronico a scansione (SEM) e al microscopio ottico a scansione confocale (CSLM). I criteri per determinare la presenza di colonie batteriche sono stati: 1) la presenza di batteri riconoscibili per forma e dimensioni; 2) la presenza di glicocalice. Parallelamente è stato eseguito un follow-up clinico a 1 anno.

Studio biomeccanico

Le prove di compressione sono state effettuate utilizzando la macchina LLOYD (cella di carico di 10 kN). Le forme dei provini sono standardizzate in base alla normativa ISO 5833:2002(E). Per il test si è imposta una velocità di deformazione di 20 mm/min.

Le misurazioni di durezza superficiale Shore-D sono state effettuate mediante l'ausilio del durometro PCE-HT 210 Shore-D.

Per calcolare la rugosità di superficie abbiamo usato il microscopio ottico HIROX DIGITAL MICROSCOPE KH 8700 anche definito profilometro 3D su analoghi campioni, questa volta metallizzati con spatter di rame per avere una migliore risoluzione delle immagini. Inoltre è stata effettuata un'analisi profilometrica per valutare con maggiore precisione la rugosità superficiale dei campioni. Successivamente viene calcolata la rugosità media aritmetica tramite la seguente equazione matematica: $R_a = 1/2 \int_1^0 |f(x)| dx$

Risultati

Risultati biochimici

Il profilo cinetico dell'eluizione della vancomicina è mostrato in Figura 2. È evidente come specialmente il campione # 1, ha maggiori capacità di rilascio dell'antibiotico rispetto ai campioni # 2 e # 3 che, invece, hanno una minore capacità di eluizione. In particolare, comparando l'eluato dei tre campioni dopo 24 ore di incubazione, il campione # 1 mostra un significativo maggior rilascio (circa il 15%) rispetto agli altri due che, al primo giorno hanno un rilascio di soli l'1,7% (campione # 2) e 1,3% (campione # 3) del totale.

Durante il periodo che va dal trentesimo al sessantesimo giorno, invece, il rilascio di vancomicina dai campioni

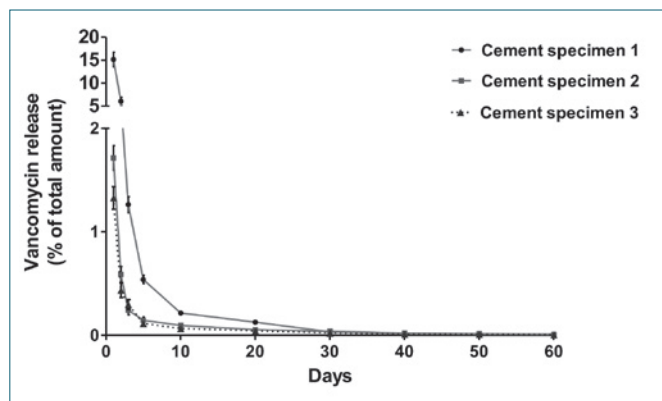


Figura 2. Il grafico rappresenta il rilascio di Vancomicina nei 60 giorni da parte dei tre campioni.

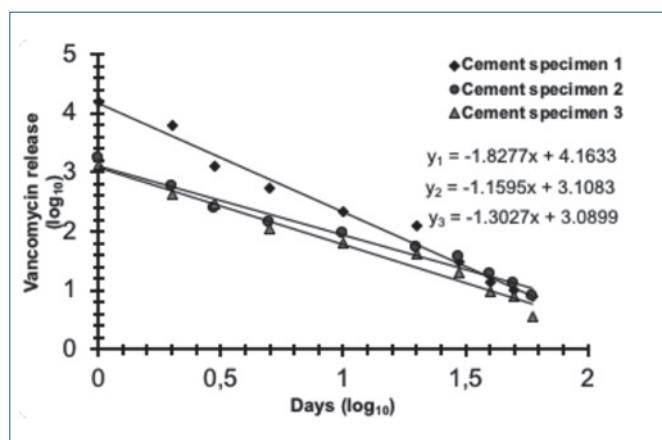


Figura 3. Rappresentazione lineare del rilascio di vancomicina da parte dei tre campioni.

numero # 1 e # 2 è simile e soltanto lievemente più alto rispetto al campione # 3; in tutti e tre i campioni, comunque, il rilascio è minore dello 0,05%.

