



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TESE DE DOUTORADO

**DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VANCOMICINA E
GENTAMICINA ADICIONADAS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE PMMA PARA INIBIR A FORMAÇÃO
DO BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Nome: Marco Antonio Pedroni

Orientador: Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

CURITIBA

2020

MARCO ANTONIO PEDRONI

**DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VANCOMICINA E
GENTAMICINA ADICIONADAS EM MODELO
EXPERIMENTAL DE PMMA PARA INIBIR A FORMAÇÃO
DO BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Tese a ser apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Escola de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

CURITIBA

2020



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos **30 dias do mês de junho de 2020 às 13:30**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese **“DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VANCOMICINA E GENTAMICINA ADICIONADAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE PMMA PARA INIBIR A FORMAÇÃO DO BIOFILME DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS”** apresentado por **Marco Antonio Pedroni** para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon - Presidente	
Prof. Dr. Jamil Faissal Soni (PUCPR)	
Prof. Dr. Luiz Roberto Gomes Vialle (PUCPR)	
Prof. Dr. Edmar Stieven Filho (UFPR)	
Prof. Dr. Carlos Roberto Galia (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon	Conceito: APROVADO
Prof. Dr. Jamil Faissal Soni	Conceito: APROVADO
Prof. Dr. Luiz Roberto Gomes Vialle	Conceito: APROVADO
Prof. Dr. Edmar Stieven Filho	Conceito: APROVADO
Prof. Dr. Carlos Roberto Galia	Conceito: APROVADO

Parecer Final: **APROVADO**

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

Nota Bibliográfica

MARCO ANTONIO PEDRONI, graduado em Medicina na PUCPR em 1992. cursou Residência Médica em Ortopedia e Traumatologia no Hospital Universitário Cajuru- HUC (1993-1995). Possui o título de Especialista em Medicina Esportiva pela Escola Paulista de Medicina (1996). Estágio de aperfeiçoamento em Cirurgia do Quadril na Santa Casa de São Paulo (1996). Especialização em Medicina Esportiva pela Escola Paulista de Medicina (1996). Professor Assistente do Curso de Fisioterapia da Universidade Positivo (2000-2010). Mestre em Cirurgia pela PUCPR (2005), médico do Clube Atlético Paranaense (2005-2006). Presidente da Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia Regional do Paraná (2012). Presidente da Sociedade Brasileira de Quadril Regional Paraná (2010-2011). Chefe do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do HUC (2013-2015). Diretor Técnico do Hospital Marcelino Champagnat (2014-2017). Diretor Secretário da Sociedade Brasileira de Quadril (2016-2017). MBA em Gestão na Área da Saúde na Faculdade São Leopoldo (2018). Diretor Científico da Sociedade Brasileira do Quadril (2018-2019). Atualmente é Professor Adjunto da Escola de Medicina da PUCPR desde 2009.

Dedicatória

Ao Meu Pai Leonardo Pedroni (*in memoriam*), por muitos ensinamentos companheirismo, amizade, carinho e acima de tudo exemplo de vida, pessoa e família.

À minha Mãe Maria Aparecida Zago Pedroni, Dona Cida, pela dedicação sem limites a família e seus filhos.

À minha esposa Valeria parceira de muitos anos, no amor, família, e dos poucos momentos de tristezas, mas principalmente nos muitos e maravilhosos momentos de alegrias.

Às minhas filhas Mariana e Gabriela, razão de todo meu empenho, dedicação, profissionalismo e, sobretudo, por permitir eu ter o privilégio de ser Pai e sentir o verdadeiro amor de ter uma família.

Agradecimentos

Aos meus professores, aqueles que desde a formação básica até as pós-graduações, e que foram e são exemplos de vida e profissionalismo.

Aos colegas de profissão, médicos e professores, pelo apoio na minha jornada profissional e pessoal até esta data.

Ao Grupo Marista, desde minha formação básica no Colégio Marista de Maringá, passando pelo curso de Medicina na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), residência Médica no Hospital Universitário Cajuru da PUCPR, Mestrado em Cirurgia pela PUCPR, e agora o Doutorado, na mesma instituição.

Ao meu orientador Prof. Dr. Felipe Francisco Tuon, pela paciência e competência em ter me orientado neste trabalho.

Às profissionais da área da Saúde, Juliete de Moraes Cieslinski, Victoria Stadler Tasca Ribeiro, Letícia Kraft, Paula Hansen Suss, Ana Paula de Andrade, pelo apoio e auxílio nos testes do LEID da PUCPR.

A Deus, pela Vida.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Tereza de Calcutá)

Lista de Abreviaturas/ Símbolos e Siglas

BaSO₄ - Sulfato de Bário

°C - Graus Celsius

DNA - ácido desoxirribonucleico

EPS - Exopolissacarídeos

FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Gent-R - Cepas resistentes à gentamicina

GPa - Gigapascal

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

Hz - Hertz

K₂PO₄- fosfato dipotássico

KH₂PO₄- fosfato dihidróxidopotássico

KPa - Quilopascal

L-CysteineHCl – hidroxicloreto de L-cisteína monohidratado

LEID - Laboratório de Doenças Infecciosas Emergentes

LS - Líquido Sinovial

Met-R - Cepas resistentes à metilina

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

mg/L - miligrama por litro

Mg₂SO₄- sulfato de magnésio

MMA - metacrilato de metilo

MPa - Megapascal

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

µg/mL - micrograma por mililitro

Na₂EDTA – ácido etilendiamino tetra-acético de sódio

NaCl – cloreto de sódio

(NH₄)₂SO₄- sulfato de amônio

PCR - Proteína C Reativa

PMMA - Polimetilmetacrilato

ppm - parte por milhão

PUCPR - Pontifícia Universidade Católica do Paraná

rpm - rotações por minuto

RTF – Reduced Transport Fluid

TPP - Tecido periprotético

UFC - Unidades formadoras de colônias

UHMWPE - (*Ultra high molecular weightpolyethylene*) Polietileno de Ultra Alto Peso Molecular

VHS - Velocidade de Hemossedimentação

VRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina

ZrO₂ – dióxido de zircônio

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação da infecção articular periprotética de Tsukayama <i>et al.</i> (214,215).....	27
--	----

Lista de Quadros

Quadro 1. Comparação entre os achados quantitativos das células planctônicas e sésseis e qualitativo da MEV e viabilidade.....	88
---	----

Lista de Figuras

- Figura 1.** Imagem de micrografia eletrônica de baixa temperatura de um biofilme formado de bactérias *E. coli* ampliada 10.000 vezes.....21
- Figura 2.** O ciclo de vida do biofilme: (1) adesão reversível das células à superfície do implante, (2) secreção de adesinas e EPS resultando na adesão irreversível do biofilme e proliferação celular, (3) formação de microcolônias e maturado do biofilme, e (4) morte celular nas microcolônias e desprendimento das células que retornam para a fase planctônica, completando o ciclo de vida do biofilme.....22
- Figura 3.** Superfícies de implantes hidrofóbicas e hidrofílicas. Ângulo de contato entre o líquido e o implante.....24
- Figura 4.** Paciente submetido à artroplastia bilateral do quadril, evoluiu com infecção periprotética no quadril esquerdo. Realizada cirurgia em 2 tempos com a retirada da prótese e colocação do espaçador moldado pelo cirurgião no acetábulo e no fêmur.....48
- Figura 5.** Esquema didático do teste de Checkerboard.....53

Resumo

Introdução: O cimento ósseo a base de polimetilmetacrilato (PMMA), quando adicionado com antibiótico, é muito utilizado no tratamento associado das osteomielites com perdas ósseas e como espaçador articular nas infecções periprotéticas. Considerada uma complicação grave nas cirurgias de artroplastia, principalmente as do quadril, a infecção periprotética tem seu diagnóstico e tratamento difícil e complexo. Associa-se o fato que os microrganismos encontrados, geralmente o *Staphylococcus aureus*, podem induzir à formação do biofilme e gerar resistências, o que impede ou dificulta o diagnóstico e a ação sistêmica dos antibióticos. Uma das opções de tratamento dessas infecções periprotéticas é a cirurgia de revisão da prótese em dois tempos. Nessa técnica de tratamento, após a retirada dos implantes infectados é confeccionado um espaçador de PMMA adicionado com antibiótico, que é implantado no local em que estava a prótese, para auxílio no tratamento local da infecção. Entretanto dosagens, quantidades e tipos de antibióticos adicionados nestes espaçadores são bastante controversos.

Objetivo: O objetivo do presente estudo é avaliar a influência de diferentes concentrações de vancomicina e gentamicina adicionadas em modelos experimentais de cimento ósseo à base de PMMA para inibição da formação do biofilme de *Staphylococcus aureus*, *in vitro*.

Método: Modelos experimentais de cimento ósseo (PMMA) na forma cúbica (10x10mm), com a adição de vancomicina e gentamicina em pó, foram confeccionadas em moldes de silicone. Foram determinados oito grupos de estudo nas diferentes concentrações de antibióticos: **C-** grupo controle: sem antibiótico; **G-** 500mg de gentamicina; **V1-** 1g de vancomicina; **V2-** 2g de vancomicina; **V4-** 4g de vancomicina; **V1G-** 1g de vancomicina e 500mg de gentamicina; **V2G-** 2g de vancomicina e 500mg de gentamicina; **V4G-** 4g de vancomicina e 500mg de gentamicina. Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC®25923 foram utilizadas para formação do biofilme *in vitro*. Para a análise quantitativa do biofilme, foi realizada a contagem das células sésseis. O mesmo para as células planctônicas. A microscopia eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada para avaliação qualitativa do biofilme. A viabilidade do biofilme foi analisada por meio de um *kit* morto/vivo cuja leitura foi realizada por microscopia de fluorescência. A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para analisar a influência na estrutura química dos antibióticos e do PMMA associados. Para avaliar o sinergismo ou antagonismo da vancomicina e gentamicina foi utilizado o teste do *Checkerboard*.

Resultados: Detectou-se a ausência de bactérias planctônicas para todos os grupos, exceto para o grupo controle, V1 e V2. Somente os grupos contendo gentamicina isolada ou combinada com a vancomicina inibiram efetivamente o crescimento das bactérias sésseis. Na MEV foi observada a presença de biofilme nos grupos G, V1, V4 e V1G, porém desses o V1G não apresentou viabilidade celular. O grupo V2 também apresentou viabilidade celular, porém

na MEV não foi observada a presença de biofilme na amostra qualitativa analisada. O grupo V2G, na microscopia de fluorescência, apresentou células, porém mortas. O grupo V4G, não apresentou biofilme ou celularidade em nenhum dos testes realizados. Considerando as análises de FTIR, não foram observadas diferenças químicas nos polímeros adicionados com as diferentes concentrações assim como nas características dos antibióticos utilizados. Por fim, foi observado o efeito sinérgico entre a vancomicina e a gentamicina em diferentes concentrações, pelo teste de *Checkerboard*.

Conclusão: Associação dos antibióticos vancomicina 4g + gentamicina 500mg adicionadas nos modelos experimentais de PMMA do estudo, apresentaram efeitos sinérgicos e inibiram a formação do biofilme de *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: *infecção, infecção periprotética, polimetilmetacrilato, gentamicina, vancomicina, biofilme, Staphylococcus aureus.*

Abstract

Background: Bone cement based on polymethylmethacrylate (PMMA), when impregnated with antibiotics, is widely used in the associated treatment of osteomyelitis with bone loss and as a joint spacer in periprosthetic infections. Considered a serious complication in arthroplasty surgeries, especially those of the hip, periprosthetic infection has a difficult and complex diagnosis and treatment. It is associated with the fact that the microorganisms found, usually *Staphylococcus aureus*, can induce the formation of biofilm and generate resistance, which prevents or hinders the diagnosis and the systemic action of antibiotics. One of the treatment options for these periprosthetic infections is two-stage prosthesis revision surgery. In this treatment technique, after removing the infected implants, a PMMA spacer impregnated with antibiotics is made, which is implanted in the place where the prosthesis was, to aid in the local treatment of the infection. However, dosages, amounts and types of antibiotics added to these spacers are quite controversial.

Objective: The objective of the present study is to evaluate the influence of different concentrations of vancomycin and gentamicin added in experimental models of bone cement based on PMMA to inhibit the formation of *Staphylococcus aureus* biofilm, in vitro.

Method: Experimental models of bone cement (PMMA) in cubic form (10x10mm), with the addition of vancomycin and gentamicin powder, were made in silicone molds. Eight study groups were determined at different concentrations of antibiotics: **C-** control group: without antibiotics; **G-** 500mg of gentamicin; **V1-** 1g vancomycin; **V2-** 2 g of vancomycin; **V4-** 4 g of vancomycin; **V1G-** 1g vancomycin and 500mg gentamicin; **V2G-** 2g vancomycin and 500mg gentamicin; **V4G-** 4g of vancomycin and 500mg of gentamicin. Strains of *Staphylococcus aureus* ATCC@25923 were used to form the biofilm in vitro. For the quantitative analysis of the biofilm, the counts of sessile cells were performed. The same for planktonic cells. Scanning electron microscopy (SEM) was performed for qualitative evaluation of the biofilm. The viability of the biofilm was analyzed using a dead / alive kit whose reading was performed by fluorescence microscopy. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was performed to analyze the influence on the chemical structure of the associated antibiotics and

PMMA. The Checkerboard test was used to assess the synergism or antagonism of vancomycin and gentamicin.

Results: The absence of planktonic bacteria was detected for all groups, except for the control group, V1 and V2. Only groups containing gentamicin alone or combined with vancomycin effectively inhibited the growth of sessile bacteria. In SEM, the presence of biofilm in groups G, V1, V4 and V1G was observed, however, of these, V1G did not show cell viability. The V2 group also showed cell viability, however, in SEM, the presence of biofilm was not observed in the analyzed qualitative sample. The V2G group, under fluorescence microscopy, presented cells, however dead. The V4G group did not show biofilm or cellularity in any of the tests performed. Considering the FTIR analyzes, no chemical differences were observed in the polymers added with the different concentrations as well as in the characteristics of the antibiotics used. Finally, the synergistic effect between vancomycin and gentamicin in different concentrations was observed by the Checkerboard test.

Conclusion: Association of antibiotics vancomycin 4g + gentamicin 500 mg added to the experimental PMMA models of the study, showed synergistic effects, and inhibited the formation of *Staphylococcus aureus* biofilm.

Keywords: infection, periarticular infection, polymethylmethacrylate, gentamicin, vancomycin, biofilm, *Staphylococcus aureus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos Gerais.....	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Biofilme.....	21
3.2 Infecção periprotética.....	25
3.3 Cimentos ósseos (PMMA)	36
3.4 Cimentos ósseos (PMMA) com adição de antibióticos.....	38
3.5 Espaçadores de PMMA adicionados com antibióticos.....	47
3.6 Métodos laboratoriais.....	51
3.6.1 Exame de Cultura.....	51
3.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	52
3.6.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	52
3.6.4 Ensaio de <i>Checkerboard</i>	53
3.6.5 Ensaio da Viabilidade do Biofilme por Imunofluorescência (<i>live/dead biofilm viability kit</i>)	55
4. ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO	56
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
6. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	92
7. CONCLUSÃO	93
8. REFERÊNCIAS	94

1. INTRODUÇÃO

A infecção periprotética é uma das complicações mais temida, grave e de difícil tratamento após cirurgias de artroplastias (2,87). Ela está associada a uma maior morbidade e reduzida qualidade de vida do paciente, pode evoluir para a perda definitiva dos implantes ou do membro implantado, por infecção crônica e incurável, ou até mesmo à morte por septicemia (2,82,138,189). Apresenta impacto econômico importante para os sistemas de saúde, devido gastos exacerbados com longos e custosos períodos de tratamento, e para a sociedade, devido ao afastamento dos pacientes acometidos das suas atividades produtivas do trabalho (75,82,126).

As bactérias Gram positivas são predominantes nas infecções de próteses articulares, em especial o *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus epidermidis*, porém as contaminações causadas por bacilos Gram-negativos e fungos como a *Candida sp* vêm sendo relatadas com maior frequência em todo o mundo (76). Nas artroplastias do quadril, uma das bactérias mais encontradas nas infecções é o *Staphylococcus aureus* (74,76,82). Este microrganismo tem como característica a formação do biofilme, comunidades de bactérias, que lhe confere proteção contra agentes agressores, como o sistema imune do paciente e antibióticos (52,77,78). Esta proteção das células bacterianas sésseis pelo biofilme, também dificulta a identificação do microrganismo para seu correto diagnóstico nos exames, principalmente de cultura (59,158).

Na infecção periprotética, o diagnóstico pode ser subestimado ou é difícil de ser realizado, principalmente nas consideradas agudas (1,15,50). Nos casos crônicos de infecção, com evidências de soltura dos implantes, com fístulas ativas e ou outras manifestações clínicas, o diagnóstico torna-se mais evidente (15,82,138).

Exames de imagem, radiografias e cintilografia, e exames laboratoriais de sangue como por exemplo; hemograma, proteína C reativa (PCR) e velocidade de hemossedimentação (VHS), são os mais utilizados como auxílio diagnóstico das infecções periprotéticas (15,82,138). O exame que confirma o diagnóstico e identifica o agente infeccioso é a cultura (82).

O material a ser encaminhado para o exame de cultura pode ser o líquido ou secreções periproéticas, coletado através de punção articular ou fragmentos de partes moles e ósseas periprotéticas, coletados durante o debridamento cirúrgico (138).

Uma grande maioria dos microrganismos não identificados nas culturas tradicionais mostra resistência elevada a antibióticos e levam muitas vezes à recidiva das infecções (234). Nos casos de difícil diagnóstico devido à presença do biofilme, a prótese infectada explantada, materiais de síntese ou fragmentos de cimento, removidos durante a cirurgia, podem ou não ser levados à sonicação. Esse método aumenta as probabilidades de diagnóstico dos microrganismos pela cultura, devido ao rompimento do biofilme sem lesar as células sésseis (1,205).

Para evitar as complicações devastadoras da infecção periprotética, existem indicações controversas de tratamento, como o supressivo, com a manutenção dos implantes e uso de antibióticos sistêmicos, e as revisões em um ou dois tempos de todo material implantado (86,208,213,229). A revisão protética em tempo único consiste na retirada dos implantes infectados, debridamento, limpeza cirúrgica do local e colocação do novo implante no mesmo ato cirúrgico (52,138,186,235).

A cirurgia em dois tempos consiste, no primeiro momento a retirada do implante infectado, associado ao debridamento, limpeza cirúrgica e a colocação de um espaçador articular de cimento ósseo de polimetilmetacrilato (PMMA), adicionado com antibiótico (113). O espaçador auxilia ao combate sistêmico da infecção, porque libera antibiótico no foco cirúrgico, preenche o espaço morto criado pela retirada dos implantes e mantém o formato e espaçamento mecânico da articulação (23,172). Após semanas ou até meses de tratamento, com a melhora clínica do paciente e confirmada pelos exames laboratoriais, o segundo tempo cirúrgico consiste na retirada do espaçador e recolocação do novo implante protético (23,73).

Os antibióticos mais utilizados nos espaçadores são a gentamicina e/ou vancomicina isolados na forma de pó, pois apresentam um efeito conhecido contra bactérias Gram negativas e positivas e são capazes de suportar as

temperaturas elevadas da fase exotérmica da polimerização do cimento sem perder sua atividade bactericida (230). Atualmente, há uma grande variedade de doses isoladas dos antibióticos adicionados ao PMMA descrita na literatura (3,9,24,32). A gentamicina varia de 500 a 5 mg e a vancomicina de 3 a 9 mg (118).

Existem vários estudos na literatura (6,24,41,79,147) que avaliam a ação de diferentes concentrações de antibiótico, adicionados aos cimentos ortopédicos. A grande maioria compara a ação antibacteriana local de um único tipo de antibiótico adicionado ao PMMA, com testes mecânicos de resistência do cimento adicionado.

Entretanto, existem poucos estudos (135) relacionados aos tipos e dosagens de antibióticos associados, adicionados ao PMMA, para inibir a formação do biofilme na superfície do cimento ósseo, que comparem se os antibióticos possuem efeitos sinérgicos nas ações antibacterianas (23,25) e tampouco não causem interferência nas propriedades químicas do cimento e dos antibióticos após a reação da polimerização destas combinações.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do estudo é avaliar em modelos experimentais de polimetilmetacrilato adicionado com diferentes concentrações de vancomicina e gentamicina associadas, se há inibição da formação do biofilme de *Staphylococcus aureus in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a eficiência dos antibióticos utilizados, na inibição da formação de biofilme bacteriano de *Staphylococcus aureus* formado por células sésseis nos modelos experimentais de PMMA;
- 2- Avaliar a eficiência dos antibióticos utilizados, na inibição do desenvolvimento das células planctônicas livres de *Staphylococcus aureus* nos modelos experimentais de PMMA;
- 3- Avaliar qualitativamente, a presença ou não de biofilme nos modelos experimentais de PMMA adicionados com antibióticos;
- 4- Avaliar qualitativamente a presença e viabilidade do biofilme nos modelos experimentais de PMMA adicionados com antibióticos;
- 5- Avaliar a atividade sinérgica, indiferente ou antagônica da vancomicina e gentamicina associadas;
- 6- Caracterizar as composições poliméricas dos cimentos de PMMA adicionado com as diferentes concentrações de antibióticos.

3.REVISÃO DE LITERATURA

3.1Biofilme

Alguns microrganismos apresentam uma forte tendência em formar um micro ecossistema, ou colônias, no qual várias cepas e espécies microbianas crescem em um biofilme fechado (4,25,42,43,77) (Figura 1).

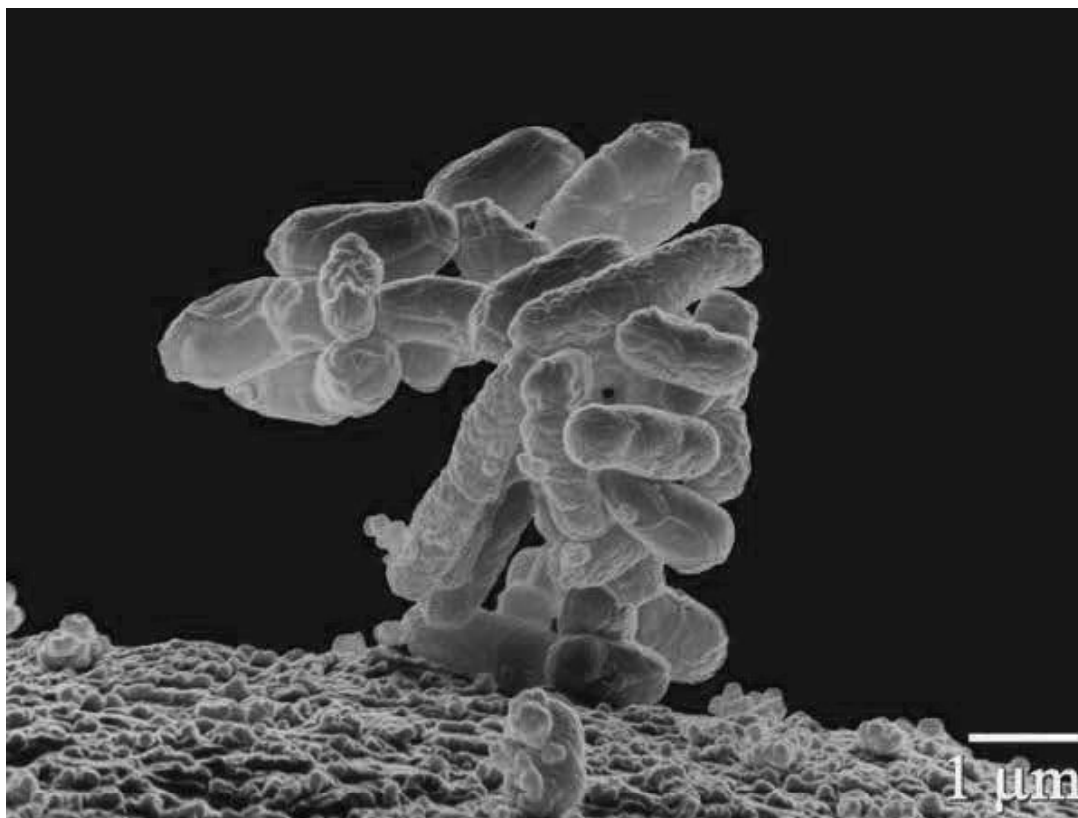


Figura 1. Imagem de micrografia eletrônica de baixa temperatura de um biofilme formado de bactérias *E. coli* ampliada 10.000 vezes.

Fonte: Photo de Eric Erbe, digital colonization by Christopher Pooley, both of United States of America, Agricultural Research Service, EMU. ARS Image Gallery Image Number K11077-1 (173).

Biofilmes são um conjunto de microrganismos emaranhados em uma matriz de polímero orgânico que estão aderidos a uma superfície. Assim, para que os biofilmes se formem é indispensável a presença de três ingredientes básicos: microrganismos, glicocálix (açúcares, proteínas, restos de DNA e gorduras) e superfície (57).

Na fase inicial da contaminação os microrganismos produtores de biofilme aderem-se as superfícies úmidas bióticas ou abióticas (90). Esta adesão pode ser reversível e depende das características físico-químicas da superfície da

célula microbiana, da superfície ao qual o microrganismo está em contato, do fluido biológico e do tempo do contato entre eles (52,90).

A partir do momento que começa a formar os exopolímeros, nas superfícies celulares, esta adesão pode se tornar irreversível. Os exopolímeros que fazem parte da membrana superficial dos microrganismos, tornam-se aderentes na constituição do glicocálix, para formar o biofilme (42,43). O glicocálix auxilia a ancoragem do biofilme à superfície ao qual está instalada. Os microrganismos crescem e multiplicam-se em camadas de biofilme e estas camadas vão sendo depositadas umas sobre as outras, formando um biofilme espesso, o qual é responsável pela proteção das células sésseis bacterianas contra os ataques do sistema imune e antibióticos (58,89). O passo final do ciclo de formação do biofilme, ocorre quando as células da periferia do biofilme desprendem-se, tornam-se novamente células planctônicas livres, que são liberadas aos fluidos do meio externo e podem aderir a outras superfícies e assim reinicia-se o ciclo vicioso de contaminação e/ou de manutenção da infecção (58,90,114) (Figura 2).

