



# İnsan süngerimsi kemiğinden gentamisin ve teikoplanin salınımının *in vitro* değerlendirilmesi

## *In vitro* evaluation of gentamicin and teicoplanin release from cancellous human bone

Cemal KAZIMOĞLU, Hasan KARAPINAR, Muhittin ŞENER, İlhan AFŞAR,<sup>1</sup>  
Aslı Gamze KARATAŞ ŞENER,<sup>1</sup> Ulaş AKGÜN

İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 1. Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, <sup>1</sup>Mikrobiyoloji Kliniği

**Amaç:** Bu çalışmada teikoplanin veya gentamisin emdirilen insan süngerimsi kemiğinin lokal antibiyotik taşıyıcısı olarak *in vitro* antibakteriyel etkinliği araştırıldı.

**Çalışma planı:** Çalışmada parsiyel veya total kalça protezi uygulanan yedi hastanın eksize edilen femur başlarındaki süngerimsi kemikten elde edilen örnekler kullanıldı. Kemik örnekleri iki gruba ayrılarak bir grup gentamisin, diğer grup ise teikoplanin içinde bir saat bekletildi. Kontrol amaçlı olarak, steril salin solüsyonu içinde bekletilmiş kemik örnekleri kullanıldı. Kemik örneklerinin antibiyotik salgılama özellikleri disk difüzyon yöntemiyle, her bir günde yedişer örnekte olmak üzere, 1, 3, 7, 10, 14, 18 ve 21. günlerde *in vitro* olarak değerlendirildi. Gentamisin için *E. coli* ATCC 25922, teikoplanin için *S. aureus* ATCC 25923 suşları kullanıldı ve sırasıyla  $\geq 15$  mm ve  $\geq 14$  mm zon çapları *in vitro* etkinlik olarak kabul edildi.

**Sonuçlar:** Test edilen günlerde ölçülen agar disk çapları incelendiğinde, teikoplanin + kemik (12-18 gün) yapısının gentamisin + kemik yapısına (7-10 gün) oranla daha uzun süreli salınım oluşturduğu izlendi. Kontrol grubunda inhibisyon oluşmadı. Teikoplanin ve gentamisin arasında agar disk çapları ortalamaları açısından birinci ve üçüncü günlerde anlamlı farklılık bulunmazken, yedinci ( $p=0.008$ ) ve 10. günlerde ( $p=0.003$ ) teikoplanin örneklerinin inhibisyon alanı anlamlı derecede fazla bulundu.

**Çıkarımlar:** Bulgularımız, insan süngerimsi kemiğinin uygun koşullarda teikoplanin ile önemli miktarda birleşme oluşturduğunu ve yaklaşık iki hafta boyunca etkin düzeyde antibiyotik salınımı sağladığını göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** Antibakteriyel ajan; kemik transplantasyonu; ilaç taşıyıcısı; gentamisin/terapötik kullanım; stafilokok enfeksiyonu/önleme ve kontrol; teikoplanin/terapötik kullanım.

**Objectives:** This study was designed to determine the *in vitro* antibacterial activity of gentamicin- or teicoplanin-impregnated human cancellous bone as a local antibiotic carrier.

**Methods:** The study samples were obtained from human cancellous bone within the femur head in seven patients who underwent partial or total hip arthroplasty. Bone specimens were processed and incubated with gentamicin or teicoplanin for an hour. Control bone specimens were soaked in sterile saline solution for the same duration. Antibiotic release of bone specimens was assessed by the disc diffusion technique after 1, 3, 7, 10, 14, 18, and 21 days of antibiotic impregnation, with seven samples in each group. The test strains were *E. coli* ATCC 25922 for gentamicin, and *S. aureus* ATCC 25923 for teicoplanin. *In vitro* antibiotic efficacy was defined as an inhibition zone diameter of  $\geq 15$  mm for gentamicin, and  $\geq 14$  mm for teicoplanin.

**Results:** Evaluation of inhibition zone diameters showed that bone + teicoplanin complexes had a longer duration of antibiotic release than that of bone + gentamicin complexes (12 to 18 days vs 7 to 10 days). There was no inhibition in the control group. There were no significant differences in inhibition zone diameters of teicoplanin- and gentamicin-treated specimens on the first and third days; however, teicoplanin exhibited significantly greater zone diameters on the seventh ( $p=0.008$ ) and tenth ( $p=0.003$ ) days.