Usando una scala logaritmica sia sull'asse delle ascisse che su quella delle ordinate, si ottiene la regressione lineare per i valori ottenuti (Fig. 3). Nelle Tabelle II e III, viene riproposta in maniera schematica la quantità di rilascio dell'antibiotico nei diversi tempi da parte dei diversi campioni, sia in termini di peso (Tab. II), che in termini percentuali (Tab. III).

Risultati microbiologici

Per quanto riguarda i dati microbiologici, bisogna dividere i risultati in due grandi gruppi: quelli ottenuti su MSSA e quelli su MRSA.

Per quanto riguarda il primo gruppo, la quantità di antibiotico contenuta in tutti gli eluati è tale da superare la MIC batterica e di conseguenza tutti e tre i campioni risultano capaci, fino al sessantesimo giorno di inibire la crescita batterica. Anche per quanto riguarda il secondo gruppo (MRSA), tutti gli eluati provenienti da tutti e tre i campioni riescono a inibire la crescita batterica (Fig. 1 A-B).

Risultati in vivo

L'età media dei pazienti al momento della revisione era 75 anni (da 69 a 82), 8 donne, 4 uomini. La durata media dello spaziatore è stata di 85 giorni (da 37 a 175). Al controllo clinico a 1 anno nessun paziente ha avuto la recidiva di infezione, con la normalizzazione dei valori laboratoristici. All'analisi microscopica non è stato possibile evidenziare la presenza di biofilm o di colonie batteriche, risultato sovrapponibile alle analisi condotte in vitro (Tab. I).

Tabella II. Rappresentazione del rilascio, in microgrammi, di vancomicina nei 60 giorni da parte dei tre campioni.

	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3
	µg	µg	µg
T 1 day	88510	9070	7505
T 2 days	35485	3320	2460
T 3 days	7380	1285	1680
T 5 days	3145	760	640
T 10 days	1255	500	360
T 20 days	735	282,5	235
T 30 days	183,75	198,75	115
T 40 days	78,5	97,5	52,5
T 50 days	58	67	45
T 60 days	46	43	20

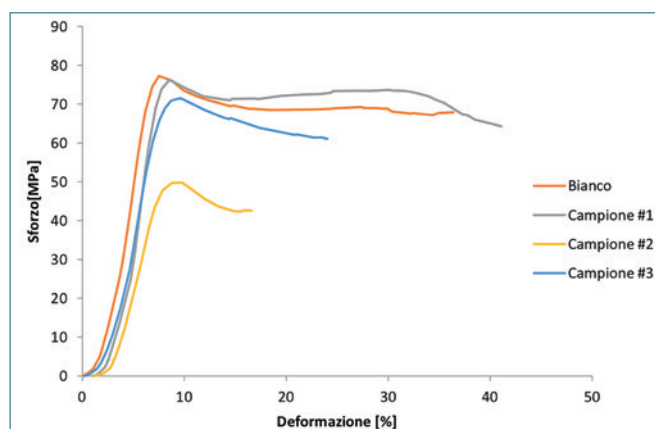
Tabella III. Rappresentazione del rilascio, in microgrammi, di vancomicina nei 60 giorni da parte dei tre campioni.

