

Mikrobiologické a farmakologické vlastnosti kostního cementu VancogenX

Microbial and Pharmacological Characteristics of VancogenX

J. GALLO¹, K. BOGDANOVÁ², M. ŠILLER³, M. ŠVÁBOVÁ⁴, J. LOŠŤÁK¹, M. KOLÁŘ²

¹ Ortopedická klinika LF UP a FN Olomouc

² Ústav mikrobiologie, LF UP a FN Olomouc

³ Ústav farmakologie, LF UP v Olomouci

⁴ Oddělení klinické biochemie, FN Olomouc

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

Prosthetic joint infection is a feared complication in total hip arthroplasty. The use of antibiotic-impregnated bone cement is the important part of preventive and therapeutic strategies. At present a number of commercial bone cements are available and support of their use by the results of experimental trials and clinical studies has varied. In relation to this issue we studied essential microbiological and pharmacological characteristics of VancogenX in comparison with gentamicin-loaded bone cement used conventionally.

MATERIAL AND METHODS

Based on a previously described protocol, we tested pellets of four commercial bone cements, namely, Hi-Fatigue G, Palacos R+G, VancogenX, and Palacos R as a control. Bone cement was prepared in a vacuum-mixing system. The strains used for bacterial load included *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Each cement was tested for its antimicrobial and antibiofilm activities and the results were evaluated by standard methods. In addition, we investigated time-related release of gentamicin and vancomycin from the bone cements tested.

RESULTS

All antibiotic-loaded cement pellets were able to prevent growth of the bacterial strains tested. The bactericidal effect lasted for several days in relation to the bacterial species and cement used, with the exception of *S. epidermidis* whose growth was inhibited by gentamicin-loaded cement only for one day. The antibiotic-loaded pellets also prevented the formation of a biofilm for 24 hours at least. The major amount of vancomycin (32.915 mg/l) was released from VancogenX to MH medium within 24 hours and the last measureable amount (4.327 mg/l) was recorded at 48 hours after the start of the experiment. In physiological saline the highest level of vancomycin was 139.852 mg/ml measured at 24 hours, and the antibiotic was detectable at a level of 2.334 mg/ml as late as 8 days after the experiment started. Release of gentamicin from VancogenX was as follows: the 24-hour level was higher in MH medium than physiological saline (178 versus 131.4 mg/ml); however, gentamicin was still detectable in physiological saline at 192 hours after the start of the experiment while no gentamicin was found in MH medium after 72 hours.

DISCUSSION

The antimicrobial effect of VancogenX bone cement was not an unexpected finding since both gentamicin and vancomycin have been used with bone cement for a long time and their combination is optimal in terms of preventing prosthetic joint infection. However, there is a disputable issue of poor release of vancomycin from bone cement. In MH medium we were able to detect the vancomycin released from VancogenX only for two days after the initial rapid elution while its release into physiological saline seemed to be slower but much longer. It is possible that more vancomycin is released from bone cement, but this amount is immediately bound to proteins in the cement vicinity and this process is not detectable by any analytical method.

CONCLUSIONS

The bone cement VancogenX showed excellent antimicrobial and antibiofilm properties and can be recommended for use in orthopaedic practice. Therapy of prosthetic joint infection is the main indication. Extension of the indication to the prevention of prosthetic joint infection in high-risk patients should be preceded by biomechanical studies demonstrating that the cement is appropriate for long-term implant fixation.

Key words: antibiotic-loaded PMMA, vacuum mixed, prosthetic joint infection, gentamicin, vancomycin, dilution, prevention, VancogenX.

ÚVOD

Infekce kloubní náhrady (dále pouze IKN) je jednou z nejčastějších a nejobávanějších komplikací endoprotetiky. Odhaduje se, že k IKN může dojít až u 5 % pacientů s endoprotézou kyčlí nebo kolen (28). Vyšší incidence by měla být u revizních operací a u pacientů se zhoršenou imunitní odpovědí. Podstatné je, že recentní epidemiologické modely naznačují další nárůst těchto infekcí v příštích desetiletích (21). Odmyslíme-li si osobní utrpení pacientů, je zřejmé, že v souvislosti se zmíněnými prognózami dojde k výraznému nárůstu nákladů spojených s léčbou IKN (20, 30). Z těchto důvodů je zcela zásadní volba správné preventivní strategie, která by minimalizovala riziko vzniku IKN. Z pohledu prevence jsou nejefektivnější postupy, které ovlivňují perioperační a časné pooperační období, kdy se tvoří biofilm (14).

Je prokázáno, že riziko IKN snižuje systémové podávání antibiotik (9). Podobně se zdá být dostatečně ověřeno protektivní působení kostních cementů s antibiotikem, což v kombinaci se systémovým podáváním vytváří jakýsi „dvojblok“ snižující významně riziko vzniku IKN (19). Podle jedné recentní studie by měly být bezcementové kyčle dokonce až o 50 % náchylnější k infekci kloubních náhrad ve srovnání s cementovanými primárními náhradami (7). K celkovému podání se volí většinou antibiotika působící především na gram-pozitivní bakterie tvořící kožní mikroflóru, u nichž se předpokládá, že by mohly kontaminovat operační ránu. V lokální variantě jsou nejrozsáhlejší zkušenosti s gentamicinem, který se u fixačních cementů přidává v koncentraci 0,5 až 1,0 g na 40 g kostního cementu. Vyšší koncentrace antibiotik (tj. nad 1g na 40 g cementu) zhoršují mechanické vlastnosti kostního cementu, a proto se v preventivní indikaci rutinně nepoužívají (18). Do kostního cementu se přidávají také některá další antibiotika (tab. 1).