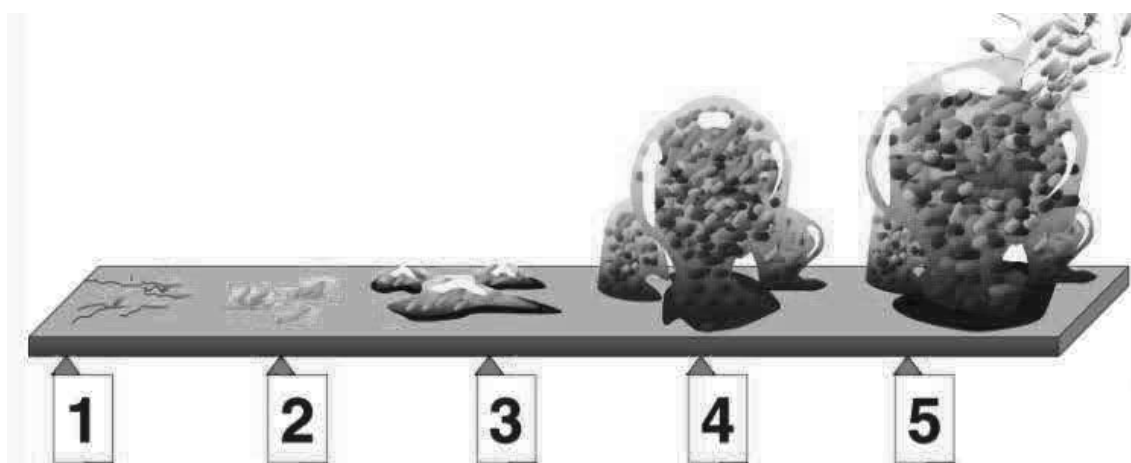


Figura 2. O ciclo de vida do biofilme: (1) adesão reversível das células à superfície do implante, (2) secreção de adesinas e EPS resultando na adesão irreversível do biofilme e proliferação celular, (3) formação de microcolônias e maturado do biofilme, e (4) morte celular nas microcolônias e desprendimento das células que retornam para a fase planctônica, completando o ciclo de vida do biofilme.

Fonte: Adaptado de Monroe D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. PLoS Biol. 2007; 5(11):e307 (148).

Segundo Dibartola *et al.* (50) a presença do biofilme pode causar dificuldades no diagnóstico microbiano porque a matriz do biofilme impede o

cultivo da bactéria, resultando em culturas falso-negativas e na perda do diagnóstico da infecção.

As dificuldades terapêuticas causadas pelos biofilmes estão relacionadas à diminuição da suscetibilidade aos antibióticos, locais e sistêmicos (91). A matriz extracelular do biofilme causa uma barreira adicional, resultando em diminuição da difusão. Além disso, substâncias da matriz reagem com os antibióticos e, assim, diminuem as taxas de transporte (52). Além da proteção pela matriz de biofilme, as bactérias dentro dele apresentam um metabolismo celular diminuído, resultando em menor crescimento/divisão celular e portanto, são menos sensíveis aos antibióticos (55). Devido a esses mecanismos de proteção as concentrações de antibióticos devem exceder muito a mínima concentração inibitória para atuar contra os microrganismos (201).

Nas cirurgias ortopédicas, o biofilme pode ser produzido por muitos microrganismos (90,138,184,208,234). As bactérias mais frequentes nas infecções ortopédicas são *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, cerca de 70 a 80% dos casos, enquanto as bactérias aeróbicas Gram-negativas causam 10-20% de todas as infecções profundas e as anaeróbicas são responsáveis pelos outros 10% (74,77).

A adesão microbiana inicial nas superfícies dos implantes utilizados nas cirurgias ortopédicas também está associada à combinação das forças de Van der Waals, efeito atrativo ou repulsivo ácido-base, interações eletrostáticas, tendo essa última um efeito mais repulsivo (224), e a rugosidade ou porosidade das superfícies implantadas (90).

As forças de Van der Waals são de longo alcance e a atração inicia quando a distância entre as superfícies de interação é em média de 50 a 100 nm. Elas são regidas pelo ângulo de contato de uma gota de líquido sobre a superfície do implante. Maiores ângulos de contato revelam características de hidrofobicidade, menores ângulos de contato revelam características de hidrofilicidade. A hidrofilicidade permite adsorção das proteínas do plasma, enquanto a hidrofobicidade controla a adesão microbiana (224) (Figura 3).

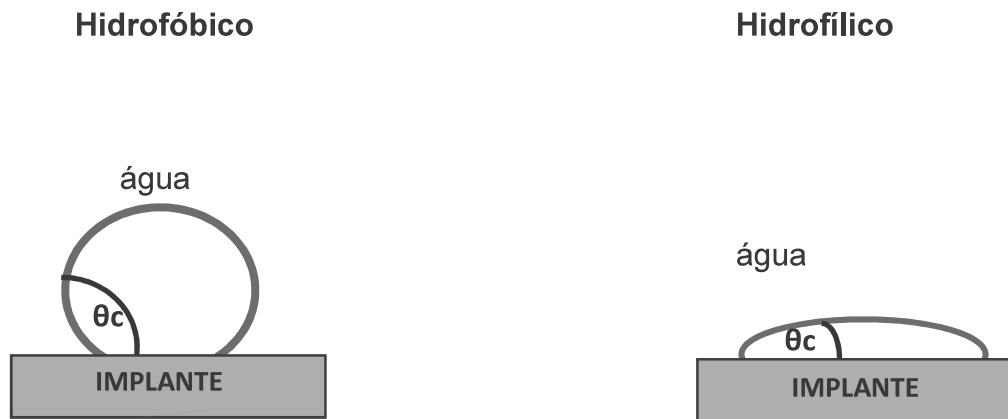


Figura 3. Superfícies de implantes hidrofóbicas e hidrofílicas. Ângulo de contato entre o líquido e o implante.

Fonte: Adaptado de Van de Belt H, Neut D, Schenk W, Van Horn JR, Van der Mei HC, Busscher HJ. Infection of orthopedic implants and the use of anti-biotic-loaded bone cements: A review. Acta Orthop Scand. 2001; 72(6): 557-71 (220).

As interações ácido-base podem ser atrativas ou repulsivas, dependendo da química das superfícies microbiana e do substrato, enquanto as interações eletrostáticas são geralmente repulsivas, porque as superfícies naturais e sintéticas são quase sempre carregadas negativamente repelindo microrganismos infecciosos carregados negativamente (85).

A rugosidade ou porosidade das superfícies é outra característica muito importante que deve ser considerada na formação do biofilme, especialmente na ortopedia (90,92). Muitos implantes são confeccionados a partir de vários compósitos e da combinação de várias ligas metálicas, que mesmo extremamente polidas, apresentam porosidades (104,124).

O cimento ósseo apresenta rugosidades e porosidades que são formadas durante a reação exotérmica do seu preparo. Microporos podem ser encontrados mesmo com as técnicas de preparo da mistura dos componentes do cimento de última geração, que propiciam uma mistura mais homogênea (133,134,229). Por outro lado, a maioria das rugosidades do cimento são formadas após o mesmo ser inserido entre o implante e o osso, na sua forma pastosa. Durante sua polimerização ocorre uma expansão seguida de uma contração na fase de endurecimento. Após o endurecimento, fica impressa a característica das superfícies dos materiais e do osso que ficaram em contato com o mesmo,

agregando muitas rugosidades ao cimento (93,95,97). Superfícies que apresentam maior rugosidade ou porosidades são propícias para o crescimento de microrganismos aderentes formadores de biofilme (206).

3.2 Infecção Periprotética

As artroplastias são cirurgias de substituições articulares indicadas na ocorrência da falência de uma articulação. As causas mais comuns são; artroses, sequelas de fraturas, doenças ortopédicas da infância, doenças inflamatórias ou metabólicas e tumores ósseos. São cirurgias de consideradas de grande porte, com maiores riscos de complicações e sangramento, porém com resultados considerados extremamente satisfatórios para os pacientes (130).

As complicações associadas a estes procedimentos artroplásticos são inúmeras, tais como: luxações, solturas assépticas, quebras e desgastes dos implantes. Entretanto, a infecção periprotética indiscutivelmente é uma das mais temidas, graves e de difícil tratamento (130,235,236).

Em algumas situações, não é possível combater a infecção e nestes casos, os pacientes podem evoluir com a perda da função do membro, limitações das atividades da vida diária, além de um desgaste psicológico e emocional importante (2,48,138). Nos casos extremos e rebeldes ao tratamento, há necessidade de amputação do membro ou o paciente pode ir a óbito por septicemia (48,74,189,208,236).

Os principais fatores predisponentes para a infecção periprotética estão relacionados à comorbidades e/ou situações em que o sistema imune ou de reserva do paciente, estão comprometidos, como: idade avançada do paciente, desnutrição, tabagismo, obesidade, diabetes mellitus, infecção por HIV em estágio avançado, presença de foco infeccioso à distância e antecedente de cirurgia ou infecção prévia na articulação tratada (15). Pacientes portadores de artrite reumatoide ou psoriática também apresentam maiores riscos de infecção pós-operatória (33,48).

Uma das formas de prevenir a infecção periprotética é evitar a contaminação cirúrgica e a adesão bacteriana (89). Algumas medidas protetivas podem ser

adotadas no ato cirúrgico para prevenir contaminação como: utilização de centro cirúrgico estritamente estéril; climatização adequada da sala operatória; técnica cirúrgica precisa; padronização dos pacientes, materiais e equipe; administração de um esquema de profilaxia antibiótica sistêmica; limpeza do local a ser operado com soluções antissépticas; determinar um menor tempo cirúrgico; menor fluxo de pessoas na sala cirúrgica e realizar curativos de forma asséptica (2,142). Se as bactérias forem capazes de derrotar essas barreiras, abre-se uma janela de oportunidades para invadir, estabelecer-se intra-articular, desenvolver ou persistir com a infecção (79).

No ato operatório das artroplastias, uma grande quantidade de material metálico (prótese) é implantado. A agressão cirúrgica do procedimento vai proporcionar uma degranulação dos granulócitos no local do sítio cirúrgico, acumulando-os ao redor do implante. Isso por sua vez diminui a produção de superóxido desmutase, agente antioxidante, que gera prejuízo na capacidade de defesa contra bactérias. Dessa forma, presume-se que a presença do implante diminui em mais de 100.000 vezes o tamanho do inóculo bacteriano necessário para que a infecção ocorra (76).

Além dos granulócitos degradados acumulados ao redor dos implantes, macromoléculas de proteínas plasmáticas são adsorvidas do meio ambiente biológico e formam um filme de condicionamento ao redor da superfície do implante. Este filme de condicionamento adere nas microporosidades das superfícies dos implantes e adsorvem várias proteínas plasmáticas antes dos primeiros microrganismos aparecerem. Esse processo ocorre em segundos de exposição do implante ao meio biológico. Portanto, as proteínas plasmáticas formam um filme de condicionamento sobre os implantes e isso significa que os microrganismos, por meio dos seus mecanismos de fixação, aderem ao filme de condicionamento adsorvido favorecendo sua fixação à superfície do implante (220).

Para evitar estas complicações graves e de difícil tratamento, vários estudos para um diagnóstico precoce e classificações para auxílio no tratamento são descritos na literatura (15,82,138).

Dentre as classificações utilizadas nas infecções periprotéticas Zimmerli *et al.* (235) propuseram o tipo precoce, que acontece durante os 3 primeiros meses após a cirurgia, o tipo retardado, entre 3 meses e 2 anos, e tardio, após 2 anos do procedimento.

Tsukayama *et al.* (214,215) foram mais abrangentes e classificaram as infecções periprotéticas com relação à cronologia em agudas ou crônicas; período de início de desenvolvimento dos sintomas após a cirurgia inicial, em precoce e tardio; modo de infestação, hematogênica (endógena) ou por inoculação perioperatória. Também considera as infecções diagnosticadas pela cultura positiva do líquido sinovial puncionado ou tecido periprotético coletado em cirurgias de revisão (214,215) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da infecção articular periprotética de Tsukayama *et al.* (214,215).

Tipo de infecção/ Características	I. Cultura intraoperatória positiva	II. Pós-operatória precoce	III. Hematogênica aguda	IV. Crônica tardia
Início dos sintomas após terapia de base	_____	Até 4 semanas	Após período assintomático	Após 4 semanas
Mecanismo	_____	Exógeno	Hematogênico	Exógeno ou hematogênico
Agente etiológico mais comum	<i>Staphylococcus coagulase-</i> (epidermidis)	<i>Staphylococcus</i> (Coag + e -)	<i>Staphylococcus Coag</i> +, <i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus</i> (Coag + e -)
Quadro clínico	Artroplastia dolorosa	Bacilos Gram - Febre, sinais inflamatórios, drenagem persistente sem fístula.	Febre, sinais inflamatórios sem fístula.	Febre, fístula, drenagem, purulência, empastamento local.

Schmalzried *et al.* (189) mostraram em seu estudo de acompanhamento de pacientes que existe um aumento das infecções de origem hematogênica e os principais focos primários geralmente são: trato urogenital, respiratório, cutâneo, dentário e gastrointestinal.

Nos casos de infecções agudas, além dos fatores demográficos, físicos e sistêmicos, fatores cirúrgicos também podem influenciar no desenvolvimento da infecção periprotética, ou seja, tempo cirúrgico prolongado superior a 150 minutos, transfusão sanguínea e realização de artroplastia bilateral em um mesmo tempo cirúrgico (142). Fatores que retardam a cicatrização cirúrgica como necrose isquêmica, hematoma, celulite ou abscesso de ferida, aumentam o risco de infecção pelo fato de que tecidos profundos contíguos à prótese estão desprovidos das barreiras locais de defesa (48,149,235).

A história clínica do paciente com infecção periprotética é insidiosa, e geralmente começa com dor. Tem como característica ser contínua, noturna e piora com atividades de esforço (138). Se for prótese no quadril e ou joelho piora com o caminhar. A localização geralmente é sobre a região que foi submetida à cirurgia, mas pode irradiar-se ao longo do membro. No quadril a dor frequentemente está localizada na região inguinal, e pode irradiar para face interna da coxa (15).

Sinais sistêmicos como febre e calafrios não são muito comuns na fase aguda, assim como sinais na pele como hiperemia, calor e rubor (15,138). Deiscência dos pontos da ferida cirúrgica e ou secreção serosa contínua pela mesma, podem ser sinais de alerta para um processo infeccioso estar na fase inicial. As fístulas são mais comuns nas infecções crônicas (15,33).

A resistência das infecções periprotéticas aos mecanismos de defesa do hospedeiro, à terapia antimicrobiana e ao seu diagnóstico, está amplamente relacionada ao ambiente protetor do biofilme, aderido à superfície do implante (51,90).

Apesar de atualmente diversos tipos de exames estarem disponíveis para a determinação de um diagnóstico precoce das infecções periprotéticas, esses não têm sido aplicados de forma consistente, uniforme e objetiva, o que pode

contribuir para a falha ou retardo inaceitável de diagnósticos e, conseqüentemente, procedimentos terapêuticos realizados de forma tardia (82).

Para auxílio diagnóstico exames de imagem são utilizados, mesmo não sendo os mais específicos para infecção. Os mais solicitados são as radiografias e cintilografia óssea (235).

O exame radiográfico tem baixa especificidade, principalmente nas fases iniciais da infecção. Seus achados mais expressivos aparecem geralmente após 3 a 6 meses do início dos sintomas. Por ser um exame barato e de baixo custo, deve ser sempre solicitado, pois afasta outras causas de dores articulares, como luxações e fraturas periprotéticas (48,82). Nos casos de infecções crônicas, o exame radiográfico pode ser útil na identificação de linhas de radiolusência óssea ao redor dos implantes, que quando progressivas, observadas nas radiografias seriadas, pode ser um indicativo de soltura séptica ou asséptica (82). Nos casos mais avançados de infecção periprotética os achados observados mais comuns ao exame de radiografia são: diafisites, reabsorção óssea periprotética, chamadas de osteólise, ossificações ectópicas, soltura dos implantes e neoformação de osso periosteal (48).

A cintilografia pode ser solicitada como exame auxiliar no diagnóstico diferencial, principalmente quando utilizadas as técnicas de leucócitos ou imunoglobulinas marcadas com radioisótopos (48). O exame não apresenta uma especificidade para o diagnóstico de infecção periprotética, porém pode indicar uma soltura precoce dos implantes ou reação óssea periprotética, que associado à avaliação clínica do paciente e outros achados de exames, pode ajudar no diagnóstico da infecção (235).

O radiomarcador mais comumente utilizado é o Tc99m (tecnécio 99 meta-estável). Nessa técnica o órgão afetado por uma doença passa a absorver mais ou menos radiofármaco (233). Segundo Blanc *et al.* (27) a cintilografia de leucócitos rotulados de infecções crônicas periprotéticas do quadril apresentou baixa sensibilidade (57%) e boa especificidade (75%), porém é um exame auxiliar que deve ser analisado em conjunto com outros dados.

A tomografia computadorizada e a ressonância nuclear magnética, não são exames preferenciais solicitados na suspeita da Infecção periprotética (212). A

grande quantidade de metais dos implantes produz muitos artefatos que dificultam a interpretação das imagens. Os mesmos geralmente são solicitados em situações especiais, mais para diagnósticos diferenciais, do que propriamente para identificação da infecção (15,212).

Exames laboratoriais como leucograma, velocidade de hemossedimentação (VHS), D dímero, proteína C reativa (PCR), alfa defensiva e esterase leucocitária são indicados como auxiliares no diagnóstico das infecções periprotéticas, mas seus resultados nem sempre são específicos para confirmar a infecção e guiar a terapia antimicrobiana (48).

Parvizi *et al.* (169) demonstraram que o teste colorimétrico para detecção de esterase leucocitária no líquido sinovial é altamente sensível e específico para o diagnóstico das infecções periprotéticas do quadril. Esse teste além da sua especificidade, apresenta como vantagens a obtenção de resultado rápido (aproximadamente 2 minutos) e baixo custo. Segundo os autores valores acima de 27.800 leucócitos/mL sugerem valor preditivo positivo de 94%.

Nos casos suspeitos de infecção periprotética em que não há confirmação diagnóstica com os demais exames solicitados, e ainda gera dúvidas, está indicada a punção articular para coleta do líquido periprotético (15,74). A punção por agulha necessita dos mesmos cuidados e rigores de antisepsia e assepsia de um procedimento cirúrgico, pois pode vir a ser o foco de contaminação do implante (82). Em algumas articulações mais profundas, e recobertas por grupos musculares mais espessos, como nas artroplastias do quadril, há necessidade da punção ser guiada por exames de imagem auxiliares como a ultrassonografia, tomografia ou o aparelho de intensificador de imagens no centro cirúrgico (138).

As culturas de tecido periprotético ou da punção articular periprotética, são consideradas padrão de referência. A positividade desse método pode variar de 65 a 89% (145,215). Essa variação pode ser explicada pela formação de biofilme nas superfícies dos implantes metálicos e pela prescrição de antibióticos previamente ao teste (193,168).

Qu *et al.* (177) em seu estudo de metanálise sobre culturas do líquido sinovial envolvendo 3.332 pacientes encontraram valores de sensibilidade global e de especificidade em média de 72% e 95% dos estudos avaliados. Os autores

recomendaram após essa ampla revisão, que a semeadura deve ser realizada em frascos de hemocultura e que o cirurgião faça a interrupção da antibioticoterapia pelo menos duas semanas antes da punção ou coleta. Enayatolhahi e Parvizi (64) enfatizam que o Conselho Internacional de Infecções Músculoesqueléticas da Philadelphia de 2013, orientam a não infusão de soro fisiológico intra-articular, no caso de punção negativa, quando se busca o diagnóstico de infecção periprotética por este método de aspiração.

Considerando-se a cultura de tecido periprotético, existe uma variação entre os autores do número de fragmentos e de dias necessários para o crescimento das diferentes bactérias envolvidas nesses tipos de infecções para a obtenção de um diagnóstico microbiológico preciso. O número de fragmentos varia de 3 a 6 e o número de dias até 14 visando o crescimento mais lento de bactérias como *Propionibacterium sp* (8,188).

Em alguns casos a recorrência da infecção periprotética pode ser observada mesmo quando o resultado das culturas do líquido e dos tecidos periprotéticos intraoperatórios se apresentam negativas. As taxas falso-negativas oriundas dessas culturas são inaceitavelmente elevadas variando de 17 a 53% (8,13,199). Infecções ocultas podem ser responsáveis pela instabilidade e dor crônica ou perda do implante e podem ser subdiagnosticadas pelos métodos tradicionais de cultura (120,156,184). Tais cenários sugerem a inadequação dos testes de cultura para identificar uma infecção subclínica persistente, em algumas situações (20).

Segundo Dibartola *et al.* (50), a presença do biofilme pode causar dificuldades no diagnóstico microbiano porque a matriz do biofilme impede a cultura da bactéria, resultando a culturas falso-negativas e à perda do diagnóstico da infecção

Microrganismos associados à infecção da articulação protética podem ser encontrados anexados firmemente às superfícies do implante, local onde esses costumam formar biofilmes. Esse fato sugere que a obtenção do explante é uma amostra ideal a ser coletada e encaminhada para exames e pode melhorar o diagnóstico da infecção periprotética (53, 236).

A sonicação de explantes é um método valioso para o diagnóstico rápido e preciso das infecções periprotéticas. Consiste em um método físico no qual ondas de ultrassom rompem a camada do biofilme que está firmemente aderido à superfície do implante, preservando a viabilidade microbiana (216). O rompimento do biofilme permite que as bactérias sésseis sejam cultivadas, e assim diagnosticadas (213).

Resultados do primeiro estudo hospitalar do sul da Ásia sobre a sonicação de implantes explantados para o diagnóstico de infecção articular protética, demonstrou que a cultura do fluido sonicado dos implantes é um método mais sensível que a cultura dos tecidos periprotéticos (191). Os autores observaram uma sensibilidade do fluido sonicado dos implantes de 100% em pacientes com infecções tardias em oposição com 88% para culturas de tecidos periprotéticos.

Vários estudos relatam sobre o aumento da sensibilidade da cultura do fluido da sonicação quando comparada aos métodos de cultura convencionais de tecidos intraoperatórios e líquido sinovial, tornando um dos métodos mais confiáveis na detecção das infecções periprotéticas (1,30,105,116,174,175,190,211).

Tani *et al.* (205) obtiveram sensibilidade da cultura do fluido sonicado de implantes de 100% nas infecções precoces em oposição de 67% para culturas de tecidos periprotéticos. Trampuz *et al.* (211) observaram que a culturas oriundas de explantes sonicados apresentaram 79% de sensibilidade versus 61% para as culturas padrões.

Van-Diek *et al.* (222) relataram em seu estudo baixa sensibilidade da sonicação nas fases iniciais da infecção articular protética. Sugerem, portanto, que nos estágios iniciais desse tipo de infecção as bactérias podem não ter tempo de formar um biofilme maduro. Por esse motivo, encontraram maior sensibilidade para a cultura de tecidos periprotéticos.

A primeira sonicação de espaçadores de PMMA explantados durante a artroplastia de revisão em 2 tempos foi realizada por Borens *et al.* em 2013 (31) A partir desse estudo, outros autores coletaram dados de espaçadores sonicados. Nelson *et al.* (156) relataram que a sonicação de espaçadores adicionados com antibióticos é útil na previsão de falha atribuível à infecção

recorrente após a cirurgia de revisão em dois tempos, pelo fato que ela aumentou a sensibilidade das culturas intraoperatórias de 36% para 82%.

Rothenberg *et al.* (185) obtiveram uma maior sensibilidade para a cultura dos implantes por meio da sonicação comparada à cultura tradicional do líquido sinovial e dos tecidos 97% versus 57% ($p < 0,001$); 97% versus 70% ($p < 0,001$), respectivamente. Em seu estudo, a especificidade da cultura do implante submetido à sonicação não apresentou diferenças em relação à cultura do líquido sinovial e dos tecidos 90% versus 100% ($p = 0,833$); 90% versus 97% ($p = 0,317$), respectivamente. O *Staphylococcus* coagulase-negativa foi o microrganismo mais prevalente em ambos os tipos de procedimentos. Os cinco microrganismos mais frequentemente encontrados nas culturas do líquido sinovial, dos tecidos e do implante submetido à sonicação foram o *Staphylococcus* coagulase-negativa (26%), *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (19%), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (12%), *Streptococcus* α -hemolítico (5%) e *Enterococcus fecalis* (5%). Concluem em seu estudo que a utilização de culturas de explantes submetidos à sonicação em revisões de artroplastia melhora a sensibilidade do diagnóstico pela detecção da presença de bactérias nas revisões clínicas e nas infecções ocultas.

A prescrição e utilização de tratamento antimicrobiano previamente à cirurgia pode prejudicar a taxa de isolamento microbiológico pela cultura de tecidos periprotéticos (15). Trampuz *et al.* (211) relataram que a sensibilidade da cultura do fluido sonicado de implantes foi maior que a cultura de tecidos. Isso ocorreu pelo fato de que as bactérias planctônicas são mais suscetíveis a agentes anti-infecciosos que as bactérias do biofilme. Relataram também que ao uso de terapia antimicrobiana pode afetar a sensibilidade da cultura e que o tempo de interrupção do uso desses medicamentos antes do ato cirúrgico deve ser determinado por futuros estudos.

No que se refere à detecção de polimicrobianos, Sebastian *et al.* (191) mostraram a superioridade (5,5%) da sonicação de fluidos de implantes em relação à cultura de tecidos periprotéticos.

A sonicação é uma técnica simples, de baixo custo e que apresenta resultados que melhoram significativamente o diagnóstico microbiológico. Ela

permite um diagnóstico mais preciso por meio da identificação do microrganismo infectante, guiando o cirurgião na seleção de antibióticos locais e sistêmicos para auxiliar no tratamento dos quadros de infecções articulares periprotéticas. Trebse *et al.* (213) afirmaram que as taxas de erradicação bem sucedida das infecções periprotéticas articulares são melhoradas quando o microrganismo é conhecido.