	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3
	% del totale	% del totale	% del totale
T 1 day	15,1417	1,7140	1,3273
T 2 days	6,0705	0,5871	0,4350
T 3 days	1,2625	0,2428	0,2971
T 5 days	0,5380	0,1436	0,1132
T 10 days	0,2147	0,0945	0,0637
T 20 days	0,1257	0,0534	0,0416
T 30 days	0,0314	0,0376	0,0203
T 40 days	0,0134	0,0184	0,0093
T 50 days	0,0099	0,0127	0,0080
T 60 days	0,0079	0,0081	0,0035

Risultati biomeccanici

I parametri meccanici presi in considerazione sono: Modulo di Young E (MPa); Carico massimo F_{max} (N); Tensione massima σ_y (MPa); Deformazione di snervamento ϵ_y (mm); deformazione di snervamento percentuale ϵ_y (%), tutti forniti dalle prove statiche mentre, il lavoro a rottura, che rappresenta la tenacità del materiale, è stato ottenuto attraverso il calcolo dell'area della curva carico-spostamento.

Il campione bianco (T_c) ha un comportamento elastico fino al valore medio di 75,40 MPa, successivamente vediamo una zona di plateau che inizia a un valore di deformazione del 7,68%, in cui lo sforzo si mantiene pressoché costante fino a un valore limite dopo il quale si evince la rottura o densificazione del campione. Nei risultati relativi al campione # 1 si nota come l'aggiunta di antibiotico non porta a una sostanziale modifica sia della tensione massima, che si attesta su valori medi pari a 74,62 MPa, sia della parte iniziale che della zona di *plateau* che aumenta di poco fino ad arrivare a valori medi di deformazione di 8,68%. Il campione # 2 mostra proprietà meccaniche differenti. La presenza del NaCl all'interno del campione oltre alla formazione di macro e micro pori, porta ad avere una dispersione elevata dei dati ottenuti dalle prove di compressione. Il campione # 3, invece, mostra gli stessi componenti del campione # 1 (Fig. 4). Questo porta ad avere una diminuzione del modulo di Young, 992 MPa, e una leggera diminuzione della tensione massima, 74,74 MPa. I valori di durezza sono in accordo con i risultati dalla prova di compressione. Per quanto riguarda la rugosità, il campione puro mostra una area omogenea, compatta e priva di porosità, la rugosità media calcolata in questo campione risulta essere pari a 0,44 μm . Il campione # 1 ha mostrato una superficie omogenea similmente al cam-

**Figura 4.** Curva sforzo vs deformazione rappresentativa dei campioni.

pione bianco. La superficie mostra la presenza di rugosità comprese tra decine di micron e ordini nanometrici, difficili da evidenziare con la microscopia ottica. A ogni modo, il valore risulta essere 0,64 μm . Nel campione # 2 a differenza degli altri campioni, si evidenzia la presenza di pori che danno un valore medio di rugosità pari a 0,53 μm ma con solchi profondi fino a circa 70 μm . Il campione # 3, infine, ha un valore di rugosità media pari a 0,58 μm .

Discussione

Il principio su cui si basa l'utilizzo dell'antibiotico in aggiunta al cemento è che esso venga gradualmente rilasciato all'interno dell'articolazione affetta, così come nell'interfaccia osso/protesi per ottenere un'alta concentrazione di antibiotico locale. Da alcuni anni l'attenzione si è sempre più concentrata sulle caratteristiche e le modalità di rila-