V naší předchozí studii jsme *in vitro* prokázali, že kostní cement, do něhož jsme přidali gentamicin a vankomycin v dávce 1g na 40 g kostního cementu, bránil

efektivněji růstu kmenů *Staphylococcus aureus* ve srovnání s komerčně vyráběnými cementy, obsahujícími pouze gentamicin (12). Nedávno byl na trh uveden nový kostní cement VancogenX (firmy Tecres S.p.a., Itálie). Výrobce uvádí, že tento cement by se měl používat k dočasné fixaci spacerů a k fixaci revizních protéz v původně infekčním terénu, zvláště tehdy, jestliže je původce citlivý na gentamicin a vankomycin. Zajímalo nás v této souvislosti, nakolik se bude nový komerčně vyráběný kostní cement chovat ve shodě s teoretickými a experimentálními předpoklady vůči stafylokokům a dalším potenciálním původcům IKN.

MATERIÁL A METODIKA

Příprava vzorků kostního cementu

Na operačním sále jsme za naprosto stejných podmínek připravili v jeden den vzorky testovaných kostních cementů:

1. Hi-Fatigue G Bone Cement s gentamicinem (AAP Biomaterials GmbH, Německo);
2. Palacos R+G s gentamicinem (Heraeus Medical GmbH, Německo);
3. VancogenX s gentamicinem a vankomycinem (Tecres S.p.a., Itálie);
4. Palacos R bez antibiotika (Heraeus Medical GmbH, Německo)

Všechny testované kostní cementy až na VancogenX u nás běžně používáme. Každý testovaný kostní cement byl namíchán zkušenou sálou sестrou ve vakuu a následně z něj byly v pracovní fázi dvěma týmy připraveny pelety o průměru cca 0,5x0,3 cm (průměrná váha 39,4±8,39 mg). Vzorky byly umístěny do sterilní nádoby (obr. 1) a odeslány do mikrobiologické laboratoře.

Výběr testovacích kmenů

Na základě našich předchozích publikací (11, 13) a literatury (8, 24) jsme vybrali z archivu bakteriálních izolátů Ústavu mikrobiologie LF UP a FN Olomouc



Obr. 1. Sterilní kontejnery s připravenými peletami z různých typů kostního cementu.

Tab. 1. Příklady komerčně vyráběných kostních cementů, které je možné použít k fixaci implantátů kloubních náhrad; PMMA – polymethylmethakrylát

Název	Výrobce	Antibiotikum (ATB)	Koncentrace ATB v g/ 40 g PMMA
Palacos R + G	Heraeus	Gentamicin	0,5
Copal G + C	Heraeus	Gentamicin + Clindamycin	1,0 + 1,0
Simplex P T	Stryker	Tobramycin	1,0
Simplex P E + C	Stryker	Erythromycin + Colistin	0,5 + 0,24
Hi-Fatigue G	Zimmer	Gentamicin	0,55
Cemex Genta	Exactech	Gentamicin	1,0
Cobalt G-HV	Biomet	Gentamicin	0,5
Refobacin Cement R	Biomet	Gentamicin	0,5
SmartSet GMV	DePuy	Gentamicin	1,0
VancogenX	Tecres S.p.a.	Vancomycin + Gentamicin	1,0 + 1,0
VersaBond AB	Smith & Nephew	Gentamicin	1,0

následující referenční kmeny bakterií: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, oxacilin-rezistentní *Staphylococcus epidermidis* A/5879, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 a *Escherichia coli* ATCC 35218.

Stanovení antimikrobního účinku

Každý vzorek cementu, včetně kontroly bez antibiotik, byl testován se všemi bakteriálními kmeny čtyřikrát. Přibližně 4 až 5 bakteriálních kolonií bylo naočkováno pomocí bakteriální kličky do 2 ml MH bujónu (TRIOS) a po hodině aerobní inkubace v 37 °C smícháno v Petriho misce s 10 ml destilované sterilní vody. Suspenze byla následně inokulována pomocí očkovacího ježka do mikrotitračních destiček se 150 µl BHI bujónu (Himedia) a cementem. Po aerobní inkubaci trvající 24 hodin při 37 °C byly vzorky cementu přemístěny do další jamky s novým BHI bujónem, a znovu naočkovány příslušným bakteriálním kmenem a inkubovány. Tento proces se opakoval celkem po dobu osmi dní. Hodnocení bylo provedeno na základě růstu bakterií v jamce mikrotitrační destičky, což se v pozitivním případě projevilo jasně viditelným zákallem. Současně byl po každé inkubaci BHI bujón vyočkován na krevní agar (TRIOS) pro určení baktericidního/ bakteriostatického účinku.

Stanovení tvorby biofilmu

Jednotlivé vzorky cementu byly sterilně umístěny do jamek mikrotitrační destičky obsahujících 150 µl BHI bujónu. Destičky byly naočkovány bakteriálními kmeny a aerobně kultivovány při 37 °C 24 a 48 hodin. Vzorky cementu pak byly sterilně přemístěny do suchých sterilních zkumavek a ponechány v inkubátoru při 37 °C 24 hodin a znovu vloženy do sterilního BHI bujónu a inkubovány při 37 °C 24 hodin. Pozitivita růstu byla hodnocena pomocí případného zákalu a zároveň byl BHI bujón po inkubaci vyočkován na krevní agar pro konfirmaci negativního růstu testovaných bakterií. V případě pozitivního růstu bakterií byla stanovena identita bakteriálních kmenů, tedy naočkovaných do bujónu na začátku experimentu a následně získaných z vysušených cementů.