Com a confirmação do diagnóstico ou na forte suspeita da infecção periprotética, o tratamento deve ser o mais precoce possível (138). Nos casos de suspeita de infecção aguda precoce, nas quais pode-se encontrar secreção serosa extravasando através da cicatriz cirúrgica, deiscência dos pontos, bordas hiperemiadas e outros sinais sugestivos, está indicado a limpeza e debridamento cirúrgico, com a troca das porções intercambiáveis dos implantes, no caso do quadril a cabeça da haste femoral e o *liner* (inserto) acetabular (82,138). Associa-se o debridamento cirúrgico, a coleta de fragmentos de partes moles e ósseo, para cultura e antibiograma. Nestes casos o tratamento com antibióticos sistêmicos deve ser mantido, baseado nos resultados das culturas, até a melhora da resposta laboratorial e clínica do paciente (138,169).

A limpeza e o debridamento cirúrgico exaustivos, têm sido considerados pré-requisitos para auxílio na cura das infecções ortopédicas, mas essa técnica é discutida, devido a incapacidade de esterilizar o sítio infectado isoladamente. O debridamento pode remover uma grande quantidade de carga biológica, porém não é capaz de eliminar pequenas colônias bacterianas que podem ser deslocadas para novos habitat em nichos do local debridado (231).

Nos casos de infecção crônica o tratamento também é cirúrgico, com a retirada dos implantes, lavagem, debridamento, coleta de material para cultura e substituição dos implantes, no mesmo ato ou tardiamente em outro procedimento. São conhecidas como revisão em tempo único ou dois tempos (24,73,103,107).

As revisões em tempo único são indicadas em pacientes hígidos, sem comorbidades, em infecções de microrganismos não multirresistentes, com bom estoque ósseo e partes moles em boas condições que permitam uma boa

cobertura dos implantes (136). Fístulas ativas, mas de baixo débito, não são contraindicações absolutas de cirurgia em tempo único (180).

Insall *et al.* (113) foram os primeiros a descrever o procedimento de reimplante em 2 tempos para o manejo das infecções periprotéticas. O primeiro passo envolve a remoção de todo o material implantado na articulação. Essa é seguida de um debridamento extensivo dos tecidos moles e ósseos não viáveis, sinovectomia e lavagem exaustiva com soro fisiológico. Uma vez que a articulação está preparada, um espaçador de cimento adicionado com antibiótico estático ou articulado é inserido. Terapia antibiótica sistêmica é prescrita ao paciente por um período prolongado, média de quatro a seis semanas (6,170).

Os antibióticos intravenosos são os mais comumente utilizados e são determinados com base nos microrganismos infectantes investigados por meio de culturas microbiológicas pré e pós-operatórias (23). Em casos de pacientes imunocomprometidos, presença de grande área de drenagem ou de microrganismo especialmente virulento (MRSA e MRSE), recomenda-se administração de antibióticos intravenosos por um período prolongado em média de três a quatro meses previamente ao segundo tempo cirúrgico e considera-se a administração de antibióticos orais de quatro a seis semanas posteriormente ao reimplante do segundo tempo cirúrgico (5,60,61).

O reimplante protético é adiado até que a terapia antibiótica tenha sido completada, a ferida tenha cicatrizado e a erradicação da infecção tenha sido confirmada (3,13,108,110). O declínio nos níveis de VHS e PCR associados à ausência de sinais clínicos de infecção geralmente são indicativos de prosseguir com o segundo tempo cirúrgico. Pode-se utilizar também o teste da contagem de leucócitos do líquido sinovial (80,194). No entanto, evidências clínicas que suportam os testes sorológicos de rotina e de análise do fluido articular antes do reimplante não estão cientificamente bem estabelecidos (80,127,194).

O segundo tempo do procedimento envolve a remoção do espaçador de cimento adicionado com antibiótico, a repetição da lavagem/debridamento e a reconstrução articular com os novos componentes protéticos (113).

3.3 Cimentos ósseos (PMMA)

O cimento ósseo é um material composto pela mistura de duas substâncias: um polímero (pó) e um monômero (líquido). Unidos pelo processo de reação química denominada “polimerização”, esses componentes são conhecidos como polimetilmetacrilato (PMMA).

O polimetilmetacrilato (PMMA) foi um dos primeiros materiais produzidos pela indústria química para ser usado como biomaterial. Suas primeiras aplicações foram na odontologia (16,152), onde ainda é comumente utilizado na confecção de dentaduras. Na cirurgia ortopédica, Scales & Herschell (1945) (187) e os irmãos Judet (1950) (119) desenvolveram uma endoprótese de PMMA no quadril para tratar coxartrose. Charnley (1970) (39) introduziu o cimento ósseo de PMMA para estabilizar implantes metálicos de quadril e promover a transferência das cargas mecânicas entre o osso e o implante. Atualmente, apesar de vários aprimoramentos (97), os cimentos ósseos à base de PMMA ainda têm sido utilizados.

Os cimentos ósseos são compostos basicamente de 40 g de polímero sob a forma de pó e 20 mL de monômero líquido. O pó apresenta forma granulada com diâmetro de 1 a 125 μm , com peso molecular entre 60.000 e 1.000.000 g/mol, densidade de 1,18 g/cm³ e temperatura de fusão cristalina igual a 160°C, sendo um polímero predominantemente amorfo. Além dos copolímeros do metilmetacrilato, as partículas de pó possuem iniciadores de polimerização como o peróxido de benzoíla (0,75 a 2,6%), dióxido de zircônio (ZrO₂– 8 a 15% por peso) e sulfato de bário (BaSO₄) que permite a característica de radiopacidade para promover uma melhor visualização radiográfica desses cimentos. O líquido é composto de um monômero MMA, um acelerador N,N-Dimetil p-toluidino comendo de 0,4 a 2,8% de peso, traços de hidroquinona (15 a 75 ppm) e ácido ascórbico que têm a função de estabilização, impedindo a auto cura do monômero líquido durante o armazenamento (146).

Existem algumas variações na composição dos cimentos ósseos de PMMA entre as marcas comerciais (155). Pesquisas direcionadas às melhorias das propriedades térmicas, mecânicas e biológicas dos cimentos ósseos têm sido comumente desenvolvidas e elas sugerem a inclusão de pequenas

quantidades de carbono, grafite, aramida, partículas ósseas, hidroxiapatita, titânio, tricalciofosfato e outros. A associação com antibióticos com intuito de auxiliar no combate das infecções locais, também são utilizadas (237).

O processo de polimerização é iniciado pela mistura do pó com o líquido a partir do peróxido de benzoíla e do acelerador de presa N,N-Dimetil p-toluidino, hidroquinona. A polimerização ocorre por meio de radicais livres e libera calor de até 113°C em estudos *in vitro* (18) e de 40 a 56°C em estudos *in vivo* (124,229), pois se trata de uma reação exotérmica. O calor gerado é prejudicial à vitalidade das células que entram em contato com o cimento, pois pode levá-las à necrose. Durante a fase de liberação de calor o volume do material aumenta e após, ocorre a contração da polimerização de cerca de 8% em média (143).

Durante o preparo, o cimento ósseo passa por quatro estágios distintos, variando suas propriedades físicas e químicas, permitindo assim manuseá-lo ou não, dependendo da fase de polimerização em que se encontra:

- a) Fase de mistura: fase na qual o cirurgião mistura o pó e o líquido obtendo uma massa homogênea e viscosa. Com o passar do tempo a viscosidade do material aumenta.
- b) Fase pegajosa: apresenta baixa viscosidade na qual a mistura falha em separar-se do dedo enluvado.
- c) Fase de trabalho: fase na qual o material adquire consistência suficiente para ser manipulado não aderindo às luvas do cirurgião.
- d) Fase de endurecimento: fase na qual ocorre o endurecimento do material devido à completa polimerização. As temperaturas máximas são atingidas nessa fase. O tempo de endurecimento pode variar de acordo com a proporção pó e líquido, temperatura do cimento e do ambiente.

Não existe um tempo pré-determinado para cada fase devido à ampla variação dos cimentos e das condições teste, porém, a maioria dos cimentos ósseos à base de PMMA endurecem entre 10 e 20 minutos (84,93).

As propriedades mecânicas e a estabilidade dos cimentos ósseos são afetadas pela incorporação de bolhas de ar. Portanto, Lewis em 1997 (132) determinou diferentes métodos de mistura dos cimentos ósseos:

- a) Mistura manual: mistura do pó e líquido com espátula de propileno ou aço inoxidável em uma cuba metálica a uma velocidade de 1 a 2 Hz e um intervalo de tempo de 45 a 120 segundos. A mistura manual permite a inserção de bolhas de ar na mistura polimérica (38).
- b) Mistura por centrifugação: Os componentes da mistura são inseridos em uma seringa e levados a uma centrífuga a 2300-4000 rpm pelo tempo de 30 a 180 segundos.
- c) Mistura à vácuo: o pó é adicionado ao líquido manualmente e o vácuo é aplicado em pressões que variam de 5 a 100 kPa com frequência de 1 a 2 Hz por um tempo de 15 a 150 segundos. O vácuo reduz as macro e micro porosidades do cimento.
- d) Mistura ultrassônica: a mistura de pó e líquido é realizada em uma cuba metálica sobre um prato vibratório (50 vibrações por segundo).

A viscosidade do material influencia na incorporação de bolhas de ar, ou seja, materiais mais viscosos em misturas não controladas, apresentam maior porosidade que materiais menos viscosos devido às maiores dificuldades encontradas pelas bolhas de ar aprisionadas de escaparem da matriz polimérica. Quanto maior a porosidade do cimento, menor sua resistência mecânica, e maior área de hidrofiliidade o que pode ser um facilitador para aderência e contaminação por microrganismos (94).

Devido às propriedades de biocompatibilidade do material de PMMA, o número de cimentos disponíveis no mercado cresceu. Como outros biomateriais utilizados em humanos, isso implica também no risco de atrair microrganismos infecciosos (90).

3.4 Cimentos ósseos (PMMA) com adição de antibióticos

Cimentos ósseos com adição de antibióticos são utilizados em algumas cirurgias de artroplastias primárias ou revisões para fixação do implante ao osso, ou como espaçadores articulares nas cirurgias de revisão em dois tempos, ou para preencher perdas ósseas nos quadros graves de osteomielite (65,66,186).

Casos em que o paciente apresenta alguma história de infecção prévia no local da cirurgia, ou que apresenta alguma comorbidade clínica que diminua sua

imunidade e como consequência tenha uma predisposição à infecção, o cimento ósseo adicionado com antibiótico pode ser uma escolha do cirurgião, nas artroplastias primárias ou de revisão cimentadas, para fixação do implante ao osso, e auxílio na profilaxia de infecção (227).

Existe várias marcas comerciais de cimento ósseo com adição de antibiótico à venda no mercado (88,112,171,195). Nestes produtos, as doses dos antibióticos adicionados são pré-determinadas e testadas pelos fabricantes, pois a função de fixação mecânica do implante ao osso não pode ser comprometida pela adição do antibiótico ao polímero (10,11,56,57,71,121). Os mais comercializados no nosso mercado são os associados a gentamicina e ou vancomicina, em doses específicas de cada marca comercial (6,21,38,39,79) .

Na literatura outros antibióticos utilizados para impregnação dos cimentos ósseos como a tobramicina (121,171), cefalosporinas, minociclina o azetreonam (109) podem ser encontrados, porém não são objetos do presente estudo.

Nos casos em que o cimento ósseo adicionado com antibiótico não necessita da função mecânica de estabilização do implante, e sim do preenchimento do espaço morto e liberação local da droga, a seleção de quais antibióticos a serem adicionados aos cimentos ósseos, devem seguir vários princípios (45,118). O principal, seria a função antimicrobiana específica contra os microrganismos presentes no local da infecção (115).

Fatores endógenos e exógenos como a temperatura, as formas de manipulação e mistura devem ser considerados, pois podem afetar a função antimicrobiana quando adicionados ao PMMA (115). Os antibióticos a serem adicionados devem ter amplo espectro bacteriano, incluindo patógenos gram-positivos e gram-negativos, suficiente atividade bactericida, alta potência antibacteriana específica, baixa taxa de resistência primária bacteriana, desenvolvimento mínimo de resistência durante a terapia e baixo potencial de sensibilização. Acentuada solubilidade em água, para facilitar sua liberação do cimento ósseo gradualmente por um período de tempo apropriado, estabilidade térmica para suportar o calor gerado pela polimerização do cimento à base de PMMA, ser quimicamente estável e provocar mínima reação inflamatória local (118,227).

O mecanismo de liberação dos antibióticos dos cimentos ósseos é pouco conhecido. Estima-se que seja um fenômeno de superfície ou por um modelo de difusão em massa. O fenômeno da difusão depende fortemente da disponibilidade de poros e capilares de conexão no cimento ósseo, através dos quais os fluidos podem penetrar e dissolver os antibióticos que se difundem lentamente para o exterior, conhecido como fenômeno de lixiviação (17,83). Foi sugerido recentemente por meio de um estudo de Van de Belt *et al.* (219) que a liberação inicial de antibióticos durante as primeiras horas após a exposição do cimento ósseo adicionado com antibióticos aos fluidos é principalmente um fenômeno de superfície, fenômeno de eluição.

A quantidade de antibiótico liberada ao ambiente depende da composição do cimento, de sua porosidade, da área total exposta ao fluido, assim como a concentração e as características do antibiótico (159,200). O perfil de liberação é fortemente dependente do tempo, tendo um aumento rápido nas primeiras 24 horas e após esse tempo, os valores de concentração caem para níveis abaixo do ideal (160). A quantidade e qual antibiótico que pode ser utilizado na confecção de espaçadores associadas aos 40g de cimento ósseo, dose padrão de PMMA comercializada, ainda não está bem determinada. Na literatura os mais utilizados são a gentamicina, 500mg a 5g e vancomicina 3 a 9g (118).

A gentamicina é o antibiótico mais comumente adicionado devido ao seu amplo espectro antibacteriano relevante nas cirurgias de revisão e sua facilidade de eluição do PMMA (23). Entretanto, nem todos os microrganismos associados à infecção protética são sensíveis à gentamicina, alguns *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) que são resistentes à metilicina, são também resistentes à gentamicina. Portanto, nesses casos a vancomicina pode ser utilizada (5,6,7). Saber a quantidade de antibióticos que o cimento ósseo de PMMA elui é importante para trazer informações aos cirurgiões para definir o momento ideal de explantar os espaçadores e planejar o replante da prótese (7).

Estudos *in vitro* relataram que apenas 5 a 8% dos antibióticos incorporados a uma matriz acrílica é finalmente liberada após um longo período de tempo (172,219). Estudos *in vivo* confirmaram que apenas 5 a 18% da gentamicina incorporada ao cimento ósseo é liberada (210).

A adição da vancomicina ao PMMA tem evitado a necessidade de terapias sistêmicas prolongadas e tem se mostrado eficaz (103,203). Porém, o volume adicional de vancomicina deve ser cuidadosamente determinado pelo fato de reduzir significativamente as propriedades do cimento (32,121,133).

A vancomicina é um antibiótico que apresenta atividade bactericida intracelular a pequenas variantes da colônia de *Staphylococcus* (12). Eles penetram rapidamente no glicocálix (46,56,117). Uma vez incorporada ao biofilme demonstra uma atividade bactericida a bactérias planctônicas (91). Ela apresenta uma atividade bactericida superior a *Staphylococcus* incorporados no biofilme em comparação com os outros antibióticos (198). Além disso, demonstra o menor efeito citotóxico de todos os antibióticos usualmente utilizados (62) não promovendo efeitos adversos após sua aplicação local (35). Apresenta níveis de tecido elevados e níveis sistêmicos baixos. Para facilitar sua penetração no biofilme, necessita de um veículo que manterá as concentrações acima do nível crítico (que no caso da vancomicina pode ser estimado entre 200 e 500 mg/L) por um período mínimo de 72 horas (63).

Segundo Hershberger *et al.* e Van de Belt *et al.* (102,221) a vancomicina deve ser reservada para infecções causadas por microrganismos mais resistentes como bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus* resistentes à metilina, *Staphylococcus* coagulase-negativa ou *Enterococcus*. Porém, em um estudo preliminar *in vitro* foi observado que a vancomicina é pobremente liberada de espécimes de PMMA (23).

Quando suspeita da presença de uma colonização polimicrobiana potencialmente não detectada é comum realizar a monoterapia para infecções agudas com presença de bactérias Gram-positivas, e a combinação de 2 antibióticos para infecções crônicas, com sinais clínicos de febre e pus, aproveitando suas vantagens sinérgicas (83,228). Além disso, o aumento das taxas de resistência em bactérias isoladas de artroplastias infectadas, particularmente o *Staphylococcus*, fez com que os cirurgiões investigassem a utilidade das combinações de antibióticos (25).

Bertazzoni Minelli *et al.* (25) avaliaram o efeito *in vitro* dos cimentos ósseos adicionados com gentamicina, vancomicina e gentamicina associada à

vancomicina sobre o crescimento e adesão microbiana de cepas multirresistentes Gram-positivas isoladas clinicamente. Confeccionaram discos de cimento ósseo de PMMA de 10 mm de diâmetro por 1,5 mm de espessura. Gentamicina 1,9%, vancomicina 1,9% e a combinação da gentamicina com a vancomicina foram misturadas ao copolímero em forma de pó antes de misturar o monômero líquido. Foram determinados os seguintes grupos: 1- cimento adicionado com gentamicina; 2- cimento adicionado com vancomicina; 3- cimento adicionado com gentamicina + vancomicina; 4- cimento de PMMA puro (controle). Os espécimes de PMMA dos diferentes grupos foram inoculados em um caldo de Mueller-Hinton com cepas bacterianas. Após a incubação o crescimento bacteriano foi determinado por densidade óptica e subculturas. O biofilme de PMMA foi medido e as concentrações de antibióticos foram determinadas por imunoenensaio de polarização de fluorescência. Os resultados mostraram que todos os corpos de prova de todos os grupos liberaram concentrações efetivas de antibióticos. A gentamicina e a vancomicina isoladas inibiram bactérias sensíveis e intermediárias durante as primeiras 24 e 48 horas, porém as duas drogas demonstraram diferentes inibições da atividade do crescimento e adesão bacteriana considerando-se as características das cepas estudadas. Os corpos de prova de vancomicina inibiram o crescimento bacteriano e reduziram a adesão bacteriana. A atividade inibitória da gentamicina contra cepas de *Staphylococcus coagulase-negativos* resistentes à meticilina foi mantida por 24 horas, seguido de um crescimento próximo a 48 horas. Isolados clínicos de Met-R/Gent-R CoNS (Meticilina reativa e gentamicina reativa à *Staphylococcus coagulase-negativos*) não mostraram adesão a amostras carregadas de gentamicina por 24 h. Cepas com intermediária suscetibilidade à gentamicina mostraram crescimento normal após 48 horas, mas com adesão reduzida, enquanto cepas resistentes à gentamicina (Gent-R) apresentaram crescimento e adesão semelhantes às do grupo controle. O grupo que associou gentamicina com a vancomicina exerceu efeito sinérgico bactericida contra todas as cepas testadas, inclusive contra microrganismos multirresistentes Gram-positivos como o *Staphylococcus aureus* 5/7 (VRSA), um produtor de alta quantidade de biofilme. Segundo os autores o grau de adesão bacteriana ao cimento PMMA carregado com gentamicina ou vancomicina pode ser reduzido apesar de uma taxa de crescimento normal e das diferenças

encontradas entre as cepas testadas. Eles concluíram que o efeito da gentamicina e vancomicina no crescimento e adesão bacteriana ao cimento ósseo de PMMA depende das concentrações de antibióticos, das características específicas de cada cepa e de sua capacidade de produzir biofilme e aderir ao cimento ósseo de PMMA carregado com antibióticos.

Gallo *et al.* (79) avaliaram a capacidade de um cimento ósseo à base de PMMA adicionado com gentamicina-vancomicina prevenir o crescimento de *Staphylococcus in vitro*. Para isso utilizaram 4 tipos de materiais com espécimes de 1cm por 1 cm: Material I – polietileno manualmente preparado (UHMWPE); Material II – PMMA sem antibiótico (Palamed®) como controle; Material III – PMMA Palamed G® que contém gentamicina; Material IV – PMMA Palamed G® que contém gentamicina associado à 1 g de vancomicina. Observaram que o cimento ósseo de PMMA onde foi realizada a associação entre vancomicina e gentamicina promoveu uma proteção da superfície do cimento e do ambiente local de algumas espécies específicas de *Staphylococcus*. Ambos os antibióticos são ativos contra microrganismos Gram-positivos. Entretanto, a gentamicina apresenta uma incompleta cobertura sobre um terço dos MRSA isolados. Essa ineficiência é comprovada nesse estudo, onde visualizaram o crescimento de MRSA nas superfícies do cimento ósseo comercialmente produzido com gentamicina. A gentamicina apresenta uma lacuna microbiana confirmado pelo estudo de Tunney *et al.* (217) que testaram vários antibióticos *in vitro* contra 49 isolados bacterianos obtidos de implantes ortopédicos.

Van de Belt *et al.* (219) estudaram a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* em dois tipos de cimentos ósseos adicionados de gentamicina (CMW3® e Palacos R®) e a cinética de liberação da gentamicina. Foram confeccionados corpos de prova dos cimentos ósseos CMW3® e Palacos R® (com e sem 2,5 e 1,25 w/w% de gentamicina (ou 4,2 w/w% e 2,0 w/w% de sulfato de gentamicina), respectivamente na forma de discos de 200 x 40 x 3,2 mm. Os corpos de prova foram inseridos em meios contendo *Staphylococcus aureus*. Os discos foram removidos e colocados em 2 mL de fluido de transporte, RTF (NaCl 0,9g/L, (NH₄)₂ SO₄ 0,9 g/L, KH₂PO₄ 0,45 g/L, Mg₂SO₄ 0,19 g/L, K₂HPO₄ 0,45 g/L, Na₂EDTA 0,37 g/L, L-CysteineHCl 0,2 g/L, pH 6,8), agitados no vórtex e sonicados por 60 segundos. Foram realizadas várias diluições nas placas de

ágar e realizada a incubação por uma noite. Posteriormente, foi contado o número de unidades formadoras de colônia pela área de superfície do espécime (UFC/cm²). Foi calculada a porcentagem da formação de biofilme para os cimentos ósseos adicionados e não adicionados com antibiótico. Os corpos de prova foram observados em microscopia eletrônica de varredura e as taxas de liberação de gentamicina foram determinadas por imunoenensaio de polarização de fluorescência. O crescimento microbiano nos cimentos com impregnação de gentamicina ocorreu apesar da liberação do antibiótico. A formação de biofilme foi máxima para os espécimes de CMW3[®] e Palacos R[®] sem impregnação de antibiótico após 24 horas não havendo diferenças estatísticas entre ambos os cimentos ósseos ((3,4±2,6) x10⁸UFC/cm²). Poucos microrganismos foram isolados a partir dos biofilmes do cimento ósseo CMW3[®] adicionados com antibiótico se comparados com os cimentos sem antibiótico para todos os tempos de análise do estudo (24, 30, 48 e 72 horas), exceto após 6 horas. O cimento Palacos R[®] com gentamicina não mostrou quantidade menor de microrganismos infecciosos comparado ao Palacos R[®] sem gentamicina, exceto após 24 horas. A formação de biofilme no cimento CMW3[®] adicionados com gentamicina foi ¼ menor que do mesmo cimento sem antibiótico. Na microscopia eletrônica de varredura do cimento CMW3[®] com e sem gentamicina, observou-se que o cimento adicionado com gentamicina apresentou poucos *Staphylococcus aureus* quando comparada à superfície do mesmo cimento sem impregnação de gentamicina. No cimento sem gentamicina os microrganismos parecem estar cobertos de um filme viscoso formando manchas no cimento, enquanto no cimento adicionado com gentamicina, o filme viscoso está ausente e os microrganismos parecem estar conectados por fios finos e viscosos. No que se refere à liberação de gentamicina, nas primeiras horas ocorreu uma grande liberação que posteriormente diminuiu rapidamente. A quantidade total de gentamicina liberada foi maior para o CMW3[®] (79 mg) que para o Palacos R[®] (70 mg). O cimento ósseo CMW3[®] é de baixa viscosidade. A liberação de gentamicina dos cimentos de baixa viscosidade *in vitro* é a metade que dos cimentos de alta viscosidade (123), mas no presente estudo foi encontrado o contrário. Foi encontrada uma liberação média de 8,4% de gentamicina para o Palacos R[®] e de 4,7% para o CMW3[®]. A viscosidade dos cimentos ósseos influencia na porosidade. Cimentos mais porosos podem apresentar uma área

maior de eluição, porém existem outras variáveis que também podem influenciar como o tipo e a concentração dos antibióticos. Idealmente os antibióticos deveriam ser liberados dos cimentos ósseos por um tempo curto determinado e após esse tempo deveriam parar a liberação evitando concentrações subinibitórias com a finalidade de não induzir à resistência bacteriana. Os cimentos estudados no presente estudo não satisfizeram esses requisitos. O estudo mostra que a formação do biofilme infeccioso ocorre em padrões semelhantes nos cimentos ósseos de PMMA adicionados ou não por gentamicina com um número máximo de bactérias viáveis no biofilme após 24 horas. Uma vez que o biofilme atingiu certa espessura, pode haver deslocamento de partes desse biofilme da superfície do cimento ósseo podendo ser quantificados após vários dias. Os autores concluíram que cimentos ósseos adicionados com antibiótico não são necessários para inibir a formação *in vitro* de um biofilme infeccioso.