**Conclusion:** Our data show that, under appropriate conditions, human cancellous bone incorporates a considerable amount of teicoplanin and exhibits effective antibiotic release for approximately two weeks.

**Key words:** Anti-bacterial agents; bone transplantation; drug carriers; gentamicins/therapeutic use; staphylococcal infections/prevention & control; teicoplanin/therapeutic use.

Kemik enfeksiyonlarının ve enfeksiyon sırasında oluşan kemik defektlerinin tedavisi oldukça zordur. Enfekte ortamdaki kemik dokusuna antibiyotik penetrasyonunun zayıf olması nedeniyle, sistemik antibiyotik tedavisi bakterinin yok edilmesi için tek başına yeterli değildir. Ayrıca, uzun süreli yüksek doz antibiyotik tedavisi uygulanması, oluşabilecek yan etkileri nedeniyle sakıncalıdır.<sup>[1-4]</sup> Açık kırıkla birlikte görülen veya cerrahi tedavi sonrası ortaya çıkan derin enfeksiyon tablosu hastanede kalış süresini, tedavi maliyetini ve mortaliteyi ciddi şekilde artırmaktadır. Bunun yanı sıra metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'nin EBSL (extended-spectrum beta-lactamase) oluşturan suşları gibi dirençli organizmaların neden olduğu enfeksiyonların giderek yaygınlaşması da başarısız tedavi oranını artırmaktadır.<sup>[2-5]</sup>

Antibiyotik emdirilmiş çimento zincirlerinin kullanımıyla enfeksiyon alanında yüksek konsantrasyonda uzun süreli antibiyotik salınımı elde edilebilmektedir. Kronik osteomyelit ve ameliyat sonrası derin enfeksiyon kontrolünde yaygın olarak kullanılan bu yöntemin en büyük dezavantajı, çimento zincirlerinin ikinci bir ameliyatla çıkartılması zorunluluğudur.<sup>[6-8]</sup> Son yıllarda çeşitli polimerler lokal antibiyotik taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır. Birçok polimerle istenen süre ve etkinlikte lokal antibiyotik salınımı oluşturulabilmektedir. Ne yazık ki, bu polimerlerin cerrahi alana uygulanma zorlukları, yabancı cisim reaksiyonu oluşturma ve kemik defektlerinin tedavisinde yetersiz kalma gibi dezavantajları vardır.<sup>[9,10]</sup> İnsan kemiğinin hem yapısal olarak cerrahi alana uygulanma kolaylığı, hem de osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklerinin bilinen tüm materyallerden üstün olması nedeniyle lokal antibiyotik taşıyıcısı olarak kullanılabilmesi birçok sorunu ortadan kaldıracaktır. İnsan kemiğinin antibiyotik taşıyıcısı olarak kullanılması, üzerinde çok fazla çalışılmış bir konu değildir.<sup>[6,8,11]</sup> Yapılan sınırlı sayıda çalışmada, gerek kortikal, gerekse süngerimsi kemiğin antibiyotik emdirildikten sonra uygun süre ve yeterlilikte antibiyotik salgıladığı ileri sürülmüştür.<sup>[5-8]</sup> Bu çalışmalar, insan kemiğinin kronik osteomyelit ve diğer derin enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik taşıyıcısı olarak kullanılabileceği görüşünü desteklemektedir.<sup>[7,11,12]</sup> İnsan kemiğiyle yapılan çalışmaların birçoğu tobramisin ve gentamisin gibi gram-negatif bakteriler üzerine etkili antibiyotiklerle yapılmıştır.<sup>[5,6,13]</sup> Bu antibiyotiklerin gram-pozitif organizmalar üzerine etkinlikleri çok düşüktür. Bildiğimiz kadarıyla, metisiline dirençli *S. aureus* gibi dirençli organiz-

maların tedavisinde etkili bir antibiyotik olan teikoplaninin insan süngerimsi kemiğinde emilebilmesini araştıran bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmanın varsayımı, insan süngerimsi kemiğinin uygun şekilde hazırlanmasının ve uygun sürede antibiyotik solüsyonu içinde bekletilmesinin ardından etkin ve yeterli sürede antibiyotik salgılayacak antibiyotik + kemik kompleksinin oluşacağı yönündedir. Bu çalışmada, *in vitro* olarak bir saat boyunca teikoplanin ve gentamisin emdirilen insan süngerimsi kemiğinden kaç gün boyunca etkin şekilde antibiyotik salındığının araştırılması amaçlandı.