Stanovení identity bakterií

Podobnost, resp. identita izolátů *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Enterococcus faecalis* byla analyzována srovnáním restrikčních fragmentů celogenomové DNA separovaných pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE). Bakteriální DNA byla izolována postupem popsaným dříve a naštěpena restrikčními enzymy *XbaI* (*Escherichia coli*), *SpeI* (*Pseudomonas aeruginosa*) a *SmaI* (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*) (16). PFGE byla provedena v 1,2% agarózovém gelu. Separace fragmentů DNA získaných štěpením endonukleázou *XbaI* probíhala 24 h při 6 V.cm⁻¹, pulzních časech 2–35 s a 14 °C. Pro DNA štěpenou endonukleázou *SpeI* byly použity parametry 23 h, 6 V.cm⁻¹, pulzní časy 5–60 s a teplota 12 °C. DNA stafylokoků a enterokoků byla separována 28 h při napětí 5 V.cm⁻¹, pulzních časech 1–75 s a 14 °C. Následně byly gely obarveny ethidium bromidem a vyfotografovány. Výsledné restrikční profily byly porovnány prostřednictvím počítačového programu GelCompar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Eluce antibiotik z testovaných cementů

Disoluční studie byla prováděna ve fyziologickém roztoku (FR), (Fresenius KABI, Itálie) a v MH médiu. Cementový přípravek (peletka) byl vložen buď do MH média (1 ml) nebo do fyziologického roztoku (1 ml) a byl inkubován 24 h při teplotě 37 °C. Po 24 h byla peletka s testovaným přípravkem vyjmuta z média, resp. z FR, které bylo zamraženo při –70 °C, a následně vložena do nového média nebo do FR. Takto bylo postupováno celkem šestkrát u cementu s gentamicinem (vzorky po 24hod, 48, 72, 96, 120 a 192 h a osmkrát u cementu s vankomycinem (vzorky po 24 h, 48, 72, 96, 120, 144, 168 a 192 h). Po rozmrazení byly vzorky dále zpracovány a následně analyzovány vhodnou analytickou metodou. Stejným postupem byly testovány kontrolní vzorky cementu bez obsahu antibiotik.

1. Uvolňování vankomycinu ve fyziologickém roztoku

Vzorky byly po rozmrazení připraveny ihned k analýze. Koncentrace vankomycinu v příslušných vzorcích fyziologického roztoku byly stanoveny podle upravené metody Abu-Shandi (1). Analýza probíhala na kapa-

Tab. 2. Růst v bujónu s cementem

	Testovaný cement							
	PALACOS R+G		VANCOGEN X		HI FATIGUE G		PALACOS R	
Kmen	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1-879	-	-	-	-	-	-	+	+

Tab. 3. Délka antibakteriálního působení antibiotik v testovaném kostním cementu (dny – včetně)

Kmen	PALACOS R+G	VANCOGEN X	HI FATIGUE G
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8	8	8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8	7	8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	8	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	8	8	8
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2	6	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1-879	1	5	1

Tab. 4. Průkaz biofilmu růstem v čistém bujónu po 24 hod odsušení

	Testovaný materiál			
	PALACOS R+G	VANCOGEN X	HI FATIGUE G	PALACOS R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1-879	-	-	-	+

linovém chromatografu Prominence LC20 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Jako stacionární fáze byla použita kolona LiChroCART® 250-4 LiChrospher 100 RP-18 (Merck, Darmstadt, Německo). Analyt byl detekován spektrofotometricky při vlnové délce 210 nm. Eluce vankomycinu z kolony probíhala isokraticky pomocí mobilní fáze tvořené 25mM K/PO₄ (fosfátovým pufr) o pH = 6,5 a 100% acetonitrem v poměru 85:15 (v/v). Analýza probíhala při běžné laboratorní teplotě. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Koncentrace vankomycinu byly hodnoceny metodou vnějšího standardu. Metoda byla lineární v rozsahu koncentrací vankomycinu 1 mg/l–500 mg/l.

2. Uvolňování vankomycinu v MH médiu

Pro velmi složitou biologickou matici (mikrobiologické médium) bylo stanovení koncentrací vankomycinu v tomto případě poměrně komplikované. Analytická metoda popsáná v předchozím odstavci musela být upravena a rozšířena o extrakční metodu, která ji předcházela. Pro úpravu biologické matrice byla zvolena metoda extrakce na pevné fázi (SPE extrakce) za použití extrakčních kolonek Oasis® HLB 1cc (Waters, Massachusetts, USA). Jednotlivé kolonky byly nejprve kondicionovány 1 ml methanolu a následně promyty 1 ml deionizované vody. Následně byl na kolonky

Tab. 5. Výsledky analýzy uvolňování vankomycinu z kostního cementu VancogenX; *** hladina vankomycinu klesla pod limit detekce.