scio dell'antibiotico dal cemento, sulle sue proprietà biomeccaniche e microbiologiche, in maniera tale da ottenere maggiori quantità di antibiotico locale, mantenendo una buona resistenza al carico ⁴. Un aumento della porosità del cemento determina sicuramente un incremento dell'eluizione di antibiotico. Per aumentare la porosità sono state testate diverse strategie: McLaren ⁵ ha eseguito diversi studi in cui sono stati utilizzati dei riempitivi inerti come la glicina, il sucrosio e lo xilitolo per aumentare la porosità del cemento e rendere quindi l'antibiotico più biodisponibile. Chang ⁶ ha comparato l'eluizione del cemento in 3 diverse formulazioni: antibiotico in polvere, antibiotico liquido polvere di antibiotico e xilitolo. Tutti i campioni hanno mostrato un rialzo improvviso durante il primo giorno, con un rapido decremento nei giorni successivi (liquido e xilitolo hanno avuto un rilascio maggiore rispetto alla polvere). Nel nostro studio, invece, si comparano 3 diverse formulazioni, valutando quale sia il campione con più antibiotico nell'eluato. Dai risultati ottenuti è stato confermato quello che si era già evidenziato all'analisi *in vitro* ⁷. In nessun paziente si è riuscito ad isolare il biofilm, dimostrando così l'efficacia di questa formulazione nella sua eradicazione. Nel follow-up a distanza, per quanto esiguo sia il numero di pazienti, nessuno ha avuto una recidiva di infezione ad 1 anno, con un recupero della funzionalità dell'arto affetto. Diversi altri studi si sono concentrati sul rilascio di antibiotico sia *in vitro* che *in vivo*, come ad esempio quello di Bunetel ⁸ in cui si è valutato il rilascio di gentamicina *in vivo* da campioni di sangue, urina e dai drenaggi post operatori (la concentrazione di gentamicina era di 0,5 g in 60 g di cemento). Anche Paz ⁹, in uno studio comparabile al nostro, ha valutato il rilascio *in vitro* di vancomicina confrontandola con la cefazolina. Secondo i suoi risultati il campione contenente entrambi gli antibiotici è quello che riesce, in 28 giorni, a rilasciare di più, supponendo una sinergia tra i due antibiotici. Le differenze con il nostro studio sono diverse: anzitutto nel numero e nella preparazione dei campioni in quanto a parte il diverso quantitativo o tipologia di antibiotico non vi è una diversa metodica di preparazione degli stessi. Inoltre, per quanto riguarda le prove meccaniche Paz ha valutato non soltanto le differenze tra i vari gruppi alla compressione e al piegamento ma anche dopo aging di 1 mese. Proprio in riferimento agli studi biomeccanici, vi sono diversi autori con pareri contrastanti: Dunne ¹⁰, nel suo studio afferma che in condizioni di infezioni croniche l'utilizzo dell'antibiotico nel cemento lo rende solo più debole senza poter agire sul biofilm formato dai batteri, mentre Krause ¹¹, pur riconoscendo la diminuita resistenza del cemento antibiotato rispetto a un normale cemento acrilico, afferma che entrambi superano lo standard richiesto e che in ogni caso molto dipende anche dal tipo di cemento base. Anche dalle nostre prove a compressione, si nota

come il campione bianco (Tc) ha un andamento della curva σ - ϵ affine al materiale di riferimento, confermando, in maniera indiretta, che la preparazione standard presenta le proprietà meccaniche migliori.

Per quanto riguarda la durezza, dal confronto dei risultati si evince come questi siano in linea con i risultati delle prove di compressione e che il campione bianco risulta essere il composto più duro. Di poco inferiore risulta la durezza del campione # 1. Come prevedibile per la propria microstruttura è il campione # 2 ad avere la durezza minore, mentre il campione # 3 risulta avere una durezza intermedia. I risultati quindi confermano le ipotesi di differenza microstrutturale tra i quattro campioni e si configurano come una valida conferma delle prove di compressione.

Confrontando i valori di rugosità, il campione # 1, presenta valori più alti di rugosità (0,64 μ m), mentre il campione bianco, presenta valori più bassi di rugosità (0,44 μ m). Nei campioni # 2 e # 3 la vancomicina aumenta in generale l'irregolarità superficiale inducendo particolari pori micrometrici e aumentando la rugosità superficiale.