Mulazimoglu *et al.* (151) avaliaram o sinergismo da gentamicina-vancomicina em 24 pacientes com *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) isolados. Determinaram 4 grupos: 1- Controle (sem antibiótico); 2- gentamicina 3- vancomicina; 4- associação gentamicina-vancomicina. Foram utilizadas a vancomicina a 10 µg/mL e a gentamicina a 1 µg/mL. Eles determinaram as curvas do tempo de morte para ambos os antibióticos. Nove cepas demonstraram alto nível de resistência à gentamicina (500µg/mL) e 15 foram suscetíveis a essa concentração. A diluição da gentamicina em ágar foi de 0,5 a > 128µg/mL. A associação gentamicina-vancomicina não apresentou sinergismo contra as nove cepas de alta resistência à gentamicina. As outras 15 não se mostraram significativamente afetadas. Elas mostraram sinergismo contra 6 dessas cepas e indiferença para 9 delas. Não existe relação entre o grau de diluição e o não sinergismo contra as cepas com alto nível de resistência à gentamicina. Os autores concluíram que a gentamicina de >500 µg/mL induz à falta de sinergismo entre a gentamicina e a vancomicina para cepas de MRSA. Mesmo nas demais cepas o sinergismo não é previsível pela diluição da gentamicina em ágar. Portanto, o presente estudo não foi capaz de demonstrar a superioridade da associação gentamicina-vancomicina sobre a administração

isolada da gentamicina. Além disso, a associação entre esses dois antibióticos é mais nefrotóxica que a gentamicina isolada.

Anagnostakos *et al.* (6) avaliaram 28 pacientes com infecção tardia após artroplastia de quadril. O tratamento consistiu da ressecção de artroplastia com implantação de esferas com antibióticos ou de espaçadores adicionados com antibióticos. Os antibióticos utilizados no presente estudo foram 1 g de gentamicina e 4 g de vancomicina. A liberação dos agentes antibióticos foi investigada pela coleta do fluido de drenagem diariamente. A eluição dos antibióticos foi determinada por um imunoensaio de polarização de fluorescência. Antibióticos sistêmicos foram administrados de acordo com o antibiograma evitando a gentamicina e a vancomicina. Observou-se concentrações maiores de gentamicina (116(12-371) µg/mL vs vancomicina 80 (21-198) µg/mL nas esferas impregnadas com antibiótico no primeiro dia. Nos dias seguintes a concentração média de vancomicina foi sempre maior que da gentamicina. No grupo do espaçador a concentração média de vancomicina foi maior que da gentamicina em 1 dia (37 (3,3-72) µg/mL vs 21,1 (0,76-39) µg/mL e permaneceu maior durante todo o período de medição. A eluição de antibióticos decaiu constantemente em taxas similares nos dias seguintes. As últimas concentrações determinadas foram de 3,7 µg/mL após 13 dias. As esferas apresentaram maior eluição que os espaçadores devido à sua maior área de superfície. As propriedades inferiores de eluição dos espaçadores enfatiza a necessidade da administração de antibióticos sistêmicos durante o período pós-operatório. Os autores concluíram que as esferas e os espaçadores de quadril adicionados de gentamicina e vancomicina são capazes de liberar concentrações suficientes de antibióticos nos primeiros 7 a 13 dias pós-operatórios *in vivo*.

Bertazzoni *et al.* (23) avaliou espécimes de cimento de PMMA contendo a gentamicina isolada, a vancomicina isolada e a combinação de gentamicina-vancomicina. A liberação de gentamicina isoladamente, vancomicina isolada e em combinação com cimento PMMA foi rápida. A combinação revelou atividade antimicrobiana sinérgica contra *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. O teste de imunofluorescência mostrou que as taxas de liberação da gentamicina e vancomicina do cimento PMMA eram diferentes. Gentamicina isolada e em

combinação com vancomicina apresentaram taxas de liberação semelhantes (1,50%). A liberação de vancomicina dos cilindros de PMMA adicionados com a combinação foi menor (0,51%) que a dos cilindros com vancomicina isolada (1,16%). A vancomicina mostrou uma perda de 34,1% da atividade microbiológica a 37°C após 10 dias de incubação; a redução correspondeu à 15,0% quando medida pelo teste de imunofluorescência.

Alguns autores relatam que a associação da gentamicina com a vancomicina apresenta uma vantagem tripla: potencial sinérgico dos dois antibióticos contra bactérias Gram-positivas (118,202,228), a possibilidade de uma maior eluição dos antibióticos do espaçador resultante dessa combinação (24,144,171) e a possibilidade de que essa combinação de antibióticos resulte em menor risco de crescimento bacteriano no espaçador (4,25).

3.5 Espaçadores de PMMA adicionados com antibióticos

Os espaçadores podem ser classificados quanto à sua forma de confecção em três tipos: os preparados em sala cirúrgica pelo próprio cirurgião, os moldados sob medida, customizados, e os pré-fabricados. Os preparados em sala cirúrgica apresentam desvantagens em relação aos pré-fabricados devido à falta de uniformidade de mistura do antibiótico no cimento, inconsistências no desenho do espaçador, presença de uma maior porosidade e de irregularidades que podem resultar em disponibilidade imprevisível de antibiótico (155). As taxas de erradicação da infecção associadas aos espaçadores confeccionados manualmente pelo cirurgião adicionados com antibiótico são de 89 a 100%. Aspectos específicos da geometria dos espaçadores confeccionados manualmente pelo cirurgião têm sido associados a falhas e luxações, e insuficiente ancoragem do espaçador no canal medular (14,204).

Os espaçadores moldados sob medida, customizados, apresentam geometria mais consistente que os confeccionados manualmente pelo cirurgião, mas eles estão limitados aos tamanhos dos moldes. Apresentam uma taxa de erradicação da infecção de 96 a 100%. As taxas de luxação são levemente maiores e com elevada propensão a fraturas se comparados aos confeccionados manualmente pelo cirurgião (61,106,107).

A maior parte dos espaçadores moldados para o quadril, apresentam um núcleo metálico, isto é uma haste de metal com uma cobertura de PMMA associada a antibiótico (Figura 5).



Figura 4. Paciente submetido a artroplastia bilateral do quadril, evoluiu com infecção periprotética no quadril esquerdo. Realizada cirurgia em 2 tempos com a retirada da prótese e colocação do espaçador moldado pelo cirurgião no acetábulo e no fêmur.

Os espaçadores pré-fabricados possuem uma estrutura mais homogênea, financeiramente apresentam custo elevado e estão limitados aos tamanhos disponibilizados e as doses de antibióticos que são pré-determinadas pelos fabricantes. Portanto, as doses de antibióticos não podem ser adaptadas às condições infecciosas do paciente. Suas taxas de luxação variam de 0 a 16%. O controle de infecção associado a esses espaçadores excedeu 90% em vários estudos (24,170).

Buchholz & Engelbrecht (34) introduziram o conceito de terapia antibacteriana local. Eles incorporaram antibióticos nos cimentos ósseos à base de PMMA visando a redução das taxas de infecção em cirurgia ortopédica. Baseados na consideração do conhecido processo da difusão, a liberação do

monômero residual, investigaram se um ingrediente ativo poderia ser dissolvido na matriz do cimento. A adição do sulfato de gentamicina no Palacos R[®] rendeu os primeiros resultados satisfatórios. Os estudos se iniciaram nos laboratórios da Endoklinik, em Hamburgo, Alemanha, e resultaram no desenvolvimento do tipo Refobacin Palacos R[®], o primeiro cimento ósseo com antibiótico introduzido no mercado, que demonstrou a boa cooperação entre as empresas Merck & Kulzer. Segundo os autores, o antibiótico é liberado gradualmente fornecendo concentrações locais mais altas que as obtidas com terapia sistêmica.

A seleção do antibiótico correto a ser agregado aos cimentos ósseos de PMMA é de suma importância, visto que alguns antibióticos podem influenciar as ligações cruzadas das cadeias poliméricas, resultando em alterações da viscosidade após a mistura, tempo de polimerização, concentração dos antibióticos incorporados, resistência mecânica e rigidez do PMMA (225).

Henry & Galloway (101) afirmam que o PMMA adicionado de antibióticos sob a forma de esferas ou espaçadores é altamente eficaz como alternativa de tratamento ou suplemento ao tratamento antibacteriano sistêmico para terapia da infecção óssea aguda, infecção de tecidos moles adjacentes e osteomielite crônica. O tratamento local com cimentos ósseos adicionados com antibióticos permite uma liberação de alta concentração de antibióticos, evitando as elevadas concentrações sistêmicas dos medicamentos. Isso resulta em uma diminuição na ocorrência de nefro toxicidade e reações alérgicas que são problemas clínicos comumente encontrados durante o tratamento dos pacientes com osteomielite.

Bertazzoni *et al.* (24) estudaram a eluição de antibióticos em espaçadores de PMMA. Verificaram que houve uma boa eluição de gentamicina e vancomicina nas primeiras 24 horas seguida de uma liberação gradual nos dias seguintes (9 dias). A vancomicina eluiu menos que a gentamicina. Detectaram que houve uma diminuição da liberação da vancomicina quando associada à gentamicina. Segundo eles a fraca eluição da vancomicina pode depender de muitos fatores, tais como suas características físico-químicas, peso molecular, interferência nos polímeros de cimento e estabilidade do medicamento na presença de calor e fluidos biológicos, bem como a consistência diferente do próprio cimento (grau de porosidade, rugosidade, tamanho da preparação e área superficial).

Anagnostakos & Meyer (6) realizaram uma revisão sistemática com o objetivo de avaliar dados presentes na literatura sobre a eluição de antibióticos dos espaçadores quadril e joelho *in vivo*. Todas as publicações foram analisadas em relação à localização, número de implantes espaçadores, cimento usado, impregnação com antibióticos, tipo de espaçador, tempo de medição de eluição do antibiótico (após implante espaçador versus remoção de espaçador) e achados farmacocinéticos. Analisaram um total de 11 estudos, com 7 espaçadores de quadril, um de joelho e três com ambos. Analisaram 8 espaçadores feitos pelo cirurgião e 3 pré-fabricados. Todos os estudos determinaram a eluição por meio do fluido coletado por um dreno. O período de avaliação foi de 24 horas a 7 dias de pós-operatório após a implantação do espaçador. Os maiores valores de eluição foram encontrados em um estudo onde a vancomicina e o aztreonam foram incorporados a 40 g de cimento ósseo com valores iniciais de 1,000 µg/mL. Nos estudos onde a vancomicina foi associada à gentamicina, houve algumas discrepâncias considerando-se a altura das concentrações. Anagnostakos *et al.* (3) determinaram concentrações máximas de 39 µg/mL para gentamicina e 72µg/mL para vancomicina quando 1 g de gentamicina e 4 g de vancomicina foram adicionadas a 80 g de cimento para produção do espaçador. Hsieh *et al.* (111) relataram níveis de gentamicina de 58,3 µg/L e de vancomicina de 485,5 µg/L no primeiro dia quando a gentamicina líquida foi misturada à vancomicina pó (480 mg de gentamicina e 3 g de vancomicina para 40 g de cimento). As concentrações de todos os estudos foram além das concentrações inibitórias mínimas das bactérias causadoras. A eluição após a remoção do espaçador foi avaliada no líquido da articulação (3 estudos) e no tecido local (1 estudo). Não foram encontradas diferenças significativas entre espaçadores de joelho e quadril e nem entre a implantação do componente acetabular e da haste. Segundo os autores, existe a possibilidade de que a elevada eluição dos antibióticos possa causar uma rápida saturação do tecido circundante. Os autores concluíram que dados da literatura indicam suficiente eluição dos antibióticos após a implantação dos espaçadores e após sua remoção.

Anagnostakos & Klem (5) afirmaram que inúmeros fatores podem influenciar na cinética de liberação dos antibióticos do cimento ósseo como o tipo

e proporção dos antibióticos, a quantidade de antibióticos, o tipo e porosidade do cimento ósseo, as características de superfície, a maneira como o cimento é preparado e as circunstâncias do meio.

Segundo Bertazzoni *et al.* (24) além das características dos cimentos e dos antibióticos, outros fatores como a dinâmica do fluxo de fluídos, a capacidade de absorção dos tecidos, a mobilidade dos membros e outros podem influenciar na liberação dos antibióticos do cimento de PMMA e contribuir para a ampla gama de antibióticos residuais registrados em diferentes pacientes.

Rasyid *et al.* (179) demonstraram que outra possibilidade de aumentar a capacidade de liberação de antibióticos dos espaçadores de cimentos ósseos é aumentar a capacidade de dissolução por meio da adição de cargas poliméricas como o xilitol e a glicina e utilizando substâncias altamente solúveis em água.

Segundo Hsieh *et al.* e Marsi *et al.* (110,144) os espaçadores de cimento adicionados com antibióticos podem manter seus níveis de antibióticos efetivos contra a infecção por um período de até 4 meses após a artroplastia de ressecção e manutenção dos espaçadores.

3.6 Métodos laboratoriais

3.6.1 Exame de Cultura

Cultura celular é um método desenvolvido para estudar o comportamento das células animais em meio ambiente controlado. O cultivo de células iniciou-se no século XX com Harisson em 1907 (96) e Carrel em 1912 (36).

Na investigação da infecção periprotética as culturas celulares têm sido frequentemente utilizadas com o intuito de determinar os microrganismos presentes no líquido sinovial, por meio da punção percutânea, ou de fragmentos de partes moles e ósseas coletados durante o ato cirúrgico da revisão, ou dos explantes levados à sonicação. Dentre os métodos de cultura citados, a cultura do líquido submetido à sonicação do implante removido é a que apresenta maior sensibilidade (90,4%) conforme descrito na revisão de literatura do presente trabalho (232).

3.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A principal função de um microscópio é tornar visível ao olho humano o que o mesmo não consegue reconhecer. O microscópio óptico convencional fornece um aumento de até 2000 vezes, entretanto o MEV pode chegar a 300.000 vezes (47).

O microscópio eletrônico de varredura tem como método físico de funcionamento, a utilização de um feixe de elétrons no lugar de fótons, utilizados nos microscópios ópticos tradicionais. O comprimento de onda de um elétron pode ser aumentado sob uma voltagem igual ou acima de 50KV. Com isso potencializa a fonte de iluminação e os elétrons podem ser focalizados por campos eletrostáticos de varredura, formando imagens ponto a ponto (29).

Com esta técnica permite-se ampliações de materiais sólidos, conservando a profundidade de campo e das superfícies rugosas, com resolução de 1 nm. Outra característica importante é a aparência tridimensional da imagem das amostras (154).

Atualmente os modernos microscópios eletrônicos de varredura são digitais, e são utilizados além de pesquisas, em inspeções de produção em série, e de controle de qualidade de muitos produtos (154).

3.6.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As técnicas de espectroscopia são utilizadas para avaliar uma ampla variedade de propriedades de espectros da estrutura química de sólidos, líquidos ou gases. Na espectroscopia no infravermelho, um feixe de luz monocromática é emitido sobre uma amostra, a quantidade de luz absorvida ou emitida da estrutura analisada cria um comprimento de onda diferente. Obtém-se então um espectro no infravermelho de um comprimento de onda específico para cada substância analisada (26).

Na espectroscopia por transformada de Fourier, um feixe de luz composto de largo espectro é emitido ao mesmo tempo, várias vezes e em um curto espaço de tempo. Essas frequências são absorvidas pelas estruturas analisadas e,

geram vários espectros de comprimentos de onda, que são calculadas através de um algoritmo chamado transformação de Fourier, por um programa de computador, que fornece resultados mais rápidos das estruturas químicas analisadas, isoladas ou principalmente combinadas (28).

O exame de FTIR, auxilia na detecção das estruturas químicas pertencentes a cada, sólido, líquido ou gás analisados. Este teste é muito utilizado no controle de qualidade dos elementos químicos dos medicamentos (223).

3.6.4 Ensaio de *Checkerboard*

Checkerboard é a técnica mais utilizada para avaliar combinações antimicrobianas *in vitro* (140,178). Esse teste é de fácil interpretação envolvendo cálculos e resultados simples, além de requerer materiais comumente disponíveis em laboratórios de microbiologia (140).

O termo *checkerboard* se refere ao padrão de diluição dos antibióticos distribuídos na placa de microtitulação, como se fosse um tabuleiro de xadrez. Na vertical cada poço contém uma diferente concentração diluída do antibiótico A de forma decrescente. Na horizontal é adicionado um segundo antibiótico B em cada poço da microplaca, da esquerda para a direita de forma crescente (140). Portanto, cada poço apresenta concentrações diferentes de cada um dos dois antibióticos testados em um mesmo volume final (54) (Figura 5).

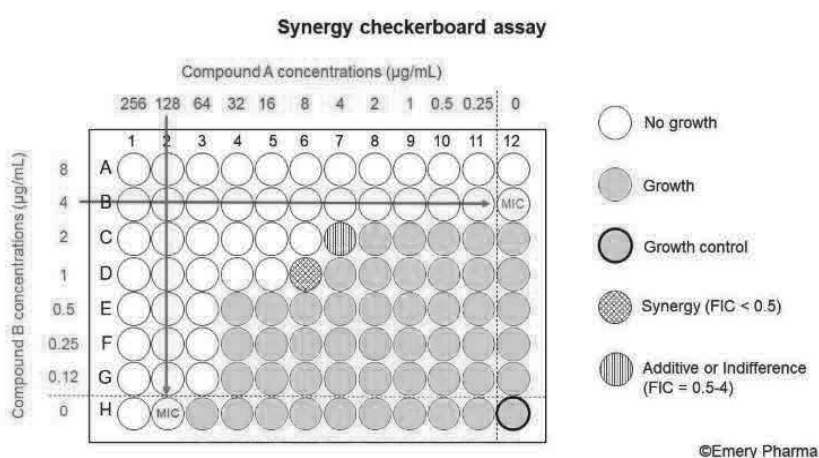


Figura 5. Esquema didático do teste de Checkerboard. Retrata-se nesse esquema o sinergismo típico do teste de *checkerboard*. As colunas de 1 a 11 contêm duas vezes diluições em série do componente A. As linhas de A a G contêm duas vezes

as diluições em série do componente B. A coluna 12 contém a diluição em série do componente B sozinho, enquanto que a linha H contém a diluição em série do componente A sozinho. Esses controles são utilizados para determinar o valor da MIC para cada componente do teste, onde por sua vez, são usados para calcular o valor de FIC por meio da fórmula abaixo descrita e depois determinar se houve sinergismo, adição/indiferença ou antagonismo. Nessa ilustração “no growth” que significa que não houve nenhum crescimento é representado por círculos brancos e “growth” que significa crescimento é representado por círculos amarelos. O controle do crescimento (H12) é representado por um círculo amarelo com contorno preto forte. As concentrações dos componentes A e B (D6) resultaram em um efeito sinérgico ($FIC < 0,5$), enquanto que em C7 o efeito foi aditivo ou indiferente ($FIC = 0,5-4$).

Fonte: Lorian V. Antimicrobial combinations in antibiotics in laboratory medicine. 5 ed. 2005. Capítulo 9. 365-441 (141).

As concentrações testadas para cada antimicrobiano são de quatro ou cinco diluições abaixo da concentração inibitória mínima (CIM), usando dois quartos de diluições de cada antimicrobiano (140).

A determinação da CIM pelo método *Checkerboard* é frequentemente seguida por uma análise adicional, utilizando o índice não paramétrico de concentração inibitória fracional (FIC), ou o modelo de resposta de superfície totalmente paramétrico (RSM) (150).

A maioria dos estudos que investigam a eficácia *in vitro* de agentes antimicrobianos interpretam os resultados através da concentração inibitória fracionada (FIC), e é calculada pelas seguintes fórmulas:

$FIC \text{ do composto A (FICA)} = \text{CIM do composto A em combinação} / \text{CIM do composto A independente}$; $FIC \text{ do composto B (FICB)} = \text{CIM do composto B em combinação} / \text{CIM do composto B independente}$. A soma dos FICs de dois compostos em combinação é calculada pelo $FICA + FICB = FIC$.

O sinergismo pode ser definido para FIC menor ou igual a 0,5, aditividade com FIC entre 0,5 e 4,0 e antagonismo para FIC maior que 4 (166,99). A determinação do FIC é o método de escolha para análise de interações fármaco-fármaco pelos laboratórios clínicos, pela facilidade de uso, simplicidade e viabilidade em seu desempenho.

Como vantagem esse experimento permite testar várias combinações de diferentes concentrações de dois antibióticos para uma mesma amostra, além de utilizar pequenas quantidades de cada droga testada. Como limitação, o *checkerboard* é capaz apenas de identificar a atividade inibitória ou sinérgica e não a atividade bactericida (140).

3.6.5 Ensaio da Viabilidade do Biofilme por Imunofluorescência (*live/dead biofilm viability kit*)

O teste *live/dead BacLight™* determina a viabilidade celular bacteriana. Esses testes são baseados em fluorescência. Eles são realizados em minutos, não requerem etapas de lavagem e podem ser aplicados em bactérias em suspensão ou presas em filtros. Os kits do teste são adequados para utilização em microscopia de fluorescência ou em ensaios quantitativos utilizando um leitor de microplacas de fluorescência, citômetro de fluxo ou fluorômetro (22,72,128,62). Esse teste emprega duas manchas de ácido nucléico: verde fluorescente SYTO e coloração com iodeto de propídio vermelho-fluorescente. Essas manchas diferem na sua capacidade de penetrar em células bacterianas saudáveis. Quando usada sozinha, a mancha SYTO® 9 rotula bactérias vivas e mortas. Em contraste, o iodeto de propídio penetra apenas bactérias com danos membranas, reduzindo a fluorescência SYTO® 9 quando ambos os corantes estão presentes. Assim, bactérias vivas com membranas intactas fluorescem verde, enquanto bactérias mortas com membranas danificadas fluorescem vermelho. Bactérias vivas e mortas podem ser vistas separadamente ou simultaneamente por microscopia de fluorescência com conjuntos de filtros ópticos adequados. O óleo de montagem é fornecido para visualização bactérias nas membranas dos filtros. O ensaio *BacLight™* tem sido utilizado para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, micoplasmas, leveduras, biofilmes e protozoários (72).

4. Artigo submetido para publicação

Title:

Different concentrations of vancomycin and gentamycin added in the experimental model of PMMA to inhibit a formation of staphyocococcus aureus biofilm

Running title:

Biofilm and PMMA implications

Authors:

Marco Antonio Pedroni (1); Juliette Cieslinski* (1); Victoria Stadler Tasca Ribeiro* (1); Ana Paula de Andrade (1); Leticia Kraft (1); Paula Hansen Suss (1); Felipe Francisco Tuon* (1)

(1) Laboratory of Emerging Infectious Diseases, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil, 80215-901

* Felipe Francisco Tuon, Juliette Cieslinski and Victoria Stadler Tasca Ribeiro should be considered the joint first author.

***Corresponding author:**

Felipe F. Tuon
Escola de Medicina – Pontifícia Universidade Católica do Paraná
R. Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho, Curitiba - PR, Brazil
ZIPCode 80215-901
Telephone: +55 (41) 3271-1515
E-mail: felipe.tuon@pucpr.br

ABSTRACT

Background: *Bone cement polymethylmethacrylate (PMMA) based, when impregnated with antibiotics, is widely used in the associated treatment of osteomyelitis with bone loss and as a joint spacer in periprosthetic infections. Considered to be a serious complication in arthroplasty surgeries, especially those of the hip, periprosthetic infection has a difficult and complex diagnosis and treatment. It is associated with the fact that the microorganisms found, usually Staphylococcus aureus, can induce the formation of biofilm and generate resistance, which prevents or hinders the diagnosis and the systemic action of antibiotics. One of the treatment options for these periprosthetic infections is two-stage prosthesis revision surgery. In this treatment technique, after removing the infected implants, a PMMA spacer impregnated with antibiotics is made, which is implanted in the place where the prosthesis was, to aid in the local treatment of the infection. However, dosages, amounts and types of antibiotics added to these spacers are quite controversial.*

Objective: *The objective of the present study is to evaluate the influence of different concentrations of vancomycin and gentamicin added in experimental models of bone cement based on PMMA to inhibit the formation of Staphylococcus aureus biofilm, in vitro.*

Method: *Experimental models of bone cement (PMMA) in cubic form (10x10mm), with the addition of powder vancomycin and gentamicin, were made using silicone molds. Eight study groups were determined at different concentrations of antibiotics: C- control group: without antibiotics; G- 500mg of gentamicin; V1- 1g vancomycin; V2- 2g of vancomycin; V4- 4g of vancomycin; V1G- 1g vancomycin and 500mg gentamicin; V2G- 2g vancomycin and 500mg gentamicin; V4G- 4g of vancomycin and 500mg of gentamicin. Strains of staphylococcus aureus ATCC®25923 were used to form the biofilm in vitro. For the quantitative analysis of the biofilm, the counts of sessile cells were performed. The same for planktonic cells. Scanning Electron Microscopy (SEM) was performed for qualitative evaluation of the biofilm. The viability of the biofilm was analyzed using a dead / alive kit whose reading was performed by fluorescence microscopy. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was performed to analyze the influence on the chemical structure of the associated antibiotics and PMMA. The*

Checkerboard test was used to assess the synergism or antagonism of vancomycin and gentamicin.

Results: *The absence of planktonic bacteria was detected for all groups, except for the control group, V1 and V2. Only groups containing gentamicin alone or combined with vancomycin effectively inhibited the growth of sessile bacteria. In SEM, the presence of biofilm in groups G, V1, V4 and V1G was observed, however, V1G group did not show cell viability. The V2 group also showed cell viability, although, in SEM, the presence of biofilm was not observed in the analyzed qualitative sample. The V2G group, under fluorescence microscopy, presented cells, however dead. The V4G group did not show biofilm or cellularity in any of the tests performed. Considering the FTIR analyzes, no chemical differences were observed in the polymers added with the different concentrations as well as in the characteristics of the antibiotics used. Finally, the synergistic effect between vancomycin and gentamicin in different concentrations was observed by the Checkerboard test.*

Conclusion: *Association of antibiotics vancomycin 4g + gentamicin 500 mg added to the experimental PMMA models of the study, showed synergistic effects, and inhibited the formation of Staphylococcus aureus biofilm.*

Keywords: *infection, periarticular infection, polymethylmethacrylate, gentamicin, vancomycin, biofilm, Staphylococcus aureus-*

INTRODUCTION

The periprosthetic infection is one of the most feared, serious and difficult to treat complications after arthroplasty surgeries [1,2]. It is associated with greater morbidity and reduced life quality for the patient, it can progress to the permanent loss of implants or implanted limb, due to chronic and incurable infection, or even death due to septicemia [1,3,4,5]. It has an important economic impact for the health systems, due to exacerbated expenses with long and costly treatment periods, and for society, due to the removal of affected patients, from their productive work activities [3,6,7].