Časová osa	VANCOGENX	
	médium mg/l	FR mg/l
24 h	32,915	139,852
48 h	4,327	19,935
72 h	***	9,323
96 h	***	6,261
120 h	***	5,162
144 h	***	4,631
168 h	***	3,501
192 h	***	2,334

nanesen vzorek média o objemu 1 ml. Kolonky byly postupně promývány 500 µl vody a 500 µl 5% methanolu ve vodě (v/v). Vankomycin byl z kolonek eluován 600 µl směsí acetonitril: voda (50:50 v/v). Eluát byl odpařen v atmosféře dusíku a rekonstituován v 200 µl mobilní fáze A. Analýza probíhala na kapalinovém chromatografu Prominence LC20 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Jako stacionární fáze byla zvolena kolona Kinetex 2,6u HILIC 100A 150 x 4.6 mm (Phenomenex,

Kalifornie, USA). Analyt byl detekován spektrofotometricky při vlnové délce 210 nm. Eluce vankomycinu z kolony probíhala gradientově pomocí kombinace mobilní fáze A tvořené pufrem - 2,5mM mravenčanem amonným o pH = 5,8 (adjustace kyselinou mravenčí) a mobilní fáze B, kterou byl 100% acetonitril. Gradient byl nastaven následovně: 0. min – B 70%, 6. min – B 10 %; 7. min – B 70 %, 15. min – B 70 %. Analýza probíhala při běžné laboratorní teplotě. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Koncentrace vankomycinu byly hodnoceny metodou vnějšího standardu. Metoda byla lineární v rozsahu koncentrací vankomycinu 1 mg/l–200 mg/l.

3. Uvolňování gentamicinu v MH médiu a FR

Díky své specifické struktuře je gentamicin běžnými analytickými metodami obtížně stanovitelný. Z několika možných postupů (derivatizace pomocí specifických derivatizačních činidel a následné stanovení derivátu gentamicinu s využitím fluorescenční případně UV detekce, kapalinová chromatografie) byla pro stanovení gentamicinu v MH médiu a ve FR nakonec zvolena imunoanalytická metoda (reagenční kit AxSYM Gentamicin, Abbot Diagnostics, Česká republika). Analýza vzorků proběhla ve spolupráci s Oddělením klinické biochemie FN Olomouc.

VÝSLEDKY

Antimikrobní aktivita kostních cementů

Všechny testované kostní cementy s obsahem antibiotika dokázaly bránit růstu a množení testovaných bakteriálních kmenů, což lze považovat za důkaz jejich antimikrobního účinku. Po vyočkování bujónů na krevní agar s následným negativním růstem bylo zřejmé, že šlo o baktericidní aktivitu (tab. 2). Baktericidní účinek přetrvával několik dnů v závislosti na bakteriálním druhu a použitém typu cementu, minimálně však 2 dny s výjimkou *S. epidermidis*, u něhož byla účinnost cementů obsahujících pouze jeden typ antibiotika zkrácena na jeden den (tab. 3).

Tvorba biofilmu na povrchu kostního cementu

Testované kostní cementy s obsahem antibiotika dokázaly bránit tvorbě biofilmu minimálně 48 hodin u všech testovaných bakterií a naopak všechny testované bakterie tvořily biofilm na povrchu kontrolního cementu bez antibiotika (tab. 4). Identita kmenů získaných z testovaných cementů po odsušení s původními testovacími kmeny byla potvrzena PFGE restričních fragmentů celogenomové DNA.

Eluce antibiotik z kostního cementu

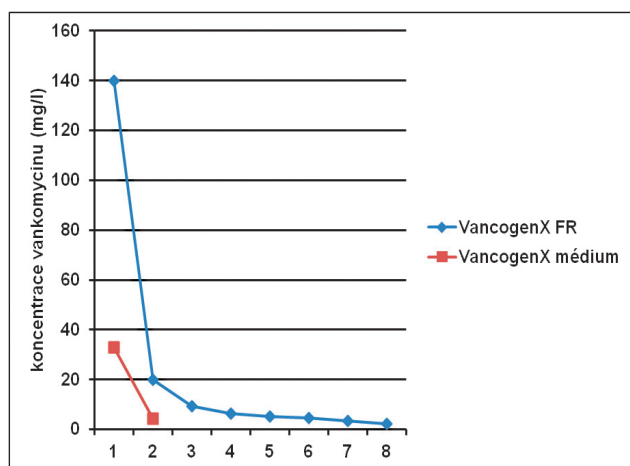
Výsledky jednotlivých analýz pro vankomycin jsou uvedeny v tabulce 5 a na obrázku 2. Výsledky jednotlivých analýz pro gentamicin jsou uvedeny v tabulce 6 a na obrázku 3. Vankomycin se uvolňoval z preparátu VancogenX daleko lépe do FR než do testovacího MH bujónu, zatímco v případě gentamicinu tomu bylo obráceně. Vankomycin se uvolnil z preparátu VancogenX do MH média v největší míře 24 h od zahájení expe-

rimentu, kdy byla stanovená koncentrace 32,915 mg/l. Naopak poslední měřitelná koncentrace vankomycinu v testovacím médiu byla 48 h od počátku experimentu (4,327 mg/l). Jestliže byl použit jako testovací médium fyziologický roztok, byla koncentrace vankomycinu naměřená v roztoku mnohonásobně vyšší než v případě MH média (139,852 mg/ml). Navíc byl vankomycin detekován ve fyziologickém roztoku ještě 8. den od zahájení experimentu (2,3341 mg/l). V případě analogického testování uvolňování gentamicinu z cementu VancogenX do fyziologického roztoku byla nejvyšší koncentrace naměřena 24 h od začátku experimentu (131,4 mg/ml) a hladina gentamicinu byla stanovitelná ještě 8. den od počátku experimentu (1,54 mg/ml). V MH médiu byla zjištěna 24 hodin od začátku experimentu koncentrace gentamicinu 178 mg/ml a poslední měřitelná koncentrace gentamicinu v MH médiu byla 5,11 mg/ml, a to 72 hodin od počátku experimentu.