Per quanto riguarda l'aspetto microbiologico, diversi studi, in letteratura si sono concentrati sulle capacità antibatteriche dei cementi antibiotati provando, *in vitro*, l'efficacia degli eluati ottenuti con procedimenti simili al nostro. Alcuni lavori come quello di Sakoulas ¹², testano le capacità antibatteriche del cemento su diversi tipi di stafilococchi aureus isolati da pazienti infetti dividendoli in tre gruppi in base ai risultati (gruppo 1: 0% di attività con vancomicina; gruppo 2: 23.1%; gruppo 3: 50%). Altri, invece hanno testato la capacità antibiotica dell'eluato usando dei dischi per evidenziare in maniera visiva l'inibizione della crescita dei batteri ¹³. Andollina ¹⁴ valuta le capacità antibatteriche di cementi con diverse concentrazioni di vancomicina mentre Chang ⁶, valuta l'azione dell'eluato di tre diversi campioni con 1g di antibiotico su 40 g di cemento, 4 g/40 g e 8 g/40 g e con tre diversi antibiotici: vancomicina, teicoplanina e daptomicina. Secondo Chang, i campioni con teicoplanina rilasciano l'antibiotico molto più a lungo rispetto a quelli con altri antibiotici. Inoltre, i campioni con 8g di antibiotico mostrano un'azione antibatterica per tutti i 60 giorni verso tutti i ceppi (MSSA, MRSA, VISA); quelli con 4 g di antibiotico rivelano un'azione antibatterica fino a 21 giorni (tranne quelli con teicoplanina che la mostrano fino a 40) sul MSSA con risultati meno favorevoli per MRSA e VISA e infine i campioni con 1g di antibiotico, mostrano un'azione antibatterica solo per il primo giorno. Confrontandoci con quest'ultimo lavoro, abbiamo valutato l'azione antibatterica basandoci sul tipo di preparazione del cemento e non sulla quantità di antibiotico usato. Con queste premesse abbiamo ottenuto che tutti i tre i campioni riescono a rilasciare una quantità tale di vancomicina da superare la MIC batterica (MSSA) fino al 60 giorno, inibendone la proliferazione.

Conclusioni

Riteniamo quindi che dal nostro studio è effettivamente evidenziabile un maggior rilascio di antibiotico dal cemento preparato tramite la metodica numero uno. Si può rilevare, tramite i dati ottenuti, la presenza di una buona concentrazione di antibiotico eluito anche a distanza di 20 giorni in tutte e 3 le formulazioni, nonostante la netta differenza che si apprezza tra il primo campione e gli altri. Infatti dai risultati ottenuti testando i vari eluati sui ceppi batterici di MSSA, MRSA, sembra evidente come la metodica di preparazione del primo campione sia quella da preferire per avere una maggiore azione battericida. Ciò viene confermato anche in vivo, con una guarigione dall'infezione a 1 anno per tutti i pazienti sottoposti allo studio.

Per quanto riguarda le prove biomeccaniche è opportuno sottolineare come i campioni, in tutte le prove non danno risultati estremamente variegati tra di loro, e nonostante questo, la cosa più importante che si evince è che nonostante al paziente non sia concesso il carico sull'arto protesizzato tutti i campioni superano abbondantemente il minimo di 50mPA alla compressione stabilito dalle normative internazionali. Tornando infatti alla questione elutiva-microbiologica, bisogna considerare che all'interno dell'osso e vi possono essere dei focolai (sequestri ossei) che, non essendo raggiunti dall'antibiotico mantengono attiva l'infezione; secondariamente alcuni batteri, tra cui lo *Stafilococcus aureus* o lo *Pseudomonas aeruginosa*, riescono a mutare in SCV (*small colonies variant*)¹⁵ che, potendo essere endocellulari e avendo una mutazione che causa un rallentamento del metabolismo, potrebbero non risentire delle alte concentrazioni di antibiotico al di là della sensibilità. Questi due fattori potrebbero essere, insieme alla formazione di un biofilm batterico, la spiegazione al perché ancora oggi vi sono dei casi che non riescono a eradicare l'infezione e guarire.