Gram positive bacteria are prevalent in infections of joint prostheses, especially *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, but contamination caused by Gram-negative bacilli and fungi such as *Candida* sp has been reported more frequently worldwide [8]. In hip arthroplasties, one of the most common bacteria found in infections is *Staphylococcus aureus* [3,8,9]. This microorganism is characterized by the formation of biofilm, communities of bacteria, which gives it protection against aggressive agents, such as the patient's immune system and antibiotics [10,11,12]. This protection of sessile bacterial cells by the biofilm also makes it difficult to identify the microorganism for its correct diagnosis in the exams, mainly of culture [13,14].

In periprosthetic infection, the diagnosis may be underestimated or difficult to perform, especially in periprosthetic infections considered acute [15,16,17]. In chronic cases of infection, with evidence of loosening of the implants, with active fistulas and or other clinical manifestations, the diagnosis becomes more evident [3,4,16].

Imaging tests, radiographs and scintigraphy, and laboratory blood tests, for example; blood count, C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) are the most used as a diagnostic aid for periprosthetic infections [3,4,16]. The test that confirms the diagnosis and identifies the infectious agent is the culture (82).

The material to be sent for culture examination may be liquid or periprosthetic secretions, collected through joint puncture or fragments of soft and bone parts, collected during surgical debridement [4].

A large majority of microorganisms not identified in traditional cultures, shows high resistance to antibiotics and often lead to the recurrence of infections [18]. In cases of difficult diagnosis due to the presence of biofilm, the explanted infected prosthesis, synthesis materials or fragments of cement, removed during surgery, may or may not be taken to sonication, a method that increases the probabilities of diagnosis of microorganisms by culture, due to disruption of the biofilm without harming sessile cells [15,19].

In order to avoid the devastating complications of periprosthetic infection, there are controversial treatment indications, such as suppressive, with the maintenance of implants and the use of systemic antibiotics, and the one- or two-stage revisions of all implanted material [20-23]. The single-time prosthetic review consists of removing the infected implants, debridement and surgical cleaning of the site and placing the new implant in the same surgical procedure [4,10,24,25].

The two-stage surgery consists, in the first, of removing the infected implant, associated with debridement, surgical cleaning and placing a joint spacer of polymethylmethacrylate bone cement (PMMA), impregnated with antibiotics [26]. The spacer helps to fight systemic infection, because it releases antibiotics in the surgical area, fills the dead space created by the removal of implants and maintains the shape and mechanical spacing of the joint [27,28]. After weeks or even months of treatment, with the patient's clinical improvement and confirmed by laboratory tests, the second surgical procedure consists of removing the spacer and replacing the prosthetic implant [27,29].

The most used antibiotics in the spacers are gentamicin and or vancomycin isolated in powder form as they have a known and effective effect against Gram negative and positive bacteria and are able to withstand the high temperatures of the exothermic phase of the

polymerization of the cement without losing its bactericidal effects [30]. The isolated doses of antibiotics added to PMMA vary widely in the literature [31-34]. Gentamicin ranges from 500mg to 5g and vancomycin from 3 to 9g [35].

There are several studies in the literature [33,36-39] that evaluate the action of different concentrations of antibiotics, added to orthopedic cements. The vast majority compares the local antibacterial action of a single type of antibiotic added to PMMA, with mechanical tests of strength of the impregnated cement.

However, there are few studies [40] on types and dosages of associated antibiotics, added to PMMA, to inhibit the formation of biofilm on the cement surface, comparing whether antibiotics have a synergistic effect on antibacterial actions [27,41] and do not interfere with the chemical properties of the cement and antibiotics after the polymerization reaction of these combinations.

METHODS

Antibiotic-loaded PMMA production

Eight groups of specimens were developed. In the first group, 1g of vancomycin (V1) (ABL, Cosmópolis, Brazil) was blended with 40g of the powder of a commercially available PMMA bone cement brand (Biomecnica, São Paulo, Brazil), after which the blended powder mixture was manually mixed with the cement liquid (20mL). The fresh PMMA was delivered into molds to produce 1mm cubic test specimens (1cm³). The other two groups were included, 2g (V2) and 4g (V4) of vancomycin with PMMA. We also included three groups using the combination of 500mg of gentamicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) with vancomycin 1g (V1G), 2g (V2G), and 4g (V4G). We included one group

with gentamicin (500mg) alone (G) and another control group only with PMMA (C - control). For each group, six specimens were used for microbiological tests, one for qualitative analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM), one for qualitative biofilm viability (LIVE/DEAD[®] assay), ten for biomechanical tests, and one for infrared spectroscopy assays.

Biofilm production

For biofilm production, we used a protocol previously described [42]. Briefly, a strain of *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923 was reactivated in nutrient agar and incubated for 24 hours at 37°C. An isolated colony of this microorganism was dissolved in TSB (tryptic soy broth) (Laborclin, Pinhais, Brazil) and incubated for 24 hours at 37°C. Then, the treated broth was centrifuged for 5 minutes at 207×g. The supernatant was discharged, and the obtained pellet was washed three times with sterile 0.9% NaCl. In the last wash step, the pellet was dissolved in a new TSB broth to obtain a bacterial suspension prepared to match the turbidity of the 0.5 McFarland turbidity standard, using a nephelometer (Alfakit, Florianópolis, Brazil). From this suspension, a 1:10 dilution was made in TSB until concentrations of 10⁷ CFU/mL of bacteria were achieved. Ten mL of TSB were poured into sterile 6-well plates until it covered the PMMA specimens of each group (one specimen per well) for 2 hours so that cells could adequately adhere. The specimens were transferred to a new sterile 6-well plate containing 0.9% NaCl in order to remove planktonic cells from the material. After this, specimens were transferred to another sterile 6-well plate and submerged in 10 mL of TSB at 37°C for 24 hours. During this step, the cells adhered to the device surface formed the biofilm. After this step, the culture medium was aspirated, and the specimens were submerged into 0.9% NaCl in order to

remove the residues and unadhered cells. After this washing step, the PMMA specimens were stored into 15 mL conical tubes (Alfa Hospitalar[®], São Paulo, Brazil) for further processing and the liquid of the last washing stored for planktonic cells analysis.

Quantitative analysis of planktonic cells from the biofilm

The liquid of the last washing of the specimens with biofilm (100uL) of each group was plated on tryptic soy agar (TSA) (Laborclin, Pinhais, Brazil) and the quantification was performed by colony counts (CFU/mL) [43].

Quantitative analysis of sessile cells from the biofilm

Six specimens of each group were transferred to sterile conical tubes with 10 mL of 0.9% NaCl and sonicated for 5 minutes in an ultrasonic bath using a Soniclean 15 (Sanders Medical, Santa Rita do Sapucaí, Brazil) at a frequency of 40 kHz and temperature of 35°C [44]. After the sonication step, the liquid (100uL) was inoculated in TSA for growth evaluation and colony count (CFU/mL) after the detachment of the biofilm and specimens of each group.

Scanning Electron Microscopy

For qualitative SEM visualization, the specimens of each group and previous to inoculum (without contamination), after biofilm attachment and after sonication was transferred into sterile glass Petri dishes filled with the primary fixative agent (0.68g sucrose, 0.42 g sodium cacodylate, 0.6 mL 30% glutaraldehyde) (Merck, Darmstadt, Germany) and 19.4

mL of deionized water in sufficient quantity to cover the specimen for 45 minutes. After that, the specimens were transferred to a buffer (composed of sucrose and sodium cacodylate at the above concentrations) for 10 minutes. The samples were dehydrated in alcohol in a series of increasing concentrations: ethanol 35%, ethanol 50%, ethanol 70%, ethanol 100%, and HMDS 100% (hexamethyldisilazane) (Merck, Darmstadt, Germany) for 10 minutes in each step. After the fixation step, the models were metalized with gold particles in metalizing equipment with a Q150R ES rotary pump (Quorum Technologies, Lewes, UK), and later fixed in a metal base for observation under SEM, which was a PentaFET Precision (Oxford Instruments, Abingdon, UK) at 5.0 kV. Observations were made with magnifications between 20 and 3.000×.

LIVE/DEAD® Biofilm viability assay

One specimen of each group (V1, V2, V4, V1G, V2G, V4G, G, and C) was allocated into sterile 24-well plates with a previous 13mm rounded glass coverslip (Sarstedt, Newton, NC, USA) on the bottom of each well. Then, concomitantly, the biofilm production protocol was carried. Also, PMMA specimens were used for positive and negative controls in parallel. After the incubation period, the TSB and the specimens were discharged, and the coverslips with biofilm were stained with FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability kit (Molecular Probes, Life Technologies Ltd., Paisley, UK), aiming to determine the viability of bacteria within the biofilm and antibiotic action after treatment. Moreover, positive control was made using a PMMA specimen without antibiotics, while negative control was made using a PMMA specimen without antibiotics in addition to a washing step treatment with 70% ethanol. All the groups' coverslips were immediately conducted to a fluorescence microscope (Zeiss Scope. A1; Carl Zeiss,

Oberkochen, Germany). All the specimen's samples were stained and treated following the kit protocol, using 480/500nm excitation/emission for SYTO[®]9 and 490/635nm excitation/emission for propidium iodide.

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

FTIR was used to characterize the PMMA and compare the spectrum among groups of PMMA loaded with the different antibiotic concentrations. One specimen of each group was analyzed Fourier transform infrared spectroscopy (Spotlight 200i FTIR Microscope System, Perkin Elmer, Akron, OH). The samples were scanned between 650 and 4.000 cm^{-1} , and spectra of averaging five scans were obtained [45].

Checkerboard of vancomycin and gentamicin assay for synergism

Checkerboard was performed in triplicate, aiming to evaluate the synergetic or antagonistic activity of vancomycin and gentamicin in different concentrations in *S. aureus* ATCC 25923[®]. We followed a protocol established previously, using a 96-well microplate U-bottom [46]. Firstly, vancomycin and gentamicin were reconstituted and diluted into different concentrations, which were 0.125 to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for vancomycin and 0.125 to 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for gentamicin. One hundred μL of Mueller-Hinton adjusted cation was added in each well, followed by the different concentrations of the antibiotics. Then, 5 μL of a 10^7 CFU/mL fresh suspension of *S. aureus* was added to each well, and then incubated for 24h. In parallel, negative control (without *S. aureus* inoculum, confirming broth sterility) and positive control (without any antibiotic, promoting *S. aureus* growth)

were performed. The minimal inhibitory concentration (MIC) was also performed in parallel to confirm vancomycin and gentamicin values [47].

Synergy measurement by checkerboard analysis is represented as the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index value. The FIC index value considers the combination of antibiotics that produces the greatest change from the single antibiotic's MIC. To quantify the interactions between gentamicin and vancomycin (the FIC index), the following equation is used: $(A/MIC_A) + (B/MIC_B) = FIC_A + FIC_B = FIC \text{ Index}$. Where A and B are the MIC of each antibiotic in combination (in a single well), and MIC_A and MIC_B are the MIC of each drug individually. The FIC index value is then used to categorize the interaction of the two antibiotics tested: a) synergy: when the combination of compounds results in an FIC value of <0.5 ; b) additive or indifference: when the combination of compounds results in an FIC value of $0.5 - 4$ and; c) antagonism: when the combination of compounds results in an FIC value of >4 .

Statistical analysis

The SEM and biofilm viability assay data are qualitative and descriptive. For the comparison of the different sonication methods, the median CFU/mL were analyzed by non-parametric Mann Whitney test and presented with interquartile 25% to 75% range (IQR). The difference in CFU/mL was significant when $p < 0.05$. The data was calculated, analyzed, and plotted using Prism 7.0 (Graphpad, San Diego, CA).

RESULTS

Quantitative analysis of planktonic cells from the biofilm

The count of planktonic bacterial cells in the wells with raw PMMA showed a high number of CFU, with a median of 5.1×10^{10} CFU/mL (IQR 2×10^{10} - 7×10^{10}). All loaded-PMMA presented a reduction in the number of CFU ($p < 0.05$). Planktonic cells were absent in all groups except V1 and V2. The V1 presented 35 CFU/mL (IQR 8 -59) and V2 50 CFU/mL (IQR 14-366). (Figure 1A).

Quantitative analysis of sessile cells from the biofilm

The count of sessile bacterial cells in the wells evaluates only the viable cells inside the biofilm matrix. The vancomycin loaded PMMA was insufficient to inhibit the growth of sessile cells, even with 4g. The gentamycin loaded-PMMA inhibits the growth of sessile cells, independent of the vancomycin concentration ($p < 0,001$). Raw and vancomycin (V1, V2, V4) loaded PMMA showed a lower number of CFU in comparison with planktonic cells, with a median of 182CFU/mL (IQR 125-287), 65CFU/mL (IQR 37-281), 1952CFU/mL (IQR 1693-2654), and 7CFU/mL (IQR 3-21), respectively (Figure 1B).

Scanning Electron Microscopy

SEM (20x) showed different surface characteristics according to antibiotic concentration (Figure 2). V4 showed an intense porosity, increasing surface area, and roughness. The

combination V4G presented an extremely rough surface, increasing the possibility of biofilm when compared with raw PMMA, as well as other groups with a lower concentration of vancomycin and gentamicin (V1, V2, V1G). The surface of the V2G was similar to V4G.

We evaluated the biofilm aspect with SEM (magnification of 3.000x, figure 3). The biofilm was evident in raw PMMA, and in V1, V4, G, and V1G, while V2, V2G, and V4G did not show biofilm structure. Moreover, PMMA surface details were more evident, such as bubbles and grainy compounds.

LIVE/DEAD[®] Biofilm viability assay

The SEM method evaluates the biofilm, but it is unable to determine if there are live cells. The viability assay demonstrated that biofilm was present and viable in the PMMA without antibiotics, G, V1, and V2. In the group V1G, the biofilm was not viable. In V4, V2G and V4G, there are few cells, suggesting the presence of a small amount of biofilm, however, stained in red, which suggests that the cells are dead and/or non-viable (Figure 4).

Fourier-transform infrared spectroscopy

The FTIR spectra (Figure 5) showed no significant differences between raw PMMA and PMMA-loaded with antibiotics since both polymers present similar absorption bands. The spectrum profiles of antibiotics into PMMA were superimposable with respect to the main absorptions' peaks.

Checkerboard of vancomycin and gentamicin

The FIC value was <0.5 . The checkerboard results evaluating the synergism between vancomycin and gentamicin in different concentrations showed that the combination of these two drugs does not allow *S. aureus* ATCC 25923 growth in all concentrations tested, indicating that these drugs combined in different concentrations, including the ones used in PMMA, have a synergistic effect against *S. aureus*, since this strain does not demonstrate resistance for the antibiotics tested.

DISCUSSION

Complications, high morbidity and costs are associated with osteomyelitis, medical devices, surfaces and prosthetic infections [44], in which microorganisms associated with biofilm are the main cause [48,49]. In addition, it is essential to highlight that biofilms are formed in a situation in which microorganisms adhere irreversibly to the surface, producing extracellular polymers and forming a structural matrix [10]. Biofilm-related infections are also resistant to conventional antibiotic treatments [50]. In addition, an important role is played by the biofilm structure in the pathogenesis of these infections, since the biofilm protects microorganisms against the host's immune system and also impairs the detection of adherent microorganisms, which can lead to a failure in the diagnosis of infection [51,52].

Vancomycin-loaded PMMA is commonly used and vancomycin concentrations vary between 1g and 4g per 40g of PMMA. In our study, vancomycin was not sufficient to prevent biofilm formation. However, immunofluorescence showed a biofilm with no activity. SEM confirmed this. The literature on this subject often describes new methods for administering antibiotics, especially vancomycin, but it is scarce to assess the more frequent use of antibiotic-

loaded PMMA. In general, these new methods of antibiotic release have excellent results, avoiding formation with the eradication of biofilms [53-55].

Gentamicin isolated in PMMA has been associated with bacterial growth and biofilm formation [38]. Other authors also state that the incorporation of gentamicin in PMMA cement has no statistically significant effect on the formation of *Staphylococcus aureus* biofilm [56]. However, we have shown that the association of gentamicin with vancomycin was associated with inhibition of biofilm formation. Other studies using a semi-quantitative classification also found that a combination of vancomycin and gentamicin was important for the eradication of biofilm [27].

Vancomycin and gentamicin are drugs with weak activity against biofilm compared to other drugs [57]. However, we evaluated a new biofilm with 24 hours of evolution, which has different dynamics than a thicker and more mature biofilm, where bacteriostatic drugs that act on cellular activity are important, such as rifampicin and tetracyclines [58]. These drugs, such as rifampicin, can be combined with potent bactericidal drugs, such as vancomycin, in PMMA [59]. However, another study showed a positive impact of vancomycin on sessile cells [60]. In summary, the combination of antibiotics is, in general, superior to a single drug, and the combination of drugs with direct activity against biofilm is essential in the association [61]. A different model of biofilm assessment (static and dynamic) is important to support these statements [62].

The appearance of biofilm in vancomycin combined with gentamicin-loaded PMMA was different according to the dose of vancomycin. In the V1G group, the biofilm was formed; however, sessile cells died, as demonstrated in immunofluorescence, SEM and microbiological methods. In SEM, there were colonies of bacteria; however, this may be associated with a sample or the presence of an intact cell wall with no activity. In this case, the culture was negative in all samples. In the V2G and V4G groups, there were few dead cells in the biofilm. These data corroborate that the dose of vancomycin combined with gentamicin is essential to avoid the formation of biofilm in PMMA impregnated with antibiotics.

Several antibiotic-impregnated PMMAs have concentrations above the breakpoint sensitivity concentrations, a useless impregnation. However, vancomycin and gentamicin have high concentrations for several days [27]. Considering this aspect, it is possible that even lower doses of vancomycin may be effective due to the longer contact time of antibiotics with the biofilm, because we only evaluated a 24-hour model. In addition, the immune system is an essential factor to help eliminate biofilm from implanted materials [63,64].

In our study, it was observed that the combination of vancomycin / gentamicin in different concentrations demonstrated a synergistic effect against *S. aureus* in the formation of biofilm, especially when using the concentration of vancomycin 4g plus gentamicin 500mg. In a previous study, the gentamicin-glycopeptide combination showed a synergistic effect on gentamicin release, but not vancomycin, suggesting that the combination of antibiotics in impregnated hip spacers proved to be superior to monobiotics [65]. In addition, Minelli et al. suggest that the effect of gentamicin and vancomycin on bacterial growth and adherence to PMMA is strongly linked to the concentration of antibiotics and the characteristics of each microorganism in the production of biofilm and adherence to PMMA [41].

However, vancomycin elution was superior to gentamicin. In vivo antibiotic concentrations were lower than in vitro. Regardless of the duration of the implant, growth inhibition by in vitro spacers was observed for two weeks [66]. The challenge of increasing the concentration of antibiotics is to avoid a significant loss of biomechanical characteristics. Studies have shown that the addition of high doses of vancomycin decreased the mechanical properties of PMMA cement [67].

This study has several limitations, as it is an in vitro model with only one strain of *S. aureus*. Synergism can vary according to bacterial strains, biofilm production and according to environmental conditions. The biofilm model in our study is static, and a dynamic model can present different results considering the time of exposure to antibiotics. However, most trials of these combinations were performed in vitro on planktonic bacteria exposed to constant concentrations of antibiotics for only 24 hours, and the synergistic effects obtained under these

conditions do not necessarily predict the behavior of chronic clinical infections associated with biofilms [68].

In conclusion, the effects against adhesion and bacterial development in PMMA loaded with vancomycin and gentamicin were observed mainly in the group using the concentrations of vancomycin 4g + gentamicin 500mg. The synergistic effect of vancomycin and gentamicin can also be applied with antibiotic-loaded cement.

The authors suggest future studies to assess the influence of the different concentrations of gentamicin and vancomycin isolated and combined found on the porosity, surface roughness and mechanical properties of PMMA bone cements and to compare their clinical efficacy in animal studies.

FUNDING

None.

CONFLICTS OF INTEREST

Felipe Tuon is a CNPq researcher.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Professor Paulo Soares and Evandro Martinho for helping us with SEM analysis.

REFERENCES

- [1]. An YH, Friedman RJ. Prevention of sepsis in total joint arthroplasty. *J Hosp Infect.* 1996; 33:93-108.
- [2]. Grammatopoulos G, Bolduc M-E, Atkins BL, Kendrick BJL, McLardy-Smith P, Murray DW *et al.* Functional outcome of debridement, antibiotics and implant retention in periprosthetic joint infection involving the hip. A case control study. *Bone Joint J.* 2017; 99B(5):614-22.
- [3]. Gomes LSM. Diagnóstico precoce da infecção articular periprotética do quadril – situação atual, avanços e perspectivas. *Rev Bras Ortop.* 2019; 54:368-76.
- [4]. Lima ALLM, Oliveira PRD. Atualização em infecções em próteses articulares. *Rev Bras Ortop.* 2010; 45(6):520-3.
- [5]. Schmalzried TP, Amstutz HC, Au MK, Dorey FJ. Etiology of deep sepsis in total hip arthroplasty. The significance of hematogenous and recurrent infections. *Clin Orthop.* 1992; 280:200-7.
- [6]. Frazão VL, Miyahara RA, Lima ALLM, Croci AT, Vicente JRN. Perfil social e análise de custo da infecção pós-operatória da artroplastia total de quadril. *Rev Bras Ortop.* 2017; 52(6):720-4.
- [7]. Kurtz SM, Ong KL, Schmier J, Mowat F, Saleh K, Dybvik E *et al.* Future clinical and economic impact of revision total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 2007; 89(Suppl 3):144-51.
- [8]. Frommelt L. Principles of systemic antimicrobial therapy in foreign material associated infection in bone tissue, with special focus on periprosthetic infection. *Injury.* 2006; 37(Suppl 2):S87-94.
- [9]. Fitzgerald RH Jr. Infected total hip arthroplasty: diagnosis and treatment. *J Am Acad Orthop Surg.* 1995; 3(5):249-62.
- [10]. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol Rev.* 2002; 15(2):167-93.

- [11]. Fux CA, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Costerton JW. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2003; 1(4):667-83.
- [12]. Fux CA, Wilson S, Stoodley P. Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an *in vitro* catheter infection model. *J Bacteriol.* 2004; 186(14):4486-91.
- [13]. Dunne WMJr., Mason EOJr., Kaplan SL. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(12):2522-6.
- [14]. Neut D, Horn JR, Van Kooten TG, Van der Mei HC, Busscher HJ. Detection of biomaterial-associated infections in orthopaedic joint implants. *Clin Orthop Relat Res.* 2003; 413:261-8.
- [15]. Achermann Y, Vogt M, Leunig M. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(4):1209-14.
- [16]. Bauer TW, Pavizi J, Kobayashi N, Krebs V. Diagnosis of periprosthetic infection. *J Bone Joint Surg Am.* 2006; 88(4):869-82.
- [17]. Dibartola AC, Swearingen MC, Granger JF, Stoodley P, Dusane, DH. Biofilms in orthopedic infections: a review of laboratory methods. *APMIS.* 2017; 125, 418-28.
- [18]. Zimmerli W, Sendi P. Orthopaedic biofilm infections. *APMIS.* 2017; 125(4):353-64.
- [19]. Tani S, Lepetsos P, Stylianakis A, Vlamis J, Birbas K, Kaklamanos L. Superiority of the sonication method against conventional periprosthetic tissue cultures for diagnosis of prosthetic joint infections. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2018; 28(1):51-7.
- [20]. Goulet JA, Pellicci P, Brause BD, Salvati EM. Prolonged suppression of infection in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty.* 1988; 3(2):109-116.
- [21]. Toms AD, Davidson D, Masri BA, Duncan CP. The management of periprosthetic infection in total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg (Br).* 2006; 88(2):149-55.
- [22]. Trebse R, Pisot V, Trampuz A. Treatment of infected retained implants. *J Bone Joint Surg Br.* 2005; 87(2):249-56.

- [23]. Webb JC, Spencer RF. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br.* 2007; 89:851-857.
- [24]. Rudelli S, Uip E, Honda E, Lima ALLM. One-stage of infected total hip arthroplasty with bone graft. *J Arthroplasty.* 2008; 23(8):1165-77.
- [25]. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 2004; 351(16):1645-54.
- [26]. Insall JN, Thompson FM, Brause BD. Two-stage reimplantation for the salvage of infected total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 1983; 65(8):1087-98.
- [27]. Bertazzoni EM, 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 Chemotherapy.* 2004; 53(2):329-34.
- [28]. Penner MJ, Masri BA, Duncan CP. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. *J Arthrop.* 1996; 11(8):939-44.
- [29]. Fink B, Vogt S, Reinsch M, Buchner H. Sufficient release of antibiotic by a spacer 6 weeks after implantation in two-stage revision of infected hip prostheses. *Clin OrthopRelat Res.* 2011; 469(11):3141-7.
- [30]. Weinstein AM, Bingham DN, Sauer BW, Lunceford EM. The effect of high pressure insertion and antibiotic inclusion upon the mechanical properties of polymethylmethacrylate. *Clin Orthop.* 1976; 121:67-73.
- [31]. Anagnostakos K, Furst O, Kelm J. Antibiotic-impregnated PMMA hip spacers: current status. *Acta Orthop.* 2006; 77(4):628-37.
- [32]. Balato G, Roscetto E, Vollaro A, Galasso O, Gasparini G, Ascione T *et al.* Bacterial biofilm formation is variably inhibited by different formulations of antibiotic-loaded bone cement *in vitro*. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2018; 27(6):1943-52.
- [33]. Bertazzoni ME, Caveiari C, Benini A. Release of antibiotics from polymethylmetacrilate cement. *J Chemother.* 2002; 14(5):492-500.
- [34]. Bridgens J, Davies S, Tilley L, Norman P, Stockley I. Orthopaedic bone cement. Do we know what we are using? *J Bone Joint Surg (Br).* 2008; 90-B(5):643-47.