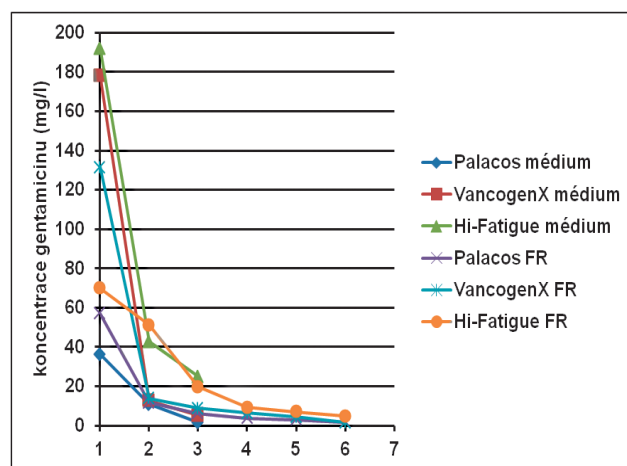
DISKUSE

V naší studii jsme zjistili, že všechny testované kostní cementy s obsahem gentamicinu, resp. gentamicinu a vankomycinu vykazovaly vůči testovacím bakteriím baktericidní účinek. Baktericidní účinek přetrvával minimálně 24 hodin od inokulace, většinou však několik dnů. Všechny testované cementy s antibiotikem také dokázaly zabránit tvorbě biofilmu na povrchu testovaných pelet. Uvolňování gentamicinu do média a do fyziologického roztoku probíhalo u cementu VancogenX jinak než uvolňování vankomycinu. Gentamicin se „snadněji“ vylučoval do komplexnějšího média a o něco hůře do fyziologického roztoku. Naopak vankomycin se uvolňoval snadněji do fyziologického roztoku a do „komplexnějšího“ roztoku se vylučoval pouze krátkou dobu a v mnohem nižších koncentracích.

V naší předchozí studii jsme zjistili excelentní baktericidní chování kostních cementů s příměsí gentamicinu a vankomycinu vůči stafylokokům (12). V aktuální studii jsme chtěli prověřit chování komerčně vyráběného kostního cementu s obsahem gentamicinu a vankomycinu vůči širšímu spektru potenciálních patogenů. Podle některých studií nabízí komerčně vyráběné cementy s antibiotikem o něco větší a pravidelnější zónu inhibice než kostní cementy, do nichž se stejné antibiotikum přidává na operačním sále (10). Na stranu druhou by mohlo být uvolňování antibiotik ovlivněno způsobem přípravy komerčně vyráběného kostního cementu. Dnešním standardem je vakuové míchání cementu, které by mělo výrazně redukovat porozitu kostního cementu a zdánlivě tak bránit uvolňování antibiotika. V jedné recentní studii se však ukázalo, že pravidlo o horším uvolňování se nedá aplikovat paušálně na všechny kostní cementy (22). Tak například Palacos R+G míchaný ve vakuu vykazoval nejdlejší antimikrobní působení za všech testovaných cementů a ještě 4. den se uvolnil v koncentraci 32 mg/l, zatímco při míchání za atmosférického tlaku se na uvedenou hodnotu dostal už 2. den. Naopak SmartSet GMV se o něco



Obr. 2. Graf znázorňující uvolňování vankomycinu z kostního cementu VancogenX v závislosti na prostředí.



Obr. 3. Graf znázorňující uvolňování gentamicinu z testovaných kostních cementů v závislosti na prostředí.

Tab. 6. Výsledky analýzy uvolňování gentamicinu z jednotlivých testovaných kostních cementů; *** hladina gentamicinu klesla pod limit detekce; FR – fyziologický roztok

Čas	MH médium			FR		
	Palacos (mg/l)	VancogenX (mg/l)	Hi-Fatigue (mg/l)	Palacos (mg/l)	VancogenX (mg/l)	Hi-Fatigue (mg/l)
24 h	36,2	178	192	57	131,4	70
48 h	10,8	12,7	42,8	11,6	13,9	51,2
72 h	1,61	5,11	25	6,15	8,9	19,72
96 h	***	***	***	3,76	6,36	9,3
120 h	***	***	***	3,08	4,36	7,03
192 h	***	***	***	1,77	1,54	4,89

lépe choval při míchání v atmosférickém tlaku nežli ve vakuu. Avšak v žádné testovací situaci nedosáhla koncentrace gentamicinu u SmartSet GMV po 48 hodinách na 32 mg/l. Lepší uvolňování antibiotika při míchání ve vakuu vysvětlují někteří autoři mnohem větším počtem mikropór než u cementu připraveného za normálního tlaku. Z nich se může antibiotikum uvolňovat po delší dobu a ve větších koncentracích (23). V naší studii jsme posuzovali pouze vakuově míchané kostní cementy a nepozorovali jsme výraznější rozdíly v antimikrobní a antibiofilmové aktivitě mezi jednotlivými testovanými cementy.