### Gereç ve yöntem

Çalışmada kullanılan kemik örnekleri, kliniğimizde 2007 yılı içinde total veya parsiyel kalça artroplastisi uygulanan beşi kadın, ikisi erkek yedi hastadan elde edildi. Hastaların eksize edilen femur başlarından alınan kemik örnekleri kemik öğütme cihazı ile (Aesculap Bone Mill, Coarse, Harris, GB44, Almanya) steril şartlar altında öğütülerek parçacık haline getirildi. Antibiyotik solüsyonunun süngerimsi kemikteki kanallıklara nüfuz etmesini artırmak amacıyla, öğütme işleminden önce kemik dokusu yağ, kemik iliği ve yumuşak dokudan arındırıldı. Öğütülen kemikler serum fizyolojik ile iyice temizlendikten sonra kurutuldu. Daha sonra, her hastadan alınan kemik örnekleri ikiye ayrılarak, bir grup gentamisin (Gentreks, 80 mg ampul Bilim İlaç), diğer grup ise teikoplanin (Targocid, 400 mg steril toz, Aventis) antibiyotiği içinde bekletildi. Yirmi gram öğütülmüş kemik 20 ml antibiyotik solüsyonu içinde (antibiyotik solüsyonları 40 mg/ml olacak şekilde hazırlandı) yaklaşık bir saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Ardından antibiyotik solüsyonu süzülerek geride kalan kemik dokuları silindirik tel ağına içerisinde sıkıştırıldı (wire mesh). Silindirlerdeki kemik miktarı yaklaşık 1 gr olacak şekilde hassas terazide ölçülerek ayarlandı.

Antibiyotik emdirilmiş kemik parçacıkları 5 ml %0.9 NaCl ile 15 saniye boyunca vorteklendi. Daha sonra 5 ml yeni yıkama solüsyonuyla tekrar yıkandı. Antibiyotik emdirilmiş kemikler 5 ml fosfatlı tamponlu sıvı içeren (phosphate-buffered saline) steril bir elüsyon tüpünün içine yerleştirildi (15 x 100 mm steril cam tüp). Ardından 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Kontrol amaçlı olarak, steril salin solüsyonu içerisinde bekletilmiş olan öğütülmüş kemik kullanıldı. Kemiklerden salınan antibiyotik etkinliği *in*

*vitro* olarak modifiye agar disk difüzyon yöntemiyle saptandı. Standart suş olarak gentamisin için *E. coli* ATCC 25922, teikoplanin için *S. aureus* ATCC 25923 kullanıldı. Mülller-Hington agar plak üzerine  $2 \times 10^5$  CFU/ml olacak yoğunlukta standart bakteri suşlarının ekimi yapıldı. *E. coli* ATCC 25922 ekimi yapılan plakta gentamisin/10 µg (Oxoid, İngiltere) ve *S. aureus* ATCC 25923 ekimi yapılan plakta teikoplanin/30 µg (Oxoid, İngiltere) diski kullanıldı. Fosfat tamponlu sıvıdan 10 µg test kağıdına emdirildi. Her iki test plağı 37 °C'de bir gece inkübasyona kondu. Standart suşlar üzerinde konan standart disk ve test diskinin zon çapları ölçüldü (Şekil 1). Gentamisin için  $\geq 15$  mm, teikoplanin için  $\geq 14$  mm zon çapları *in vitro* etkinlik olarak değerlendirildi.<sup>[14]</sup> Kemiklerden salınan antibiyotik konsantrasyonunun *in vitro* etkinliği, her bir günde yedişer örnekte olmak üzere, 1, 3, 7, 10, 14, 18 ve 21. günlerde yukarıdaki yıkama işlemleri yapılarak ve 37 °C'de inkübe edilerek belirlendi.

İstatistiksel değerlendirmede gruplar arasındaki farkı incelemek için Mann-Whitney U-testi kullanıldı. Çalışmada %95 güven aralığında  $p < 0.05$  değerleri anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analizde, SPSS 11.5 paket programı kullanıldı.