- [35]. Joseph TN, Chen AL, Di Cesare PE. Use of antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg.* 2003; 11(1):38-47.
- [36]. Anagnostakos K, Meyer C. Antibiotic elution from hip and knee acrylic bone cement spacers: a systematic review. *BioMed Res Int.* 2017:1-7.
- [37]. Corona OS, Barro V, Mendez M, Cáceres E, Flores X. Industrially prefabricated cement spacers: Do vancomycin- and gentamicin-impregnated spacers offer any advantage? *Clin Orthop Relat Res.* 2014; 472(3):923-32.
- [38]. Gallo J, Kolár M, Florschütz AV, Novotný R, Pantucek R, Kesselová M. *In vitro* testing of gentamicin-vancomycin loaded bone cement to prevent prosthetic joint infection. *Biomed Papers.* 2005; 149(1):153-8.
- [39]. Miller JD, McCreadie BR, Alford AI, Hankenson KD, Golstein SA. Form and function of bone, in Einhorn TA, O'Keefe RJ, Buckwalter JA. Eds: *Orthopaedic Basic Science: Foundations of Clinical Practice.* Rosemont, IL. Am Acad Orthop Surg; 2007. 3^a ed. p. 129-59.
- [40]. Li T, Fu L, Wang J, Shi Z. High dose of vancomycin plus gentamicin incorporated acrylic bone cement decreased the elution of vancomycin. *Infect Drug Resist.* 2019; 12:2191-9.
- [41]. Bertazzoni Minelli E, Bora TD, Benini A. Different microbial biofilm formation on polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement loaded with gentamicin and vancomycin. *Anaerobe.* 2011; 17(6):380-3.
- [42]. Franklin MJ, Chang C, Akiyama T, Bothner B. New Technologies for Studying Biofilms. *Microbiol Spectr.* 2015;3.
- [43]. Grenho L, Salgado CL, Fernandes MH, Monteiro FJ, Ferraz MP. Antibacterial activity and biocompatibility of three-dimensional nanostructured porous granules of hydroxyapatite and zinc oxide nanoparticles--an *in vitro* and *in vivo* study. *Nanotechnology.* 2015;26:315101.
- [44]. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007;357:654-63.

- [45]. Matos AC, Goncalves LM, Rijo P, Vaz MA, Almeida AJ, Bettencourt AF. A novel modified acrylic bone cement matrix. A step forward on antibiotic delivery against multiresistant bacteria responsible for prosthetic joint infections. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;38:218-26.
- [46]. Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol*. 2005;43:140-3.
- [47]. CLSI. Clinical Laboratory Standard Institute - M07 - A10 - Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. 2015.
- [48]. Zhao L, Ashraf MA. Influence of Silver-hydroxyapatite Nanocomposite Coating on Biofilm Formation of Joint Prosthesis and Its Mechanism. *West Indian Med J*. 2015;64:506-13.
- [49]. Boles BR, Horswill AR. Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol*. 2011;19:449-55.
- [50]. Romling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med*. 2012;272:541-61.
- [51]. Street TL, Sanderson ND, Atkins BL, Brent AJ, Cole K, Foster D, et al. Molecular Diagnosis of Orthopedic-Device-Related Infection Directly from Sonication Fluid by Metagenomic Sequencing. *J Clin Microbiol*. 2017;55:2334-47.
- [52]. Tuon FF, Cieslinski J, Ono AFM, Goto FL, Machinski JM, Mantovani LK, et al. Microbiological profile and susceptibility pattern of surgical site infections related to orthopaedic trauma. *Int Orthop*. 2019;43:1309-13.
- [53]. Dusane DH, Brooks JR, Sindeldecker D, Peters CW, Li A, Farrar NR, et al. Complete Killing of Agar Lawn Biofilms by Systematic Spacing of Antibiotic-Loaded Calcium Sulfate Beads. *Materials (Basel)*. 2019;12.
- [54]. Roth KE, Maier GS, Schmidtman I, Eigner U, Hubner WD, Peters F, et al. Release of Antibiotics Out of a Moldable Collagen-beta-Tricalciumphosphate-Composite Compared to Two Calcium Phosphate Granules. *Materials (Basel)*. 2019;12.

- [55]. Ghimire A, Skelly JD, Song J. Micrococcal-Nuclease-Triggered On-Demand Release of Vancomycin from Intramedullary Implant Coating Eradicates *Staphylococcus aureus* Infection in Mouse Femoral Canals. *ACS Cent Sci*. 2019;5:1929-36.
- [56]. Koller G, Roether J, Bruce K, Deb S. Antimicrobial potential of bioactive bone cements. *J Appl Biomater Biomech*. 2008;6:16-22.
- [57]. Ozturk B, Gunay N, Ertugrul BM, Sakarya S. Effects of vancomycin, daptomycin, and tigecycline on coagulase-negative staphylococcus biofilm and bacterial viability within biofilm: an in vitro biofilm model. *Can J Microbiol*. 2016;62:735-43.
- [58]. Mandell JB, Orr S, Koch J, Nourie B, Ma D, Bonar DD, et al. Large variations in clinical antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* biofilms of periprosthetic joint infection isolates. *J Orthop Res*. 2019;37:1604-9.
- [59]. Sanchez CJ, Jr., Shiels SM, Tennent DJ, Hardy SK, Murray CK, Wenke JC. Rifamycin Derivatives Are Effective Against Staphylococcal Biofilms In Vitro and Elutable From PMMA. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473:2874-84.
- [60]. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33:374-8.
- [61]. Cafiso V, Bertuccio T, Spina D, Purrello S, Stefani S. Tigecycline inhibition of a mature biofilm in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* : comparison with other drugs. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010;59:466-9.
- [62]. Siala W, Rodriguez-Villalobos H, Fernandes P, Tulkens PM, Van Bambeke F. Activities of Combinations of Antistaphylococcal Antibiotics with Fusidic Acid against Staphylococcal Biofilms in In Vitro Static and Dynamic Models. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62.
- [63]. Le KY, Park MD, Otto M. Immune Evasion Mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Infection. *Front Microbiol*. 2018;9:359.

- [64]. Weiser J, Henke HA, Hector N, Both A, Christner M, Buttner H, et al. Sub-inhibitory tigecycline concentrations induce extracellular matrix binding protein Embp dependent *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and immune evasion. *Int J Med Microbiol.* 2016;306:471-8.
- [65]. Anagnostakos K, Kelm J, Regitz T, Schmitt E, Jung W. In vitro evaluation of antibiotic release from and bacteria growth inhibition by antibiotic-loaded acrylic bone cement spacers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;72:373-8.
- [66]. Kelm J, Regitz T, Schmitt E, Jung W, Anagnostakos K. In vivo and in vitro studies of antibiotic release from and bacterial growth inhibition by antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate hip spacers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:332-5.
- [67]. Ficklin MG, Kunkel KA, Suber JT, Gerard PD, Kowaleski MP. Biomechanical evaluation of polymethyl methacrylate with the addition of various doses of cefazolin, vancomycin, gentamicin, and silver microparticles. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2016;29:394-401.
- [68]. Broussou DC, Lacroix MZ, Toutain PL, Woehrle F, El Garch F, Bousquet-Melou A, et al. Differential Activity of the Combination of Vancomycin and Amikacin on Planktonic vs. Biofilm-Growing *Staphylococcus aureus* Bacteria in a Hollow Fiber Infection Model. *Front Microbiol.* 2018;9:572.

FIGURES AND TABLES LEGENDS

Figure 1. Comparison of the different groups regarding the planktonic cells count (A), and biofilm cells count (B). PMMA: control group without antibiotic, V1: PMMA loaded with vancomycin 1g, V2: PMMA loaded with vancomycin 2g, V4: PMMA loaded with vancomycin 4g, G: PMMA loaded with gentamicin 500mg, V1G: PMMA loaded with vancomycin 1g and gentamicin 500mg, V2G: PMMA loaded with vancomycin 2g and gentamicin 500mg, V4G: PMMA loaded with vancomycin 4g and gentamicin 500mg.

Figure 2. SEM images regarding the comparison of the different groups of PMMA samples' surface according to the antibiotic load. C: PMMA without antibiotic; V1: PMMA loaded with vancomycin 1g; V2: PMMA loaded with vancomycin 2g; V4: PMMA loaded with vancomycin 4g; G: PMMA loaded with gentamicin 500mg; V1G: PMMA loaded with gentamicin 500mg + vancomycin 1g; V2G: PMMA loaded with gentamicin 500mg + vancomycin 2g; V4G: gentamicin 500mg + vancomycin 4g. Magnification of 20x.

Figure 3. SEM images regarding the comparison of the different groups of PMMA samples texture according to the antibiotic load after the biofilm production. C: PMMA without antibiotic; V1: PMMA loaded with vancomycin 1g; V2: PMMA loaded with vancomycin 2g; V4: PMMA loaded with vancomycin 4g; G: PMMA loaded with gentamicin 500mg; V1G: PMMA loaded with gentamicin 500mg + vancomycin 1g; V2G: PMMA loaded with gentamicin 500mg + vancomycin 2g; V4G: gentamicin 500mg + vancomycin 4g. White arrows indicate the biofilm structure—magnification of 3.000x.

Figure 4. Viability of bacteria within the biofilm and antibiotic action after treatment using FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability kit. A: Positive control stained in green (live cells); B: negative control, after ethanol 70% washing step, stained in red (dead cells); C: specimen treated with vancomycin 1g, showing viable cells; D: specimen treated with vancomycin 2g, showing small amounts of viable cells; E: specimen treated with vancomycin 4g, showing small amounts viable and non-viable cells; F: specimen treated with gentamicin 500mg showing small amounts of viable and non-viable cells; G: specimen treated with gentamicin 500mg + vancomycin 1g, showing non-viable cells; H: specimen treated with gentamicin 500mg + vancomycin 2g, showing small amounts of viable and non-viable cells; I: specimen treated with gentamicin 500mg + vancomycin 4g, showing the prevalence of non-viable cells.

Figure 5. FTIR spectra of raw PMMA (C) and antibiotic-loaded PMMA with different concentrations of vancomycin (V1=1g; V2 = 2g; V4 = 4g) and fixed gentamicin (G) with 500mg per 40g of PMMA. The arrow details the standard peak of vancomycin and gentamicin. Otherarrows are the PMMA pattern.

FIGURES AND TABLES LEGENDS

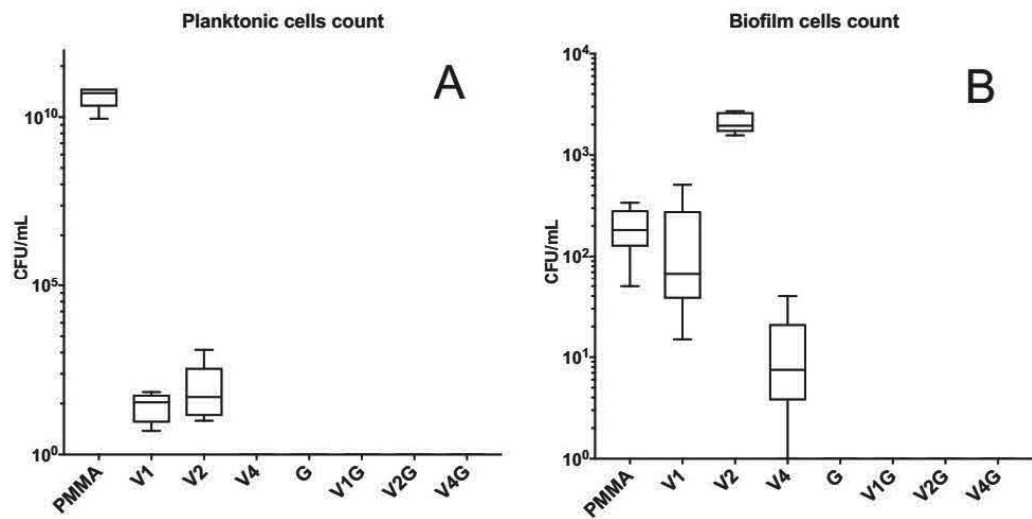


Figure 1. Comparison of the different groups regarding the planktonic cells count (A) biofilm cells count (B). PMMA: control group without antibiotic, V1: PMMA loaded with vancomycin 1g, V2: PMMA loaded with vancomycin 2g, V4: PMMA loaded with vancomycin 4g, G: PMMA loaded with gentamicin 500mg, V1G: PMMA loaded with vancomycin 1g and gentamicin 500mg, V2G: PMMA loaded with vancomycin 2g and gentamicin 500mg, V4Gg: PMMA loaded with vancomycin 4g and gentamicin 500mg.

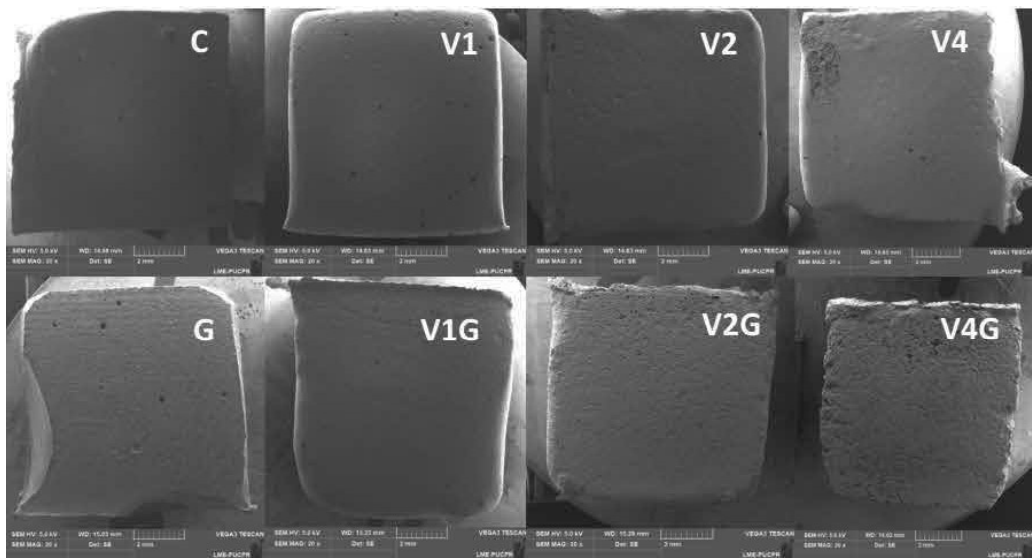


Figure 2. SEM images regarding the comparison of the different groups of PMMA samples' surface according to the antibiotic load. C: PMMA without antibiotic; V1: PMMA loaded with vancomycin 1g; V2: PMMA loaded with vancomycin 2g; V4: PMMA loaded with vancomycin 4g; G: PMMA loaded with gentamicin 500mg; V1G: PMMA loaded with gentamicin 500mg + vancomycin 1g; V2G: PMMA loaded with gentamicin 500mg + vancomycin 2g; V4G: gentamicin 500mg + vancomycin 4g. Magnification of 20x.

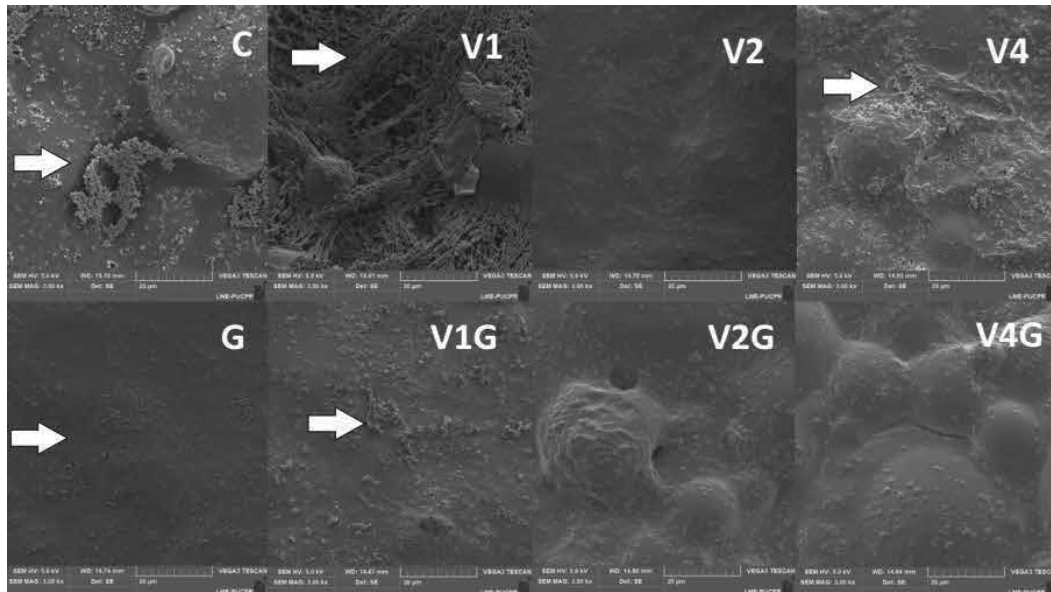


Figure 3. SEM images regarding the comparison of the different group of PMMA samples texture according to the antibiotic load after the biofilm production. C: PMMA without antibiotic; V1: PMMA loaded with vancomycin 1g; V2: PMMA loaded with vancomycin 2g; V4: PMMA loaded with vancomycin 4g; G: PMMA loaded with gentamicin 500mg; V1G: PMMA loaded with gentamicin 500mg + vancomycin 1g; V2G: PMMA loaded with gentamicin 500mg + vancomycin 2g; V4G: gentamicin 500mg + vancomycin 4g. White arrows indicate the biofilm structure. Magnification of 3.000x.

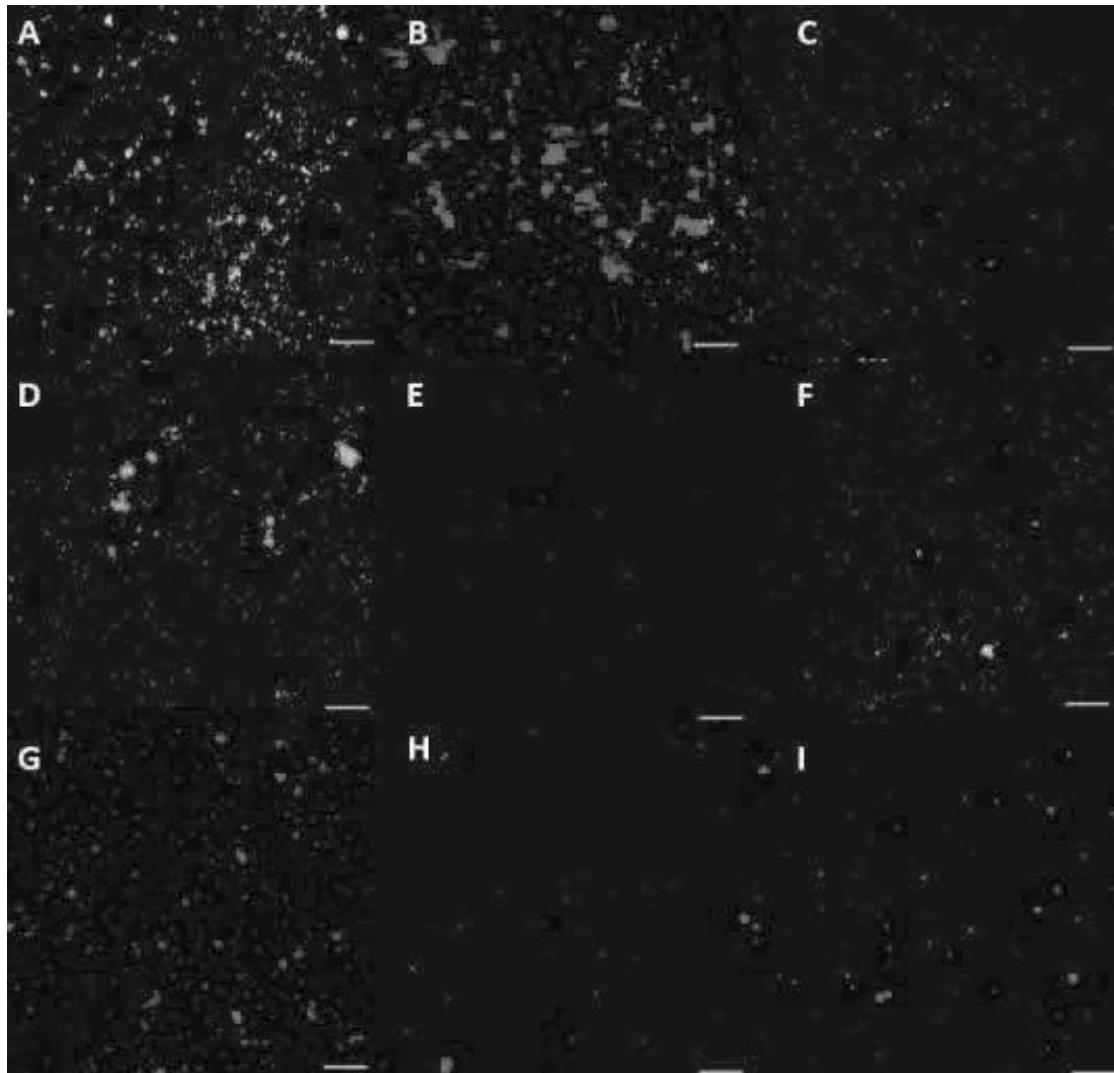


Figure 4. Viability of bacteria within the biofilm and antibiotic action after treatment using FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability kit. A: Positive control stained in green (live and viable cells); B: negative control, after ethanol 70% washing step, stained in red (dead and non-viable cells); C: specimen treated with vancomycin 1g, showing viable cells and biofilm stained in green; D: specimen treated with vancomycin 2g, showing small amounts of viable cells and biofilm; E: specimen treated with vancomycin 4g, showing small amounts viable and non-viable cells; F: specimen treated with gentamicin 500mg showing small amounts of viable and non-viable cells; G: specimen treated with gentamicin 500mg + vancomycin 1g, showing dead and non-viable cells and biofilms; H: specimen treated with gentamicin 500mg + vancomycin 2g, showing small amounts of viable and non-viable cells ; I: specimen treated with gentamicin 500mg + vancomycin 4g, showing the prevalence of dead and non-viable cells.

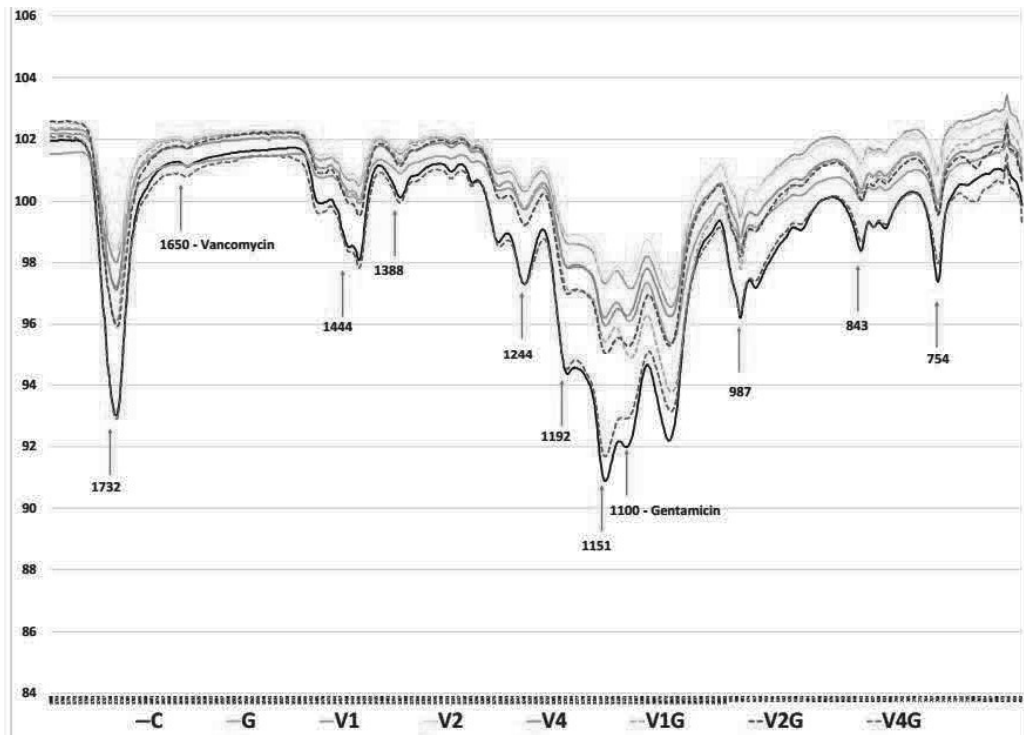


Figure 5. FTIR spectra of raw PMMA (C) and antibiotic loaded PMMA with different concentration of vancomycin (V1=1g; V2 = 2g; V4 = 4g) and fixed gentamicin (G) with 500mg per 40g of PMMA. The arrow details the common peak of vancomycin and gentamicin. Other arrows are the PMMA pattern.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura mostra que a chave para evitar as infecções periprotéticas é prevenir a aderência bacteriana (226). Apesar de todos os cuidados com a esterilização, precisão e padronização da técnica cirúrgica, administração de profilaxia antibiótica sistêmica entre outros, muitas vezes as bactérias são capazes de derrotar essas medidas e encontram uma janela de oportunidade para invadir e se estabelecer no sítio cirúrgico.

As infecções ósseas e periprotéticas, ainda representam um desafio no diagnóstico e tratamento em muitos casos. Isso porque muitas bactérias criam seus mecanismos de defesa, que as tornam mais difíceis de combatê-las. Suas complicações, são muitas vezes catastróficas, e o paciente pode ficar com sequelas muito limitantes e irreversíveis. O tratamento geralmente é prolongado, sofrido ao paciente e oneroso, tanto ao paciente como para a saúde pública e privada. Ainda com relação ao fator econômico, em muitas situações o paciente necessita do afastamento das atividades de trabalho no período de tratamento ou em definitivo nos casos de sequelas mais graves.