U pelet vytvořených z kostních cementů s obsahem antibiotik jsme zjistili výborný baktericidní efekt i schopnost eliminovat tvorbu biofilmu na rozdíl od pelet z kostního cementu bez antibiotik. Efekt byl prakticky stejný u cementů s gentamicinem jako u cementu, který obsahoval navíc vankomycin. Nabízí se tedy otázka, jaký je vlastně potenciální cíl vankomycinu v uvedené kombinaci. Význam vankomycinu spočívá především v rozšíření spektra účinku i na multirezistentní grampozitivní bakterie, jako jsou především methicilin-rezistentní stafylokoky (25). Vzhledem k současné vysoké úrovni rezistence koaguláza-negativních stafylokoků k methicilinu lze považovat kombinaci gentamicinu s vankomycinem za perspektivně užitečnou.

Základní podmínkou efektivního působení antibiotik je jejich dostatečně dlouhé uvolňování z povrchu kostního cementu v dostatečně vysokých koncentracích. To je funkcí především celkové koncentrace antibiotika

v cementu a rovnoměrnosti v jeho distribuci, protože se uvolňuje pouze z nejpovrchnější vrstvy kostního cementu (27). Bez ohledu na dávku a typ přidaného antibiotika, jsou nejvyšší hladiny zaznamenávány během prvních hodin po vložení do testovacího média, poté následuje většinou rychlý pokles koncentrací až na neměřitelné hodnoty, což je v souladu s našimi výsledky měření gentamicinu i vankomycinu. Pro rutinní profylaktickou indikaci se ovšem používají cementy s příměsí maximálně 1 g antibiotika. Vyšší dávky antibiotik, zvláště přidávané až na sále, narušují polymeraci a mechanické vlastnosti kostního cementu (3). Důležitou roli hraje také typ kostního cementu, přičemž není přesně jasné, co způsobuje rozdíly v dilučních křivkách stejného antibiotika (18, 22). Také my jsme zjistili rozdíly v koncentracích uvolňujícího se gentamicinu mezi jednotlivými testovanými cementy při použití stejné analytické metody (tab. 6).

Některé práce naznačují, že výhodnější by mohlo být smíchání dvou antibiotik, protože si navzájem „vytvoří“ lepší podmínky pro uvolnění z kostního cementu a rozšíří spektrum účinnosti, což platí hlavně pro cementy s vysokou dávkou antibiotik (2). Je také možné, že pro každé antibiotikum existuje specifický diluční koeficient. Podle některých prací se vankomycin uvolňuje z kostního cementu nekonzistentně a hůře (větší závislost na koncentraci) nežli jiná antistafylokoková antibiotika (17). Z hlediska maximální dosažené koncentrace to nemůžeme potvrdit, protože po 24hodinové inkubaci jsme naměřili ve fyziologickém roztoku průměrně 140 mg/l a v MH médiu více než 30 mg/l vankomycinu. Uvedené

Tab. 7. Porovnání eluce vankomycinu z komerčně a manuálně vyráběného kostního cementu; **** hladina vankomycinu klesla pod limit detekce. PMMA (polymethylmethakrylát); HPLC/UV (vysokoučinná kapalinová chromatografie s UV detekcí); FPIA (fluorescenční polarizační imunoanalýza); CP (calcium phosphate, dihydrogenfosforečnan vápenatý); SPE (solid phase extraction, extrakce na pevné fázi); PBS (phosphate buffer saline, fosfátový pufr s přidavkem chloridu sodného), PB (phosphate buffer, fosfátový pufr); KT (kloubní tekutina); FR (fyziologický roztok)

Typ kostního cementu, přidaná dávka vankomycinu	Ručně připravený PMMA + vanko (0, 25 g)	Ručně připravený CP + vanko (0, 25 g)	Ručně připravený PMMA s genta + vanko (2 g)	Ručně připravený PMMA, Spacer G + vanko (1 g)	Ručně připravený PMMA + vanko (4 g)	Komerční preparát VancogenX (vanko 1 g)	Komerční preparát VancogenX (vanko 1 g)
Médium pro diluční studii	PBS	PBS	PBS	PB	KT	FR	MH
Metoda pro stanovení koncentrace vankomycinu	HPLC/UV	HPLC/UV	HPLC/UV	FPIA	HPLC/UV	HPLC/UV	SPE extrakce, HPLC/UV
Diluční koncentrace / množství uvolněného antibiotika 1. den	52,0 mg/l	420,0 mg/l	32,0 mg/l	15,0 mg/spacer	1538,0 mg/l	139,9 mg/l	32,9 mg/l
Diluční koncentrace / množství uvolněného antibiotika 3. den	6,2 mg/l	67,0 mg/l	2,5 mg/l	2,7 mg/spacer	850,0 mg/l	9,3 mg/l	****
Diluční koncentrace / množství uvolněného antibiotika 7. den	2,2 mg/l	45,0 mg/l	****	0,8 mg/spacer	57,9 mg/l	3,5 mg/l	****
Autoři studie	Urabe et al., 2009	Urabe et al., 2009	Chang et al., 2011	Bertazzoni Minelli et al., 2004	Hsieh et al., 2006	Aktuální studie	Aktuální studie

hodnoty lze považovat za dostatečně vysoké a zaručující u většiny grampozitivních bakterií, včetně methicilin-rezistentních stafylokoků, dostatečný antimikrobiální efekt (26). Podobně naměřili jiní autoři relativně vysoké hladiny vankomycinu uvolněného z cementu, do něhož bylo přidáno od 0,5 až po několik gramů antibiotika (tab. 7), (5, 15, 17, 29).