## Sonuçlar

Test edilen günlerde ölçülen agar disk çapları incelendiğinde (Tablo 1), gentamisin + kemik kompleksleri başlangıçta yeterli inhibisyon oluştururken, birinci haftanın sonunda bu etkinliklerini kaybettikleri görüldü. Teikoplanin + kemik yapısı ise disk inhibisyonu oluşturmada daha kararlı bir seyir izledi. Teikoplanin + kemik kompleksleri ortalama 14 gün (dağılım 12-18 gün) bo-



Şekil 1. Teikoplanin emdirilmiş diskin ve test diskinin 14. günde oluşturduğu inhibisyon zonu çapları.

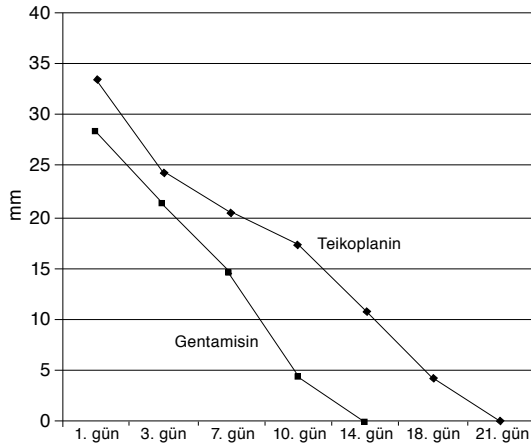
yunca etkin şekilde inhibisyon oluşturdu (Şekil 1). Çalışma, 21. günde yapılan testte tüm örneklerin etkinliklerini kaybettiklerinin görülmesi üzerine sonlandırıldı. Kontrol grubunda inhibisyon oluşmadı. Test günleri ve bu günlerde ölçülen ortalama inhibisyon zon çapları Şekil 2'de gösterildi. Gruplar arasında yapılan değerlendirmede, test edilen günlerdeki teikoplanin ve gentamisin agar disk çapları ortalamaları arasında birinci ve üçüncü günlerde anlamlı farklılık bulunmazken, yedinci gün ( $p=0.008$ ) ve 10. günlerde ( $p=0.003$ ) anlamlı fark bulundu (Tablo 1).

## Tartışma

Çalışmamızda, insan süngerimsi kemiğinin teikoplanini emerek uzun süreli salınım oluşturan kemik antibiyotik kompleksi oluşturduğunu gözledik. Gentamisinle bu yapının istenilen düzeyde oluşma-

Tablo 1. Test edilen günlerdeki teikoplanin (T) ve gentamisin (G) agar disk çapları (mm)

Örnekler	1. gün		3. gün		7. gün		10. gün		14. gün		18. gün		21. gün	
	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G
Örnek 1	28	22	17	16	16	8	15	D	14	D	D	D	D	D
Örnek 2	30	28	24	22	20	16	18	15	16	D	15	D	D	D
Örnek 3	36	34	30	23	22	15	18	D	16	D	D	D	D	D
Örnek 4	40	30	28	25	25	15	17	D	14	D	D	D	D	D
Örnek 5	40	32	31	24	24	17	21	15	16	D	14	D	D	D
Örnek 6	26	22	18	17	16	16	15	D	D	D	D	D	D	D
Örnek 7	34	30	23	21	20	15	17	D	16	D	D	D	D	D
Ortalama	33.4	28.3	24.4	21.1	20.4	14.6	17.3	4.3	13.1	0.0	4.1	0.0	0.0	0.0
SS	5.6	4.7	5.6	3.4	3.6	3.0	2.1	7.3	5.9	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0
p	0.138		0.2		0.008		0.003							



Şekil 2. Test günlerinde ölçülen inhibisyon zon çap ortalamalarının dağılımı.

dığı görüldü. Lokal antibiyotik taşıyıcı sisteminden antibiyotik salınımını etkileyen birden fazla neden vardır. Bunları, kullanılan antibiyotiğin tipi ve miktarı, taşıyıcının yüzey alanı ve yapısal özellikleri olarak sıralamak mümkündür.<sup>[15,16]</sup> Çalışmamızda taşıyıcının şekli, yüzey alanı, yüzey yapısı ve kullanılan antibiyotik miktarı aynı olduğundan, ilaç salınımının kullanılan antibiyotik yapısı ve çözünürlüğü ile ilgili olduğunu düşünüyoruz.