Tratamentos cirúrgicos com lavagem e debridamento, associado à troca parcial e ou total dos implantes e uso de antibióticos sistêmicos e locais adicionados ao PMMA como espaçadores, fazem parte do arsenal terapêutico. A utilização dos espaçadores com antibióticos, demonstra um aumento no índice de sucesso no tratamento das revisões de artroplastia infectadas em dois tempos (118,122). A explicação para esse fato é a elevada liberação local inicial de antibióticos seguida de uma redução gradual por um período de tempo de algumas semanas até vários meses, impedindo a reinfecção (19,192).

Os aminoglicosídeos como a gentamicina são considerados os antibióticos mais eficazes para serem adicionados em cimentos ósseos de PMMA devido à sua alta solubilidade, estabilidade térmica e atividade bactericida em baixas concentrações. Além disso, a gentamicina é eficaz contra a maioria dos microrganismos mais comumente encontrados nas infecções ortopédicas como o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus ssp.*

A vancomicina apresenta características semelhantes às da gentamicina e é muito indicada para *Staphylococcus* resistentes à meticilina e *Staphylococcus epidermidis* que também são encontradas nas infecções ortopédicas (217).

Associações desses dois antibióticos têm sido realizadas com o objetivo de obter uma melhor efetividade na inibição do biofilme com amplo espectro bacteriano. Concentrações ideais dessa associação antibiótica devem ser melhor definidas cientificamente para auxílio no tratamento destas infecções periprotéticas e evitar suas complicações.

O presente estudo foi direcionado à análise da inibição da formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* em modelos de cimentos ósseos de PMMA adicionados com diferentes concentrações de vancomicina e gentamicina utilizadas de forma isolada ou combinada. Ele apresenta algumas limitações devido à sua natureza *in vitro*, as cepas estudadas não foram obtidas do foco infeccioso clínico real e tinham pouco tempo de formação de biofilme. Também, pelo pequeno número de amostras utilizadas nos métodos MEV e Viabilidade.

Apesar das limitações do estudo e baseados nos resultados obtidos por meio dos diferentes testes laboratoriais pode-se sugerir que os cimentos ósseos de PMMA adicionados com antibióticos apresentaram eficiência na inibição das bactérias planctônicas por meio da redução das unidades formadoras de colônias ($p < 0.05$), quando comparados ao grupo controle (PMMA sem antibiótico). Detectou-se a ausência de bactérias planctônicas nos diversos grupos avaliados, exceto nos grupos V1 e V2.

Analisando-se as bactérias sésseis, os grupos de cimentos adicionados com a vancomicina isolada em diferentes concentrações não foram capazes de inibir o crescimento dessas bactérias. Os grupos de cimentos ósseos de PMMA cujas adições estavam presentes a gentamicina apresentaram efetividade na inibição dessas cepas bacterianas ($p < 0.001$). A vancomicina e gentamicina são drogas com baixa atividade contra o biofilme em comparação com outras drogas (165). Os resultados encontrados no presente estudo não concordam com os de Smith *et al.* (198). Os autores

avaliaram a sobrevivência celular associada ao biofilme frente a drogas como a clindamicina, linezolid, vancomicina, daptomicina e tigeciclina. Os autores observaram que todos os antibióticos foram eficazes contra populações estafilocócicas planctônicas. Porém, a vancomicina e daptomicina apresentaram atividade superior contra células associadas ao biofilme (sésseis).

A microscopia eletrônica de varredura utilizada como método qualitativo de visualização da presença de biofilme bacteriano nos modelos de cimentos ósseos dos diferentes grupos, permitiu verificar a evidência de biofilme nos grupos V1, V4, G e V1G, porém essas imagens não comprovam a viabilidade dessas cepas. Dentre os grupos onde observou-se a presença de biofilme bacteriano a partir da microscopia eletrônica de varredura, o grupo V1G não apresentou viabilidade celular no teste de imunofluorescência e microbiológicos da cultura. Isso pode estar associado a uma amostra ou à presença de parede celular parcialmente intacta, porém sem atividade. Foi observada a presença de biofilme associada à viabilidade celular nos grupos controle, G e V1. O grupo V2 também apresentou viabilidade celular, porém na MEV não foi observada presença de biofilme na amostra analisada, o que pode ser justificado pelo pequeno número de corpos de prova submetidos ao MEV e pelo fato de que esse método obtém uma imagem parcial do corpo de prova. O grupo V4 apresentou cultura positiva para células planctônicas, e no exame de viabilidade foi observado células, mas em sua maioria mortas. Isso pode ser justificado por ser uma única amostra analisada no teste de viabilidade. O grupo V2G não apresentou biofilme na MEV ou nos exames microbiológicos de cultura, porém apresentou pequeno grupo de células viáveis sem biofilme com predomínio de células mortas no exame de viabilidade. Uma suposição aventada para o encontro de mais células neste grupo, seria pelo aumento da rugosidade da superfície do cimento, comprovada pela MEV. A literatura comprova que superfícies mais porosas tem uma maior suscetibilidade de aderência de biofilme. Devido a maior porosidade do cimento, a suposição é que houve maior aderência celular, porém, a associação de V2G foi capaz de inibir a formação do biofilme, mas não de eliminar todas as células. Somente o grupo V4G, não apresentou

crescimento de células nas culturas, ou de biofilme na MEV e de viabilidade celular, mesmo com maior porosidade na superfície do PMMA, comparada a todas as outras amostras.

O quadro abaixo compara os resultados achados do estudo das avaliações quantitativas das células planctônicas e sésseis e qualitativas da MEV e viabilidade celular, dos modelos experimentais analisados (Quadro1).

	Gentamicina	Controle	V1	V2	V4	V1G	V2G	V4G
Planctônicas								
Sésseis								
MEV								
Viabilidade								

Quadro 1: Comparação entre os achados quantitativos das células planctônicas e sésseis e qualitativo da MEV e viabilidade.

Cultura de células planctônicas: crescimento de colônias em grupo controle, V1 e V2. **Cultura de células sésseis:** crescimento de colônias em grupo controle, V1, V2 e V4. **MEV:** setas brancas mostra crescimento de biofilme em G, grupo controle, V1, V4 e V1G. **Viabilidade:** coloração verde células vivas e vermelho células mortas. Células vivas: Grupo controle, V1, V2 e Gentamicina. Células mortas V4, V1G, V2G e V4G, sendo V1G biofilme com células mortas e V4 e V2G, pequenas quantidades de células, porém mortas e V4G predomínio de células mortas.

Portanto, pode-se concluir a partir desses achados que cimentos ósseos de PMMA adicionados com gentamicina e com vancomicina isoladas não são capazes de inibir a viabilidade celular dos *Staphylococcus aureus*, mas a associação da vancomicina e da gentamicina foram decisivas para essa inibição. Esses achados são suportados pelo estudo de Gallo *et al.*(79) onde analisaram amostras de *Staphylococcus* inoculadas de quatro materiais ortopédicos (polietileno de ultra-alto peso molecular PMMA sem antibiótico, PMMA adicionado com gentamicina comercialmente produzido e PMMA manualmente misturado adicionado com gentamicina e vancomicina). Os autores observaram que os materiais sem a presença de antibióticos mostraram evidências de crescimento de *Staphylococcus*. O PMMA

adicionado com gentamicina mostrou crescimento apenas dos *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (76). PMMA adicionado com a combinação da gentamicina e vancomicina inibiram completamente o crescimento bacteriano. Os autores concluíram que PMMA adicionado com baixas doses de gentamicina-vancomicina previne a colonização melhor que o PMMA adicionado apenas por gentamicina.

Bertazzoni Minelli *et al.* (25) avaliaram cimentos ósseos adicionados com gentamicina, vancomicina e gentamicina associada à vancomicina sobre o crescimento e adesão microbiana de cepas multirresistentes Gram-positivas isoladas clinicamente. A vancomicina e a gentamicina isoladas inibiram bactérias sensíveis e intermediárias durante as primeiras 24 e 48 horas. A vancomicina inibiu o crescimento e reduziu a adesão bacteriana. Cepas com intermediária suscetibilidade à gentamicina mostraram crescimento normal após 48 horas, mas com adesão reduzida, enquanto cepas resistentes à gentamicina apresentaram crescimento e adesão semelhantes às do grupo controle. Segundo os autores, o grau de adesão bacteriana ao cimento de PMMA com gentamicina ou vancomicina pode ser reduzido apesar de uma taxa de crescimento normal e das diferenças encontradas entre as cepas testadas. Os autores encontraram bons resultados na associação da gentamicina com vancomicina no que se refere ao crescimento e adesão bacteriana ao cimento ósseo de PMMA assim como no presente estudo.

Van de Belt *et al.* (219) observaram em seu estudo que a formação de biofilme infeccioso ocorre em padrões semelhantes nos cimentos de PMMA adicionados ou não com gentamicina encontrando um número máximo de bactérias viáveis no biofilme após 24 horas. Relataram que após o biofilme atingir certa espessura, partes dele podem se deslocar para a superfície do PMMA podendo ser quantificado após alguns dias. Essas análises reforçam os resultados encontrados no presente estudo que a gentamicina isolada não promove inibição efetiva do biofilme bacteriano.

A avaliação realizada por meio da espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier revelou bandas de absorção coincidentes para todos os cimentos ósseos avaliados, demonstrando não haver diferenças entre os

polímeros adicionados com diferentes concentrações e tipos de antibióticos utilizados no estudo.

Na análise de atividade sinérgica, indiferente ou antagônica entre a vancomicina e a gentamicina em diferentes concentrações foi observado que a utilização associada desses antibióticos no cimento ósseo de PMMA não permitiu o crescimento do *Staphylococcus aureus* indicando a efetividade do efeito sinérgico dessas drogas utilizadas combinadas, visto que o *Staphylococcus aureus* não demonstrou resistência aos antibióticos testados. Esses achados estão de acordo com o estudo de Bridgens *et al.* (32) que avaliaram os cimentos Palacos R40G® (Schering-Plough), Palacos R+G® (Heraeus Medical) ambos contendo 0,5 g de gentamicina por 40 g de mistura e o cimento Smartset GHV® (Depuy CMW) com 1 g de gentamicina por 40 g de mistura. Além dessas formulações testaram os mesmos cimentos com a adição de 1g e 2g de vancomicina. Os resultados demonstraram que todos os cimentos apresentaram efeito sinérgico com a adição da vancomicina, permitindo um aumento da eluição da gentamicina.

O estudo de Bertazoni Minelli *et al.* (25) também pode reforçar os resultados de efeito sinérgico entre a vancomicina e a gentamicina. Eles concluíram que o efeito da gentamicina associada à vancomicina no crescimento e adesão bacteriana ao cimento ósseo de PMMA depende das concentrações de antibióticos, das características específicas de cada microrganismo, de sua capacidade de produzir biofilme e aderir ao cimento ósseo de PMMA adicionado com antibióticos. No entanto, a eluição foi maior na vancomicina que na gentamicina. As concentrações dos antibióticos *in vivo* foram menores que *in vitro*. A inibição do crescimento bacteriano por espaçadores foi observada por 2 semanas.

Li *et al.* (135) relataram em seu estudo que a associação da gentamicina com a vancomicina apresentou vantagens para a inibição dos *Staphylococcus aureus*, porém esse efeito é dose dependente. Os autores estudaram oito grupos de cimento de PMMA adicionados com antibióticos (grupo controle sem antibiótico, gentamicina de 1, 2 e 4g, vancomicina de 1, 2 e 4g, gentamicina 1g + vancomicina 1g e gentamicina 2g + vancomicina 2g). A associação de gentamicina 2g + vancomicina 2g promoveu uma

redução de aproximadamente 50% na liberação da vancomicina, mas apesar disso consideram a dose ideal por apresentar atividade antimicrobiana eficaz e propriedades materiais aceitáveis (boa resistência à compressão e ausência de citotoxicidade). Segundo a literatura, aumentar a concentração de antibióticos nos cimentos ósseos de PMMA é um desafio para os ortopedistas e pesquisadores, pois esse procedimento pode induzir a uma perda significativa de suas propriedades biomecânicas (32,58,71).

O trabalho de Bertazoni *et al.* (23) também corrobora com os resultados desse estudo no que se refere ao efeito sinérgico da gentamicina com a vancomicina associados. Além disso, os autores observaram uma redução da liberação da vancomicina associada à gentamicina em (0,51%) em comparação com a vancomicina isolada (1,16%). Após 10 dias de incubação *in vitro* a vancomicina mostrou 34,1% de perda de sua atividade microbiológica comprovando relatos presentes na literatura de que após a inserção dos espaçadores de PMMA adicionados com antibióticos ocorre uma elevada eluição desses antibióticos prevenindo um quadro recorrente de infecção. Lembrando que na sequência ocorre uma redução gradual dessa eluição em algumas semanas ou meses.

Regis *et al.*(181) observaram que a associação da gentamicina com a vancomicina exerceu forte inibição contra *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina e *Staphylococcus coagulase-negativos*. Segundo os autores, espaçadores pré-formados adicionados com gentamicina e vancomicina são um método seguro de fornecer alta concentração de antibióticos no local da infecção com baixos níveis séricos e de alcançar uma cinética de liberação eficaz.

6. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

1- Na avaliação quantitativa de contagem de colônias das células sésseis do biofilme bacteriano foi observado o crescimento em V1, V2 e V4 assim como no grupo controle de PMMA. Não houve crescimento nos grupos, gentamicina, V1G, V2G e V4G.

2- Na avaliação quantitativa de contagem de células planctônicas, foi observado crescimento de colônias nos grupos controle de PMMA, e em V1 e V2. Não houve crescimento nos grupos gentamicina, V4, V1G, V2G e V4G.

3- Com relação à avaliação qualitativa com a microscopia eletrônica de varredura, foi observado o crescimento de biofilme nos grupos, controle PMMA, V1, V4, G, V1G. Nos grupos V2, V2G e V4G, não foi observado a formação do biofilme.

4- Na avaliação qualitativa da microscopia de imunofluorescência, *kit live/dead*, não houve viabilidade celular no grupo controle com álcool, V4, V1G e V4G no grupo V2G havia presença de células, porém elas se apresentaram mortas. Nos grupos de PMMA, V1, V2 e gentamicina encontramos células vivas e viáveis.

5- O índice de concentração inibitória fracionário foi $<0,5$ pelo teste do *Checkerbord*, isso confirma o sinergismo entre vancomicina e gentamicina.

6- Os espectros de FTIR não mostraram diferenças significativas nas composições poliméricas entre PMMA bruto e PMMA adicionado com antibióticos, ambos os polímeros apresentam bandas de absorção semelhantes.

7.CONCLUSÃO

Por meio de todas as avaliações realizadas pode-se sugerir que a associação entre Vancomicina 4G e Gentamicina 500mg, adicionadas ao cimento ósseo (PMMA), apresenta um efeito inibitório na formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* no modelo experimental estudado.

Futuros estudos devem avaliar a influência de diferentes concentrações de gentamicina e vancomicina adicionadas combinadas ao PMMA, quanto a sua interferência na porosidade, rugosidade superficial e consequente influência nas propriedades mecânicas de resistência dos cimentos ósseos e também comparar em estudos animais, a eficácia ou não, na inibição da formação do biofilme de *Staphylococcus aureus in vivo*.

8. REFERÊNCIAS

1. Achermann Y, Vogt M, Leunig M. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(4):1209-14.
2. An YH, Friedman RJ. Prevention of sepsis in total joint arthroplasty. *J Hosp Infect.* 1996; 33:93-108.
3. Anagnostakos K, Furst O, Kelm J. Antibiotic-impregnated PMMA hip spacers: current status. *Acta Orthop.* 2006; 77(4):628-37.
4. Anagnostakos K, Hitzler P, Pape D, Kohn D, Kelm J. Persistence of bacterial growth on antibiotic-loaded beads: is it actually a problem? *Acta Orthop.* 2008; 79:302–307.
5. Anagnostakos K, Kelm J. Enhancement of antibiotic elution from acrylic bone cement. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater.* 2009; 90(1):467-75.
6. Anagnostakos K, Meyer C. Antibiotic elution from hip and knee acrylic bone cement spacers: a systematic review. *BioMed Res Int.* 2017:1-7.
7. Anagnostakos K, Wilmes P, Schmitt E, Kelm J. Elution of gentamicin and vancomycin from polymethylmethacrylate beads and hip spacers *in vivo*. 2009; 80(2):193-7.
8. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DW, Simpson H, Peto TE *et al.* Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(10):2932-39.
9. Balato G, Roscetto E, Vollaro A, Galasso O, Gasparini G, Ascione T *et al.* Bacterial biofilm formation is variably inhibited by different formulations of antibiotic-loaded bone cement *in vitro*. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2018; 27(6):1943-52.
10. Baleani M, Cristofolini L, Minari C, Toni A. Fatigue strength of PMMA bone cement mixed with gentamicin and barium sulphate vs pure PMMA. *Proceedings of the Institution of Mech Engg H, J Engg in Med.* 2003; 217(1):9-12.

11. Baleani M, Persson C, Zolezzi C, Andollina A, Borrelli AM, Tigani D. Biological and biomechanical effects of vancomycin and meropenem in acrylic bone cement. *J Arthroplasty*. 2008; 23(8):1232-8.
12. Barcia-Macay M, Lemaire S, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM, Van Bambeke F. Evaluation of the extracellular and intracellular activities (human THP-1 macrophages) of telavancin versus vancomycin against methicillin-susceptible, methicillin-resistant, vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58(6):1177-84.
13. Bare J, MacDonald SJ, Bourne RB. Preoperative evaluations in revision total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 2006; 446:40-4.
14. Barrack RL. Rush pin technique for temporary antibiotic-impregnated cement prosthesis for infected total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 2002; 17(5):600-3.
15. Bauer TW, Pavizi J, Kobayashi N, Krebs V. Diagnosis of periprosthetic infection. *J Bone Joint Surg Am*. 2006; 88(4):869-82.
16. Bauer W. Die methacryl-ära in der Zahnheilkunde. *D Zahn- ärtzZeitschr*. 1949; 4:1170-5.
17. Bayston R, Milner RDG. The sustained release of antimicrobial drugs from bone cement. *J Bone Joint Surg (Br)*. 1982; 64(4):460-4.
18. Belkoff SM, Molloy S. Temperature measurement during polymerization of polymethylmethacrylate cement used for vertebroplasty. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003; 28(14):1555-9.
19. Bentley AH, Oppenheim BA. A study of the elution of antibiotics from acrylic bone cement. *Journal of Medical Microbiology*. 1986; 22:XV.
20. Berbari EF, Marculescu C, Sia I, Lahr BD, Hanssen AD, Steckelberg JM *et al*. Culture-negative prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis*. 2007; 45(9):1113-9.
21. Bergin PF, Doppelt JD, Hamilton WG, Mirick GE, Jones AE, Sritulanondha S *et al*. Detection of periprosthetic infections with use of ribosomal RNA-based polymerase chain reaction. *J Bone Joint Surg Am*. 2010; 92(3):654-63.

22. Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the live/dead bacLight kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(10):3283-90.
23. Bertazzoni EM, 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 Chemotherapy.* 2004; 53(2):329-34.
24. Bertazzoni ME, Caveiari C, Benini A. Release of antibiotics from polymethylmetacrylate cement. *J Chemother.* 2002; 14(5):492-500.
25. Bertazzoni Minelli E, Bora TD, Benini A. Different microbial biofilm formation on polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement loaded with gentamicin and vancomycin. *Anaerobe.* 2011; 17(6):380-3.
26. Berthomieu C, Hienerwadel R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynth Res.* 2009; 101:157-170.
27. Blanc P, Bonnet E, Giordano G, Monteil J, Salabert AS, Payoux P. The use of leucocyte scintigraphy to evaluate chronic periprosthetic joint infections; a retrospective multicentre study on 168 patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019; 38(9):1625-31.
28. Blum MM, John H. Historical perspective and modern applications of attenuated total reflectance – Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). *Drug testing and Analysis.* 2012; 4(3-4):298-302.
29. Bogner A, Jouneau PH, Thollet G, Basset D, Gauthier C. A history of scanning electron microscopy developments: towards “wet-STEM” imaging. *Micron.* 2007; 38(4):390-401.
30. Bogut A, Niedzwiadek J, Koziol-Montewka M, Strzelec-Nowak D, Blacha J, Mazurkiewicz T. Sonication as a diagnostic approach used to investigate the infectious etiology of prosthetic hip joint loosening. *Pol J Microbiol.* 2014; 63(3):299-306.
31. Borens O, Yusuf E, Steinrücken J, Trampuz A. Accurate and early diagnosis of orthopedic device-related infection by microbial heat production and sonication. *J Orthop. Res.* 2013; 31:1700 -3.

32. Bridgens J, Davies S, Tilley L, Norman P, Stockley I. Orthopaedic bone cement. Do we know what we are using? *J Bone Joint Surg (Br)*. 2008; 90-B(5):643-47.
33. Buchholz H W, Elson R A, Engelbrecht E, Lodenkamper H, Rottger J, Siegel A. Management of deep infection of total hip replacement. *J Bone Joint Surg (Br)* 1981; 63-B(3): 342-53.
34. Buchholz H W, Engelbrecht H. Über die depot wirkungeini- ger antibioticabeivermischungmit dem kunstharz Pala- cos. *Chirurg* 1970; 40: 511-5.
35. Buttaro MA, Gimenez MI, Greco G, Barcan L, Piccaluga F. High active local levels of vancomycin without nephrotoxicity released from impacted bone allografts in 20 revision hip arthroplasties. *Acta Orthop*. 2005; 76(3):336-40.
36. Carrel A. On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med*. 1912; 15:516-28.
37. Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Gomez Urena EO *et al*. Rapid molecular microbiologic diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(7):2280-7.
38. Chan K, Ahmed AM, Johnson JA. Polymethylmethacrylate. In: Moorey BF. *Reconstructive surgery of the joints*. United Kingdom. Ed. Elsevier; 1996. 2^a ed. pp. 1937.
39. Charnley J. *Acrylic cement in orthopaedic surgery*. Edinburgh and London: Livingstone Ltda; 1970. 1^a ed. p. 118-25.
40. Chohfi M, Langlais F. O cimento ortopédico associado à vancomicina: comportamento mecânico e difusão do antibiótico. *Rev Bras Ortop*. 1994; 29(6):363-70.
41. Corona OS, Barro V, Mendez M, Cáceres E, Flores X. Industrially prefabricated cement spacers: Do vancomycin- and gentamicin-impregnated spacers offer any advantage? *Clin Orthop Relat Res*. 2014; 472(3):923-32.
42. Cristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg (Am)*. 1985; 67(2):264-73.

43. Cristina, AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*. 1987; 237(4822):1588-95.
44. Cristofolini L, Erani P, Savigni P, Grupp T, Thies O, Viceconti M. Increased longterm failure risk associated with excessively thin cement mantle in cemented hip arthroplasty: A comparative *in vitro* study. *Clin Biomech*. 2007; 22(4):410-21.
45. Cui O, Mihalko WM, Shields JS, Ries M, Saleh KJ. Antibiotic-impregnated cement spacers for the treatment of infection associated with total hip or knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2007; 89(4):871-82.
46. Darouiche RO, Dhir A, Miller AJ, Landon GC, Raad II, Musher DM. Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *J Infect Dis*. 1994; 170(3):720-3.
47. Dedavid BA, Gomes CI, Machado G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Edição do Centro de Microscopia e Microanálises do IDÉIAPUCRS. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Porto Alegre; 2007.
48. Del Pozo JL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med*. 2009; 361(8):787-94.
49. Dempsey KE, Riggio MP, Lennon A, Hannah VE, Ramage G, Allan D *et al*. Identification of bacteria on the surface of clinically infected and non-infected prosthetic hip joints removed during revision arthroplasties by 16S rRNA gene sequencing and by microbiological culture. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9(3):R46.
50. Dibartola AC, Swearingen MC, Granger JF, Stoodley, P, Dusane, DH. Biofilms in orthopedic infections: a review of laboratory methods. *APMIS*. 2017; 125, 418-28.
51. Dobbins JJ, Seligson D, Raff MJ. Bacterial colonization of orthopedic fixation devices in the absence of clinical infection. *J Infect Dis*. 1988; 158(1):203-5.
52. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol Rev*. 2002; 15(2):167-93.
53. Donlan RM. New approaches for the characterization of prosthetic joint biofilms. *Clin Orthop Relat Res*. 2005; 437:12-9.

54. Dougherty PF, Yotter DW, Matthews TR. Microdilution transfer plate technique for determine *in vitro* synergy of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977; 11(2):225-8.
55. Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P. Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency. *J Antimicrob Chemother.* 1992; 30(6):791-802.
56. Dunne N, Hill J, McAfee P, Todd K, Kirkpatrick R, Tunney M, Patrick S. *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(6):774-85.
57. Dunne NJ, Hill J, McAfee P, Kirkpatrick R, Patrick S, Tunney M. Incorporation of large amounts of gentamicin sulphate into acrylic bone cement: effect on handling and mechanical properties, antibiotic release, and biofilm formation. *Proceedings of the Institution of Mech Engg H, J Enggin Med.* 2008; 222(3):355-65.
58. Dunne WM. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2):155–66.
59. Dunne WM Jr., Mason EO Jr., Kaplan SL. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(12):2522-6.
60. Durbhakula SM, Czajka J, Fuchs MD, Uhl RL. Antibiotic-loaded articulating cement spacer in the 2-stage exchange of infected total knee arthroplasty. *J Arthrop.* 2004; 19(6):768-74.
61. Durbhakula SM, Czajka J, Fuchs MD, Uhl RL. Spacer endoprosthesis for the treatment of infected total hip arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2004; 19(6):760-7.
62. Edin ML, Miclau T, Lester GE, Lindsey RW, Dahners LE. Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts *in vitro*. *Clin Orthop Relat Res.* 1996; 333:245-51.