Gentamicin je považován za „standardní“ antibiotikum v kostním cementu, které je efektivní a dobře se z cementu uvolňuje (4). Podle některých prací by měl být také méně závislý na přítomnosti druhého antibiotika v cementu (6). V naší studii se gentamicin uvolňoval z kostního cementu VancogenX relativně dobře do MH média a o něco hůře do fyziologického roztoku, i když mnohem lépe nežli vankomycin. Stejně jako v případě vankomycinu může být vysvětlena variabilita v našich a literárních měření alespoň částečně zvolenou měřicí metodou. Díky své specifické struktuře (gentamicin není čistá chemická entita, ale je tvořen několika funkčními izomery) je totiž gentamicin běžnými analytickými metodami obtížně stanovitelný.

V následující části stručně zmíníme některá omezení naší studie. Především je těžké namodelovat *in vitro* podmínky, které by byly podobné prostředí reálného kloubu. Většina povrchu kostního cementu je orientována ke kostnímu lůžku, resp. ke komponentě. Pouze malá část povrchu kostního cementu je obrácená směrem do dutiny kloubu a je v kontaktu s kloubní kapalinou (zpočátku krví, která se postupně odbarvuje a posléze s kloubním výpotkem). V naší studii byly naproti tomu vzorky cementu testovány v jednoduchém a stabilním kapalném prostředí, přesto byly zjištěny významné rozdíly v uvolňování obou testovaných antibiotik. Ty se však nepromítly do antimikrobiálního a antibiofilmového působení. Určité

námítky je možné vznést také k použití archivních mikrobiálních kmenů, které se mohou chovat jinak nežli divoké nebo multirezistentní klinické kmeny. Další omezení souvisí s použitými analytickými metodami, které je nutné nejen dostatečně validovat, ale v případě měření hladin gentamicinu by bylo vhodné zavést metodu využívající spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem. Stanovení koncentrace antibiotik je ovlivněno také typem testovacího média. Při vývoji metody pro stanovení vankomycinu v MH médiu se ukázalo, že toto médium s obsahem škrobu a řady dalších komponent dokáže zřejmě část vankomycinu adsorbovat a tato frakce pak může „uniknout“ detekční metodě. Proto bylo nutné přistoupit k úpravě vzorku pomocí extrakční metody na pevné fázi.

ZÁVĚR

V předkládané studii jsme zjistili, že kostní cement VancogenX má antimikrobní a antibiofilmový potenciál zcela srovnatelný nebo dokonce lepší ve srovnání s „tradičními“ kostními cementy s antibiotiky. Z tohoto hlediska je proto možné doporučit jeho používání v klinické praxi. Hlavní indikací je terapie infekcí kloubních náhrad. Případnému rozšíření indikací i na prevenci infekcí kloubních náhrad (včetně recidiv) u zvláště rizikových pacientů musí předcházet solidní biomechanické studie, které by doložily pevnostní a únavové vlastnosti cementu VancogenX. Zjistili jsme také, že vankomycin a gentamicin se uvolňují z cementu VancogenX míchaném ve vakuu v závislosti na typu média, v němž se testovaná peleta nacházela. Variabilitu nálezů je alespoň částečně možné vysvětlit použitými analytickými metodami.