Ringraziamenti

I miei ringraziamenti vanno alla cordialità e professionalità di tutte le figure appartenenti all'Istituto Codivilla Putti di Cortina d'Ampezzo, in particolare alla Divisione dedicata alla diagnosi e cura delle Osteomieliti, diretta dal prof. Centofanti, che da Maggio 2017 ha terminato la sua attività.

Bibliografia

- 1 Azzam K, McHale K, Austin M, et al. *Outcome of a second two-stage reimplantation for periprosthetic knee infection*. Clin Orthop 2009;467:1706-14. doi: 10.1007/s11999-009-0739-4.
- 2 Parvizi J, Gehrke T, Chen AF. *Proceedings of the international consensus on periprosthetic joint infection*. Bone Jt J 2013;95-B:1450-2. doi: 10.1302/0301-620X.95B11.33135.
- 3 Coyle MB. *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. American Society for Microbiology 2005.
- 4 Pipino F. *Bone Cement and cemented fixation of implants: 40 years of clinical practice and prospective for the future*. Tecres 2001, pp. 222.
- 5 McLaren AC, McLaren SG, Hickmon MK. *Sucrose, xylitol, and erythritol increase PMMA permeability for depot antibiotics*. Clin Orthop 2007;461:60-3. doi: 10.1097/BLO.0b013e3181123e90
- 6 Chang Y, Chen W-C, Hsieh P-H, et al. *In vitro activities of daptomycin-, vancomycin-, and teicoplanin-loaded polymethylmethacrylate against methicillin-susceptible, methicillin-resistant, and vancomycin-intermediate strains of Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:5480-4. doi: 10.1128/AAC.05312-11.
- 7 Fenga D, Currò M, Rosi M, et al. *Quantitative study on Vancomycin release from cement in 3 different formulations: preliminary results and antimicrobial activity*. J Biol Regul Homeost Agents 2016;30(4 Suppl 1):229-35.
- 8 Bunetel L, Segui A, Cormier M, et al. *Release of gentamicin from acrylic bone cement*. Clin Pharmacokinet 1989;17:291-7. doi: 10.2165/00003088-198917040-00006.
- 9 Paz E, Sanz-Ruiz P, Abenojar J, et al. *Evaluation of elution and mechanical properties of high-dose antibiotic-loaded bone cement: comparative «in vitro» study of the influence of vancomycin and cefazolin*. J Arthroplasty 2015;30:1423-9. doi: 10.1016/j.arth.2015.02.040
- 10 Dunne N, Hill J, McAfee P, et al. *In vitro study of the efficacy of acrylic bone cement loaded with supplementary amounts of gentamicin: effect on mechanical properties, antibiotic release, and biofilm formation*. Acta Orthop 2007;78:774-85. doi: 10.1080/17453670710014545.
- 11 Krause W, Mathis RS. *Fatigue properties of acrylic bone cements: review of the literature*. J Biomed Mater Res 1988;22(A1 Suppl):37-53.
- 12 Sakoulas G, Moise-Broder PA, Schentag J, et al. *Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia*. J Clin Microbiol 2004;42:2398-402. doi: 10.1128/JCM.42.6.2398-2402.2004.
- 13 Gasparini G, De Gori M, Calonego G, et al. *Drug elution from high-dose antibiotic-loaded acrylic cement: a comparative, in vitro study*. Orthopedics 2014;37:e999-1005. doi: 10.3928/01477447-20141023-57.
- 14 Andollina A, Bertoni G, Bertoni F, et al. *Vancomycin and meropenem in acrylic cement: elution kinetics of in vitro bactericidal action*. Chir Organi Mov 2008;91:153-8.
- 15 Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, et al. *Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections*. Nat Rev Microbiol 2006;4:295-305. DOI: 10.1038/nrmicro1384.

Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse con l'argomento trattato nell'articolo.