Antibiyotiklerin lokal olarak uygulanması yoluyla enfeksiyon sahasında yüksek antibiyotik konsantrasyonu elde edilirken, hastalar sistemik etkilerden korunmaktadırlar.<sup>[15]</sup> Bu nedenle, birçok materyal lokal antibiyotik taşıyıcısı olarak kullanılmıştır. Bunlar arasında en sık kullanılanı, kemik çimentosu olarak da bilinen polimetil-metakrilattır (PMMA).<sup>[17]</sup> Insall ve ark.nın<sup>[18]</sup> enfekte diz protezlerinin iki aşamalı tedavisinde uygulamaya başlamasıyla, antibiyotikli çimento kullanılması ortopedik cerrahide enfeksiyon kontrolü amacıyla yaygın kullanım alanı bulmuştur. Antibiyotik emdirilmiş kemik çimento zincirlerinin derin enfeksiyon tedavisinde oldukça başarılı olduğunu bildiren *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar vardır.<sup>[17-20]</sup> Öte yandan, antibiyotik emdirilmiş çimento zincirleri ve benzeri antibiyotik taşıyıcılarının belirli dezavantajları da bulunmaktadır. Enfeksiyon yok edildikten sonra, çoğu zaman ortaya doldurulması gereken kemik defektleri çıkmaktadır. Ayrıca, başlangıçta antibiyotik salgılayan çimento zincirleri, bu salınım durduğunda, bakteri kolonizasyonuna uygun birer yabancı cisim görevi görmektedir. Bu durum da, ikinci bir ameliyatla çimento zincirlerinin çıkartılması ve oluşan kemik defektlerin otogreft veya allogreft ile doldurulması gereğini ortaya çıkarmaktadır. Bu de-

zavantajların ortadan kaldırılması amacıyla, çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda hidroksiapatit,<sup>[21-24]</sup> kalsiyum sülfat parçacıkları,<sup>[16,25]</sup> kitozan,<sup>[26]</sup> fibrin yapıştırıcı,<sup>[27]</sup> polimerler,<sup>[6,28]</sup> kollojen süngerler<sup>[29]</sup> ve ksenogreftler<sup>[30]</sup> gibi birçok biyoçözünür materyal lokal ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmıştır. İlgili çalışmalarda bu materyallerin başarı düzeylerinin çelişkili olduğu izlenmektedir. Ayrıca, çoğu mekanik yüklenme özelliğinden yoksun olan bu materyallerin bir kısmında *in vitro* ortamda başarılı sonuçlar alınmasına karşın, *in vivo* ortamda yapısal olarak cerrahi alana uygulama zorluğu bulunmaktadır. Zelken ve ark.nın<sup>[22]</sup> deneysel çalışmasında, *in vitro* şartlarda yeterli antibiyotik bağlanmasına rağmen hidroksiapatit pastasının *in vivo* şartlarda başarısız sonuçlara neden olduğu bildirilmiş ve bu durumun pastanın enfeksiyon alanına uygulama zorluğuna bağlı olduğu belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, bu materyallerin bir kısmı sadece osteokondüktif (kalsiyum sülfat), bir kısmı ise sadece osteoindüktif (hidroksiapatit) özellikler taşımaktadır. Allogreftlerin sterilizasyonu sırasında antijenik özellikleri zayıflamaktadır. Bu durum immün reaksiyon oluşturma riski açısından bir avantaj gibi görünse de, bu işlem sırasında greftin osteokondüktif özelliği de azaldığından otogreftte göre bir dezavantaja dönüşmektedir.<sup>[17]</sup> Ayrıca, osteokondüktif özellikli kemik restorasyon materyallerinin bir kısmının *in vivo* uygulama sonrasında yabancı cisim reaksiyonuna neden olduğu bildirilmiştir (kalsiyum sülfat dihidrat).<sup>[25]</sup>

Winkler ve ark.<sup>[5]</sup> uygun şekilde hazırlanan insan ve sığır kemik greftlerinin lokal antibiyotik taşıyıcısı olarak kullanılabilceğini göstermişlerdir.