Literatura

1. ABU-SHANDI, K. H.: Determination of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395: 527–532, 2009.
2. ANAGNOSTAKOS, K., FURST, O., KELM, J.: Antibiotic-impregnated PMMA hip spacers: Current status. *Acta Orthop.*, 77: 628–637, 2006.
3. ANAGNOSTAKOS, K., KELM, J.: Enhancement of antibiotic elution from acrylic bone cement. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 90: 467–475, 2009.
4. ANAGNOSTAKOS, K., WILMES, P., SCHMITT, E., KELM, J.: Elution of gentamicin and vancomycin from polymethylmethacrylate beads and hip spacers in vivo. *Acta Orthop.*, 80: 193–197, 2009.
5. BERTAZZONI MINELLI, E., BENINI, A., MAGNAN, B., BARTOLOZZI, P.: Release of gentamicin and vancomycin from temporary human hip spacers in two-stage revision of infected arthroplasty. *J. Antimicrob. Chemother.*, 53: 329–334, 2004.
6. BERTAZZONI MINELLI, E., CAVEIARI, C., BENINI, A.: Release of antibiotics from polymethylmethacrylate cement. *J. Chemother.*, 14: 492–500, 2002.
7. DALE, H., SKRAMM, I., LOWER, H. L., ERIKSEN, H. M., ESPEHAUG, B., FURNES, O., SKJELDESTAD, F. E., HAVELIN, L. I., ENGESAETER, L. B.: Infection after primary hip arthroplasty: a comparison of 3 Norwegian health registers. *Acta Orthop.*, 82: 646–654, 2011.
8. DEL POZO, J. L., PATEL, R.: Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N. Engl. J. Med.*, 361: 787–794, 2009.
9. ENGESAETER, L. B., LIE, S. A., ESPEHAUG, B., FURNES, O., VOLLSET, S. E., HAVELIN, L. I.: Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0–14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop. Scand.*, 74: 644–651, 2003.
10. FERRARIS, S., MIOLA, M., BISTOLFI, A., FUCALÉ, G., CROVA, M., MASSE, A., VERNE, E.: In vitro comparison between commercially and manually mixed antibiotic-loaded bone cements. *J. Appl. Biomater. Biomech.*, 8: 166–174, 2010.
11. GALLO, J., KOLAR, M., DENDIS, M., LOVECKOVA, Y., SAUER, P., ZAPLETALOVA, J., KOUKALOVA, D.: Culture and PCR analysis of joint fluid in the diagnosis of prosthetic joint infection. *New Microbiol.*, 31: 97–104, 2008.
12. GALLO, J., KOLAR, M., FLORSCHUTZ, A. V., NOVOTNY, R., PANTUCEK, R., KESSELOVA, M.: In vitro testing of gentamicin-vancomycin loaded bone cement to prevent prosthetic joint infection. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 149: 153–158, 2005.
13. GALLO, J., KOLAR, M., NOVOTNY, R., RIHAKOVA, P., TICHÁ, V.: Pathogenesis of prosthesis-related infection. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 147: 27–35, 2003.
14. GALLO, J., LANDOR, I., VAVŘÍK, P.: Současné možnosti prevence infekcí kloubních náhrad. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.*, 73: 229–236, 2006.
15. HSIEH, P. H., CHANG, Y. H., CHEN, S. H., UENG, S. W., SHIH, C. H.: High concentration and bioactivity of vancomycin and aztreonam eluted from Simplex cement spacers in two-stage revision of infected hip implants: a study of 46 patients at an average follow-up of 107 days. *J. Orthop. Res.*, 24: 1615–1621, 2006.
16. HUSICKOVA, V., CHROMA, M., KOLAR, M., HRICOVA, K., STOSOVA, T., KANTOR, L., DUBRAVA, L.: Analysis of ESBL- and AmpC-positive Enterobacteriaceae at the Department of Neonatology, University Hospital Olomouc. *Curr. Microbiol.*, 62: 1664–1670, 2011.
17. CHANG, Y., CHEN, W. C., HSIEH, P. H., CHEN, D. W., LEE, M. S., SHIH, H. N., UENG, S. W.: 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.*, 55: 5480–5484, 2011.
18. JAEHLON, T.: Polymethylmethacrylate: properties and contemporary uses in orthopaedics. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 18: 297–305, 2010.
19. JIRANEK, W. A., HANSSEN, A. D., GREENWALD, A. S.: Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *J. Bone Jt Surg.*, 88-A: 2487–2500, 2006.
20. KLOUCHE, S., SARIALI, E., MAMOUDY, P.: Total hip arthroplasty revision due to infection: a cost analysis approach. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.*, 96: 124–132, 2010.
21. KURTZ, S. M., LAU, E., SCHMIER, J., ONG, K. L., ZHAO, K., PARVIZI, J.: Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States. *J. Arthroplasty*, 23: 984–991, 2008.
22. MEYER, J., PILLER, G., SPIEGEL, C. A., HETZEL, S., SQUIRE, M.: Vacuum-mixing significantly changes antibiotic elution characteristics of commercially available antibiotic-impregnated bone cements. *J. Bone Jt Surg.*, 93-A: 2049–2056, 2011.
23. NEUT, D., VAN DE BELT, H., VAN HORN, J. R., VAN DER MEI, H. C., BUSSCHER, H. J.: The effect of mixing on gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements. *Acta Orthop. Scand.*, 74: 670–676, 2003.
24. PEEL, T. N., CHENG, A. C., BUISING, K. L., CHOONG, P. F.: Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56: 2386–2391, 2012.
25. ROSENTHAL, M. E., DEVER, L. L., MOUCHA, C. S., CHAVDA, K. D., OTTO, M., KREISWIRTH, B. N.: Molecular characterization of an early invasive *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection. *Microb. Drug Resist.*, 17: 345–350, 2011.
26. SADER, H. S., BECKER, H. K., MOET, G. J., JONES, R. N.: Antimicrobial activity of daptomycin tested against *Staphylococcus aureus* with vancomycin MIC of 2 microg/mL isolated in the United States and European hospitals (2006–2008). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 66: 329–331, 2010.
27. SEELEY, S. K., SEELEY, J. V., TELEHOWSKI, P., MARTIN, S., TAVAKOLI, M., COLTON, S. L., LARSON, B., FORRESTER, P., ATKINSON, P. J.: Volume and surface area study of tobramycin-polymethylmethacrylate beads. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 420: 298–303, 2004.
28. SHUMAN, E. K., URQUHART, A., MALANI, P. N.: Management and prevention of prosthetic joint infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 26: 29–39, 2012.
29. URABE, K., NARUSE, K., HATTORI, H., HIRANO, M., UCHIDA, K., ONUMA, K., PARK, H. J., ITOMAN, M.: In vitro comparison of elution characteristics of vancomycin from calcium phosphate cement and polymethylmethacrylate. *J. Orthop. Sci.*, 14: 784–793, 2009.
30. VANHEGAN, I. S., MALIK, A. K., JAYAKUMAR, P., UL ISLAM, S., HADDAD, F. S.: A financial analysis of revision hip arthroplasty: The economic burden in relation to the national tariff. *J. Bone Jt Surg.*, 94-B: 619–623, 2012.

Korespondující autor:

Doc. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.
Ortopedická klinika LF UP a FN
Olomouc
I. P. Pavlova 6
779 00 Olomouc
E-mail: jiri.gallo@volny.cz