Çalışmamız, uygun koşullarda insan süngerimsi kemiğinin önemli miktarda teikoplanin ile birleşme oluşturduğunu göstermektedir. Oluşan antibiyotik kemik kompleksi çevre ortama, başlangıçta en yüksek düzeyde olan ve zamanla salınım miktarı azalsa da iki hafta boyunca etkin düzeyde antibiyotik salınımına neden olmaktadır. Bu durum kemik enfeksiyonlarının tedavisinde aranan şartları sağlamaktadır.<sup>[21]</sup> Derin enfeksiyon tedavisinde, kontamine olan dokulardaki bakterilerin yok edilmesi için başlangıçta lokal antibiyotik konsantrasyonu yüksek olmalıdır. Daha sonra ise, kontaminasyonun tekrar oluşmasının engellenmesi ve antibiyotiğin ameliyat sahasından daha uzak alanlara gitmesinin sağlanması için daha düşük, ama sürekli salınım önemlidir.<sup>[1-4]</sup> Ameliyat sırasında elde edilen kortikospongiöz otogreftler, kemik defektlerini doldurabilen, mekanik yüklenme

özelliğine sahip ve kırık iyileşmesini hızlandıran en değerli kemik restorasyon materyalidir. Otojen kemik greftlerinin osteogenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri, bilinen diğer greft materyallerinin hiçbirinde yoktur. Kemik grefti olarak sıklıkla kullanılmakta olan kortikospongiöz allogreftlerin sadece osteokondüktif özellikleri bulunmaktadır. Antibiyotik emdirilirken otogreftlerin osteogenik özelliklerini kaybedebileceği düşünülse de, diğer özellikleriyle kemik iyileşmesini en uygun şekilde hızlandıracağı kesindir. Verici saha morbiditesi ve alınabilecek kemik miktarının sınırlı olmasına rağmen antibiyotik emiliminin gerçekleşmesi için bir saatlik sürenin yeterli olması, bu yöntemin cerrahi tedavi sırasında hastadan elde edilecek otogreftler ile yapılabilmesine izin vermektedir.

Çalışmamızın başlıca zayıf noktası, salınan ilaç konsantrasyonlarının tam olarak ölçülememesi ve modifiye disk yöntemi gibi yarıniceliksel (semiquantitative) bir yöntemin kullanılmış olmasıdır. Buna rağmen, Bayston ve Miller<sup>[15]</sup> disk difüzyon yönteminin uzun süreli ve düşük doz ilaç salınımını değerlendirebilen hassas bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmanın bir diğer zayıf noktası emilim süresi farkları ve antibiyotik konsantrasyon farkları gibi değişkenleri içermemesidir. Ne yazık ki, insan süngerimsi kemiğinden antibiyotik salınımı ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Dolayısıyla, *in vivo* şartlarda süngerimsi kemikten antibiyotik salınımıyla ilgili farmakokinetik bilgiler çok yetersizdir. pH tablosunda *in vivo* değişiklikler, ortaya çıkan immün yanıt ve kullanılan antibiyotik solüsyonunun ne-osteogenez üzerindeki etkilerin değerlendirilmesi açısından daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir.

## Kaynaklar

- Swiontkowski MF, Hanel DP, Vedder NB, Schwappach JR. A comparison of short- and long-term intravenous antibiotic therapy in the postoperative management of adult osteomyelitis. *J Bone Joint Surg [Br]* 1999;81:1046-50.
- Hierholzer G, Rehn J, Knothe H, Masterson J. Antibiotic therapy of chronic post-traumatic osteomyelitis. *J Bone Joint Surg [Br]* 1974;56:721-9.
- Mader JT, Wang J, Calhoun JH. Antibiotic therapy for musculoskeletal infections. *J Bone Joint Surg [Am]* 2001; 83:1878-90.
- Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ. Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs* 2000;59:1223-32.
- Winkler H, Janata O, Berger C, Wein W, Georgopoulos A. In vitro release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:423-8.
- Witso E, Persen L, Loseth K, Bergh K. Adsorption and release of antibiotics from morselized cancellous bone. In vitro studies of 8 antibiotics. *Acta Orthop Scand* 1999; 70:298-304.
- Witso E, Persen L, Benum P, Bergh K. Cortical allograft as a vehicle for antibiotic delivery. *Acta Orthop* 2005;76: 481-6.
- Witso E, Persen L, Benum P, Bergh K. Release of netilmicin and vancomycin from cancellous bone. *Acta Orthop Scand* 2002;73:199-205.
- Hendricks KJ, Lane D, Burd TA, Lowry KJ, Day D, Phaup JG, et al. Elution characteristics of tobramycin from polycaprolactone in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res* 2001;(392):418-26.
- Athanasίου KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996;17:93-102.
- Witso E, Persen L, Loseth K, Benum P, Bergh K. Cancellous bone as an antibiotic carrier. *Acta Orthop Scand* 2000;71:80-4.
- Lindsey RW, Probe R, Miclau T, Alexander JW, Perren SM. The effects of antibiotic-impregnated autogeneic cancellous bone graft on bone healing. *Clin Orthop Relat Res* 1993;(291):303-12.
- Witso E, Persen L, Benum P, Aamodt A, Husby OS, Bergh K. High local concentrations without systemic adverse effects after impaction of netilmicin-impregnated bone. *Acta Orthop Scand* 2004;75:339-46.
- Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006. Available from: <http://www.clsi.org/source/orders/free/m2-a9f.pdf>.
- Bayston R, Milner RD. The sustained release of antimicrobial drugs from bone cement. An appraisal of laboratory investigations and their significance. *J Bone Joint Surg [Br]* 1982;64:460-4.
- Beardmore AA, Brooks DE, Wenke JC, Thomas DB. Effectiveness of local antibiotic delivery with an osteoinductive and osteoconductive bone-graft substitute. *J Bone Joint Surg [Am]* 2005;87:107-12.
- De Long WG Jr, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg [Am]* 2007;89:649-58.
- Insall JN, Thompson FM, Brause BD. Two-stage reimplantation for the salvage of infected total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg [Am]* 1983;65:1087-98.
- Picknell B, Mizen L, Sutherland R. Antibacterial activity

- of antibiotics in acrylic bone cement. J Bone Joint Surg [Br] 1977;59:302-7.
20. Evans RP, Nelson CL. Gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate beads compared with systemic antibiotic therapy in the treatment of chronic osteomyelitis. Clin Orthop Relat Res 1993;(295):37-42.
  21. Yamashita Y, Uchida A, Yamakawa T, Shinto Y, Araki N, Kato K. Treatment of chronic osteomyelitis using calcium hydroxyapatite ceramic implants impregnated with antibiotic. Int Orthop 1998;22:247-51.
  22. Zelken J, Wanich T, Gardner M, Griffith M, Bostrom M. PMMA is superior to hydroxyapatite for colony reduction in induced osteomyelitis. Clin Orthop Relat Res 2007;(462):190-4.
  23. Buranapanitkit B, Srinilta V, Ingvinga N, Oungbho K, Geater A, Ovatlarnporn C. The efficacy of a hydroxyapatite composite as a biodegradable antibiotic delivery system. Clin Orthop Relat Res 2004;(424):244-52.
  24. Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, Araki N, Ono K. Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. J Bone Joint Surg [Br] 1992;74:600-4.
  25. Göğüş A, Şener N, Akman Ş, Bilgiç B. Kemik defeklerinin iyileştirilmesinde kalsiyum sülfat ve kalsiyum hidroksiapatitin karşılaştırılması. Hacettepe Ortopedi Dergisi 2001;11:49-54.
  26. Aimin C, Chunlin H, Juliang B, Tinyin Z, Zhichao D. Antibiotic loaded chitosan bar. An in vitro, in vivo study of a possible treatment for osteomyelitis. Clin Orthop Relat Res 1999;(366):239-47.
  27. Zilch H, Lambiris E. The sustained release of cefotaxim from a fibrin-cefotaxim compound in treatment of osteitis. Pharmacokinetic study and clinical results. Arch Orthop Trauma Surg 1986;106:36-41.
  28. Calhoun JH, Mader JT. Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. Clin Orthop Relat Res 1997;(341):206-14.
  29. Becker PL, Smith RA, Williams RS, Dutkowsky JP. Comparison of antibiotic release from polymethylmethacrylate beads and sponge collagen. J Orthop Res 1994; 12:737-41.
  30. Günel I, Seber S, Kiraz N, Türkay S, Oztuna V, Göktürk E. In vitro evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic impregnated xenografts. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot 1996;82:59-62. [Abstract]