63. El-Azizi M, Rao S, Kanchanapoom T, Khardori N. *In vitro* activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin, and linezolid against intact and disrupted biofilms of staphylococci. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2005;4:2.
64. Enayatollahi MA, Parvizi J. Diagnosis of infected total hip arthroplasty. *Hip Int.* 2015; 25(4):294-300.
65. Engesaeter LB, Dale H, Schrama JC, Hallan G, Lise SA. Surgical procedures in the treatment of 784 infected THAs reported to the Norwegian arthroplasty register. *Acta Ortop.* 2011; 82(5):530-7.
66. Engesaeter LB, Espehaug B, Lie AS, Furnes O, Havelin LI. Does cement increase the risk of infection in primary total hip arthroplasty: revision rates in 56, 275 cemented and uncemented primary THAs followed for 0-16 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop.* 2006; 77(3):351-8.
67. Engesaeter LB, Lier AS, Espehaug B, Furnes O, Vollset SE, Havelin LI. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systematically 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.* 2003; 74(6):644-51.
68. Eriksson AR, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heatinduced bone tissue injury: A vital microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent.* 1983; 50(1):101-107.
69. Esposito S, Leone S, Bassetti M, Borrè S, Leoncini F, Meani E *et al.* Bone Joint Infections Committee for the Italian Society of Infections Tropical Diseases (SIMIT). *Infection.* 2009; 37:478-96.
70. Fehring TK, Odum S, Calton TF, Mason JB. Articulating versus static spacers in revision total knee arthroplasty for sepsis: The Ranawat Award. *Clin Orthop Relat Res.* 2000; 380:9-16.
71. Ficklin MG, Kunkel KA, Suber JT, Gerard PD, Kowaleski MP. Biomechanical evaluation of polymethyl methacrylate with the addition of various doses of cefazolin, vancomycin, gentamicin, and silver microparticles. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2016; 29(5):394-401.

72. Filoche SK, Coleman MJ, Angker L, Soissons CH. A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosmo dental plaque biofilms. *J Microbiol Methods*. 2007; 69(3):489-96.
73. Fink B, Vogt S, Reinsch M, Buchner H. Sufficient release of antibiotic by a spacer 6 weeks after implantation in two-stage revision of infected hip prostheses. *Clin OrthopRelat Res*. 2011; 469(11):3141-7.
74. Fitzgerald RH Jr. Infected total hip arthroplasty: diagnosis and treatment. *J Am Acad Orthop Surg*. 1995; 3(5):249-62.
75. Frazão VL, Miyahara RA, Lima ALLM, Croci AT, Vicente JRN. Perfil social e análise de custo da infecção pós-operatória da artroplastia total de quadril. *Rev Bras Ortop*. 2017; 52(6):720-4.
76. Frommelt L. Principles of systemic antimicrobial therapy in foreign material associated infection in bone tissue, with special focus on periprosthetic infection. *Injury*. 2006; 37(Suppl 2):S87-94.
77. Fux CA, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Costerton JW. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2003; 1(4):667-83.
78. Fux CA, Wilson S, Stoodley P. Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an *in vitro* cateter infection model. *J Bacteriol*. 2004; 186(14):4486-91.
79. Gallo J, Kolár M, Florschütz AV, Novotný R, Pantucek R, Kesselova M. *In vitro* testing of gentamicin-vancomycin loaded bone cement to prevent prosthetic joint infection. *Biomed Papers*. 2005; 149(1):153-8.
80. Ghanem E, Azzam K, Seeley M, Joshi A, Parvizi J. Staged revision for knee arthroplasty infection: What is the role of serologic tests before reimplantation? *Clin Orthop Relat Res*. 2009; 467(7):1699-705.
81. Gill HS, Campbell PA, Murray DW, De Smet KA. Reduction of the potential for thermal damage during hip resurfacing. *J Bone Joint Surg Br*. 2007; 89B(1):16-20.

82. Gomes LSM. Diagnóstico precoce da infecção articular periprotética do quadril – situação atual, avanços e perspectivas. *Rev Bras Ortop.* 2019; 54:368-76.
83. Gonzalez Della Valle A, Bostrom M, Brause B, Harney C, Salvati EA. Effective bactericidal activity of tobramycin and vancomycin eluted from acrylic bone cement. *Acta Orthop Scand.* 2001; 72(3):237-40.
84. Goodman S. Wear particulate and osteolysis. *Orthop Clin North Am.* 2005; 36(1):41-8.
85. Gottenbos B, Grijpma DW, Van der Mei HC, Feijen J, Busscher HJ. Antimicrobial effect of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chem.* 2001; 48(1):7-13.
86. Goulet JA, Pellicci P, Brause BD, Salvati EM. Prolonged suppression of infection in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty.* 1988; 3(2):109-116.
87. Grammatopoulos G, Bolduc M-E, Atkins BL, Kendrick B JL, McLardy-Smith P, Murray DW *et al.* Functional outcome of debridement, antibiotics and implant retention in periprosthetic joint infection involving the hip. A case control study. *Bone Joint J.* 2017; 99B(5):614-22.
88. Greene N, Holtom PD, Warren CA, Ressler RL, Shepherd L, McPherson EJ *et al.* *In vitro* elution of tobramycin and vancomycin polymethylmethacrylate beads and spacers from Simplex and Palacos. *Am J Orthop.* 1998; 27(3):201-5.
89. Gristina AG. Biomaterial-centered infection; microbial adhesion versus tissue integration. *Science.* 1987; 237(4822): 1588-95.
90. Gristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg.* 1985; 67A:264-73.
91. Gristina AG, Jennings RA, Naylor PT, Myrvik QN, Webb LX. Comparative *in vitro* antibiotic resistance of surface-colonizing coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33(6):813-6.
92. Gristina AG, Naylor PT, Webb LX. Molecular mechanism in musculoskeletal sepsis: The race for the surface. *Instr Course Lect (AAOS).* 1990; 39:471-86.

93. Haas SS, Brauer GM, Dickson G. A characterization of polymethylmethacrylate bone cement. *J Bone Joint Surg Am.* 1975; 57:380-391.
94. Harkess JW. Arthroplasty of hip. *In: Canale T. Campbell's operative orthopaedics.* St. Louis, Missouri: Ed. Mosby-Year Book; 1998. 9^a ed. vol. 1. p. 300-472.
95. Harper EJ, Bonfield W. Tensile characteristics of ten commercial acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res.* 2000; 53(5):605-16.
96. Harrison RG. Observations on the living developing nerve fiber. *Exp Biol Med.* 1907; 4(1):140-3.
97. Hasenwinkel JM, Lautenschlager EP, Wixson RL, Gilbert JL. A novel high-viscosity, two-solution acrylic bone cement: Effect of chemical composition on properties. *J Biomed Mater Res.* 1999; 47(1): 36-45.
98. He Y, Trotignon JP, Loty B, Tcharkhtchi A, Verdu J. Effect of antibiotics on the properties of poly(methylmethacrylate)-based bone cement. *J Biomed Mater Res.* 2002; 63(6):800-6.
99. Hemaiswarya S, kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine.* 2008; 15(8):639-52.
100. Hendriks JG, Van Horn JR, Van der Mei HC, Busscher HJ. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. *Biomaterials.* 2004; 25(3):545-56.
101. Henry SL, Galloway KP. Local antibacterial therapy for the management of orthopaedic infections. Pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet.* 1995; 29:36-45.
102. Hershberger E, Aeschlimann JR, Moldovan T, Rybak MJ. Evaluation of bactericidal activities of LY333328, vancomycin, teicoplanin, ampicillin-sulbactam, trovafloxacin, and RP59500 alone or in combination with rifampin or gentamicin against different strains of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(3):717-21.

103. Hoad-Reddick DA, Evans CR, Norman P, Stockley I. Is there a role for extended antibiotic therapy in a two-stage revision of the infected knee arthroplasty? *J Bone Surg (Br)*. 2005; 87(2):171-4.
104. Hofmann AA, Goldberg T, Tanner AM, Kurtin SM. Treatment of infected total knee arthroplasty using an articulating spacer: 2- to 12-year experience. *Clin Orthop Relat Res*. 2005; 430:125-31.
105. Holinka J, Bauer L, Hirschl AM, Graninger W, Windhager R, Presterl E. Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnosis improve pathogen detection. *J Orthop Res*. 2011; 29(4):617-22.
106. Hsieh PH, Chang YH, Chen SH, Ueng SW, Shih HN. 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*. 2006; 24(8):1615-21.
107. Hsieh PH, Chen LH, Chen CH, Lee MS, Yang WE, Shih CH. Two-stage revision hip arthroplasty for infection with a custom made, antibiotic-loaded, cement prosthesis as an interim spacer. *J Trauma*. 2004; 56(6): 1247-52.
108. Hsieh PH, Huang KC, Lee PC, Lee MS. Two-stage revision of infected hip arthroplasty using an antibiotic-loaded spacer: Retrospective comparison between short term and prolonged antibiotic therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 64(2): 392-7.
109. Hsieh PH, Huang KC, Tai CL. Liquid gentamicin in bone cement spacers: *in vivo* antibiotic release and systemic safety in two-stage revision of infected hip arthroplasty. *J Trauma-Injury, Infection and Critical Care*. 2009; 66(3):804-8.
110. Hsieh PH, Shih CH, Chang YH, Lee MS, Shih HN, Yang WE. Two-stage revision hip arthroplasty for infection: Comparison between the interim use of antibiotic-loaded cement beads and a spacer prosthesis. *J Bone Joint Surg Am*. 2004; 86(9):1989-97.
111. Hsieh PH, Shih CH, Chang YH, Lee MS, Yang WE, Shih HN. Treatment of deep infection of the hip associated with massive bone loss: two-stage revision

with an antibiotic-loaded interim cement prosthesis followed by reconstruction with allograft. *J Bone Joint Surg Br.* 2005; 87(6):770-5.

112. Hsieh PH, Tai CL, Lee PC, Chang YH. Liquid gentamicin and vancomycin in bone cement. A potentially more cost-effective regimen. *J Arthroplasty.* 2009; 24(1):125-30.

113. Insall JN, Thompson FM, Brause BD. Two-stage reimplantation for the salvage of infected total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 1983; 65(8):1087-98.

114. Isaklar ZU, Darouiche RO, Landon GC, Beck T. Efficacy of antibiotics alone for orthopaedic device-related infections. *Clin Orthop.* 1996; 332:184-9.

115. Jaebon T. Polymethylmethacrylate: properties and contemporary uses in orthopaedics. *J Am Acad Orthop Surg.* 2010; 18(5):297-305.

116. Janz V, Wassilew GI, Hasart O, Matziolis G, Tohtz S, Perka C. Evaluation of sonicate fluid cultures in comparison to histological analysis of the periprosthetic membrane for the detection of periprosthetic joint infection. *Int Orthop.* 2013; 37(5):931-6.

117. Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6):2467-73.

118. Joseph TN, Chen AL, Di Cesare PE. Use of antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg.* 2003; 11(1):38-47.

119. Judet J, Judet R. Use of artificial femoral head for arthroplasty of hip joint. *J Bone Joint Surg (Br).* 1950; 32-B(2): 166-73.

120. Kempthorne JT, Ailabouni R, Raniga S, Hammer D, Hooper G. Occult infection in aseptic joint loosening and the diagnostic role of implant sonication. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:946215.

121. Klekamp J, Dawson JM, Haas DW, DeBoer D, Christie M. The use of vancomycin and tobramycin in acrylic bone cement: biomechanical effects and elution kinetics for use in joint arthroplasty. *J Arthroplasty.* 1999; 14(3):339-46.

122. Kontekakis A, Berghaus M, Gaiser S, Kühn K-D. Evidence generation for medical devices. In: Scholz M, editor. *Biofunctional Surface Engineering*. Singapore: Pan Stanford Publishing; 2014. p. 291-314.
123. Kuechle DK, Landon GC, Musher DM, Noble PC. Elution of vancomycin, daptomycin, and amikacin from acrylic bone cement. *Clin Orthop Relat Res*. 1991; 264:302-8.
124. Kuehn KD, Ege W, Gopp U. Acrylic bone cements: Composition and properties. *Orthop Clin North Am*. 2005; 36(1):17-28.
125. Kuehn KD, Ege W, Gopp U. Acrylic bone cements: Mechanical and physical properties. *Orthop Clin North Am*. 2005; 36(1):29-39.
126. Kurtz SM, Ong KL, Schmier J, Mowat F, Saleh K, Dybvik E *et al*. Future clinical and economic impact of revision total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2007; 89(Suppl 3):144-51.
127. Kusuma SK, Ward J, Jacofsky M, Sporer SM, Della Valle CJ. What is the role of serological testing between stages of two-stage reconstruction of the infected prosthetic knee? *Clin Orthop Relat Res* 2011; 469(4):1002-8.
128. Laflamme C, Lavigne S, Ho J, Duchaine C. Assessment of bacterial endospore viability with fluorescecent dyes. *J Appl Microbiol*. 2004; 96(4):684-92.
129. Lautenschlager EP, Jacobs JJ, Marshall GW, Meyer Jr. PR. Mechanical properties of bone cements containing large doses of antibiotic powders. *J Biomed Mater Res*. 1976; 10(6):929-38.
130. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*. 2007; 370(9597):1508–19.
131. Lee AJ, Ling RS, Vangala SS. Some clinically relevant variables affecting the mechanical behavior of bone cement. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1978; 92(1):1- 18.
132. Lewis G, Janna S. Estimation of the optimum loading of an antibiotic powder in an acrylic bone cement: gentamicin sulfate in SmartSet HV. *Acta Orthop*. 2006; 77(4):622-7.

133. Lewis G. Alternative acrylic bone cement formulations for cemented arthroplasties: present status, key issues, and future prospects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008; 84(2):301-19.
134. Lewis G. Properties of acrylic bone cement: state of the art review. *J Biomed Res.* 1997; 38(2):155-82.
135. Li T, Fu L, Wang J, Shi Z. High dose of vancomycin plus gentamicin incorporated acrylic bone cement decreased the elution of vancomycin. *Infect Drug Resist.* 2019; 12:2191-9.
136. Lichstein P, Gehrke T, Lombardi A, Romano C, Stockley I, Babis G *et al.* One-stage vs two-stage Exchange. *J Arthroplasty.* 2014; 29(2):108-11.
137. Lidgren L, Bodelind B, Möller J. Bone cement improved by vacuum mixing and chilling. *Acta Orthop Scand.* 1987; 58(1):27- 32.
138. Lima ALLM, Oliveira PRD. Atualização em infecções em próteses articulares. *Rev Bras Ortop.* 2010; 45(6):520-3.
139. Lindberg L, Önnarfält R, Dingeldein E, Wahlig H. The release of gentamicin after total hip replacement using low- or high-viscosity bone cement. *Inter Orthop.* 1991; 15(4): 305-9.
140. Lorian V. *Antibiotics in laboratory Medicine.* London: Ed. Williams & Wikins; 1980. 1ª ed. pp. 1259.
141. Lorian V. *Antimicrobial combinations in antibiotics in laboratory medicine.* London: Ed. Williams & Wikins; 2005. 5ª ed. Cap 9. p. 365-441.
142. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999; 20(4):250-78.
143. Marconcini JM. Avaliação da qualidade dos cimentos ósseos encontrados no mercado nacional. Projeto de Iniciação Científica - Faculdade de Medicina da USP, São Paulo; 1996.

144. Masri BA, Duncan CP, Beauchamp CP. Long-term elution of antibiotics from bone-cement: an in vivo study using the prosthesis of antibiotic-loaded acrylic cement (PROSTALAC) system. *J Arthroplasty*. 1998; 13(3):331-8.
145. McPherson EJ, Woodson C, Holtom P, Roidis N, Schufelt C, Patzakis M. Periprosthetic total hip infection. Outcomes using a stage system. *Clin Orthop Relat Res*. 2002; (403):8-15.
146. Mendes R. Estudo experimental comparativo dos cimentos nacionais. [tese]. Rio de Janeiro. Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro; 2007.
147. Miller JD, McCreadie BR, Alford AI, Hankenson KD, Golstein SA. Form and function of bone, in Einhorn TA, O'Keefe RJ, Buckwalter JA. Eds: *Orthopaedic Basic Science: Foundations of Clinical Practice*. Rosemont, IL. Am Acad Orthop Surg; 2007. 3^a ed. p. 129-59.
148. Monroe D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol*. 2007; 5(11):e307.
149. Mortazavi S, Schwartzenberger J, Austin M, Purtill J, Parvizi J. Revision Total Knee Arthroplasty Infection. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;(468):2052-9.
150. Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA. Combination treatment of invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington. 2005; 18(1):163-94.
151. Mulazimoglu L, Drenning SD, Muder R. Vancomycin-gentamicin synergism revisited: effect of gentamicin susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40(6):1534-5.
152. Munson F T, Heron D F. Facial reconstruction with acrylic resin. *Am J Surg* 1941; 53(2):291-5.
153. Musib M, Jones J, Chakote K, Hayes W, Saha S. Microhardness of bi-antibiotic-eluting bone cement scaffolds. *Progress in Biomaterials*. 2012;1(1):3-7.
154. Nagatani T. The ultra-high resolution scanning electron microscope and some applications to biological studies. *Biotechniques*. 1989; 7(3):270-5.

155. Nelson CL, Griffin FM, Harrison BH, Cooper RE. In vitro elution characteristics of commercially and noncommercially prepared antibiotic PMMA beads. *Clin Orthop*. 1992; 284:303-9.
156. Nelson CL, Jones RB, Wingert NC, Foltzer M, Bowen TR. Sonication of antibiotic spacers predicts failure during two-stage revision for prosthetic knee and hip infections. *Clin Orthop Relat Res*. 2014; 472(2):2208-14.
157. Nelson CL, McLaren AC, McLaren SG, Johnson JW, Smeltzer MS. Is aseptic loosening truly aseptic? *Clin Orthop Relat Res*. 2005; 437(437):25-30.
158. Neut D, Horn JR, Van Kooten TG, Van der Mei HC, Busscher HJ. Detection of biomaterial-associated infections in orthopaedic joint implants. *Clin Orthop Relat Res*. 2003; 413:261-8.
159. Neut D, Van de Belt H, Van Horn JR, Van der Mei HC, Busscher HJ. Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials*. 2003; 24(10): 1829-31.
160. Neut D, van de Belt H, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. The effect of mixing on gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements. *Acta Orthop Scand*. 2003; 74(6):670-6.
161. Nottrott M, Molster AO, Gjerdet NR. Time dependent mechanical properties of bone cement: An in vitro study over one year. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;83(2):416-421.
162. O'Neill AJ, Miller K, Oliva B, Chopra I. Comparison of assays for detection of agents causing membrane damage in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54(6):1127-29.
163. Olsen AS, Wilson A, O'Malley MJ, Urish KL, Klatt BA. Are sonication cultures of antibiotic cement spacers useful during second-stage reimplantation surgery for prosthetic joint infection? *Clin Orthop Relat Res*. 2018; 476(10):1986-92.
164. Ong KL, Rundell S, Liepins I, Laurent R, Markel D, Kurtz SM. Biomechanical modeling of acetabular component polyethylene stresses, fracture risk, and wear rate following press-fit implantation. *J Orthop Res*. 2009; 27(11):1467-72.

165. Ozturk B, Gunay N, Ertugrul BM, Sakarya S. Effects of vancomycin, daptomycin, and tigecycline on *coagulase-negative staphylococcus* biofilm and bacterial viability within biofilm: an in vitro biofilm model. *Can J Microbiol.* 2016; 62(9):735-43.
166. Palaniappan K, holley RA. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2010; 140(2-3):164-8.
167. Parvizi J, Ghanem E, Joshi A, Sharkey PF, Hozack WJ, RothmanRH. Does excessive anticoagulation predispose toperiprosthetic infection? *J Arthroplasty.* 2007; 22 (6):24-8.
168. Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, Bauer TW, Springer BD, Della Valle CJ *et al.* New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin Orthop Relat Res.* 2011; 459(11):2992-4.
169. Parvizi J, Gehrke T, Chen AF. Proceedings of the international consensus on periprosthetic joint infection. *Bone Joint J.* 2013; 95-B(11):1450-2.
170. Pattyn C, De Geest T, Ackerman P, Audenaert E. Preformed gentamicin spacers in two-stage revision hip arthroplasty: Functional results and complications. *Int Orthop.* 2011; 35(10):1471-6.
171. Penner MJ, Duncan CP, Masri BA. The in vitro elution characteristics of antibiotic-loaded CMW and Palacos-R bone cement. *J Arthrop.* 1999; 14(2):209-14.
172. Penner MJ, Masri BA, Duncan CP. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. *J Arthrop.* 1996; 11(8):939-44.
173. Photo de Eric Erbe, digital colonization by Christopher Pooley, both of United States of America, Agricultural Research Service, EMU. ARS Image Gallery Image Number K11077-1
174. Piper KE, Jacobson MJ, Cofield RH, Sperling JW, Sanchez-sotelo J, Osmon DR *et al.* Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection by use of implant sonication. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(6):1878-84.

175. Portillo ME, Salvadó M, Trampuz A, Siverio A, Alier A, Sorli L *et al.* Improved diagnosis of orthopedic implant-associated infection by inoculation of sonication fluid into blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(5):1622-7.
176. Prigge EK. The treatment of chronic osteomyelitis by the use of muscle transplant or iliac graft. *J. Bone Joint Surg Am.* 1946; 28(3):576-93.
177. Qu X, Zhai Z, Wu C, Jin F, Li H, Wang L *et al.* Preoperative aspiration culture for preoperative diagnosis of infection in total hip or knee arthroplasty. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(11):3830-4.
178. Rand KH, Houk HJ, Brown P, Bennett D. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(3):613-5.
179. Rasyid HN, Van der Mei HC, Frijlink HW, Soegijoko S, Van Horn JR, Busscher HJ *et al.* Concepts for increasing gentamicin release from handmade bone cement beads. *Acta Orthop.* 2009; 80(5):508-13.
180. Raut V, Siney P, Wroblewski B. One-stage revision of infected total hip replacements with discharging sinuses. *J Bone Joint Surg Br.* 1994; 76(5):721-4.
181. Regis D, Sandri A, Samaila E, Benini A, Bondi M, Magnan B. Release of gentamicin and vancomycin from performed spacers in infected total hip arthroplasties: measurement of concentrations and inhibitory in patients drainage fluids and sérum. *Scientific World J.* 2013:1-6.
182. Reilly DT, Burstein AH. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. *J Biomech.* 1975; 8(6):393-405.
183. Rhem BHA. *Pseudomonas: model organism, pathogen, cell factory.* Ed. Willey-VCH; 2008. 1^a ed. p. 216-232.
184. Ribera A, Morata L, Moranas J, Agullo JL, Martinez JC, Lopez Y *et al.* Clinical and microbiological findings in prosthetic joint replacement due to aseptic loosening. *J Infect.* 2014;69(3):235-43.
185. Rotenberg AC, Wilson AE, Hayes JP, O'Malley MJ, Klatt BA. Sonication of arthroplasty implants improves accuracy of periprosthetic joint infection cultures. *Clin Orthop Relat Res.* 2017; 475(7):1827-36.

186. Rudelli S, Uip E, Honda E, Lima ALLM. One-stage of infected total hip arthroplasty with bone graft. *J Arthroplasty*. 2008; 23(8):1165-77.
187. Scales JF, Herschell W. Perspex (methylmethacrylate) in orthopaedics. *Brit Med J*. 1945; 2:245-9.
188. Schafer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommrejt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Dis*. 2008; 1(11):1403-9
189. Schmalzried TP, Amstutz HC, Au MK, Dorey FJ. Etiology of deep sepsis in total hip arthroplasty. The significance of hematogenous and recurrent infections. *Clin Orthop*. 1992; 280:200-7.
190. Scozzolini L, Lichtner M, Ianneta M, Mengoni F, Russo G, Panni AS *et al*. Sonication technique improves microbiological diagnosis in patients treated with antibiotics before surgery for prosthetic joint infections. *New Microbiol*. 2014; 37(3):321-8.
191. Sebastian S, Malhotra R, Sreenivas V, Kapil A, Chaudhry R. Sonication of orthopaedic implants: A valuable for diagnosis of prosthetic joint infections. *J Microbiol Methods*. 2018; 146:51-4.
192. Seyral P, Zannier A, Argenson JN, Raoult D. The release *in vitro* of vancomycin and tobramycin from acrylic bone cement. *J Antimicrob Chemother*. 1994; 33:337-9.
193. Shannon SK, Mandrekar J, Gustafson DR, Rucinski SL, Dailey AL, Segner RE *et al*. Anaerobic thioglycolate broth culture for recovery of *Propionibacterium acnes* from shoulder tissue and fluid specimens. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(2):731-2.
194. Shukla SK, Ward JP, Jacofsky MC, Sporer SM, Paprosky WG, Della Valle CJ. Perioperative testing for persistent sepsis following resection arthroplasty of the hip for periprosthetic infection. *J Arthroplasty* 2010; 25(6 suppl):87-91.
195. Simpson PM, Dall GF, Breusch SJ, Heisel C. *In vitro* elution and mechanical properties of antibiotic-loaded SmartSet HV and Palacos R acrylic bone cements. *Der Orthopade*. 2005; 34(12):1255-62.

196. Smilack JD, Flittie WH, Williams TW Jr. Bone concentrations of antimicrobial agents after parenteral administration. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976; 9(1): 169-171.
197. Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57(10):1539-50.
198. Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33(4):374-8.
199. Spangehl MJ, Masri BA, O'Connell JX, Duncan CP. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am.* 1999; 81(5):672-83.
200. Sterling GJ, Crawford S, Potter JH, Koerbin G, Crawford R. The pharmacokinetics of simplex-tobramycin bone cement. *J Bone Joint Surg.* 2003; 85B, 646-9.
201. Stewart, PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001; 358(9276):135-8.
202. Streuli JC, Exner GU, Reize CL, Merkofer C, Scott CP, Zbinden R. *In vitro* inhibition of coagulase-negative *staphylococci* by vancomycin/aminoglycoside-loaded cement spacers. *Infection.* 2006; 34(2):81–86.
203. Taggart T, Kerry RM, Norman P, Stockley I. The use of vancomycin-impregnated cement beads in the management of infection of prosthetic joints. *J Bone Joint Surg (Br).* 2002; 84(1):70-2.
204. Takahira N, Itoman M, Higashi K, Uchiyama K, Miyabe M, Naruse K. Treatment outcome of two-stage revision total hip arthroplasty for infected hip arthroplasty using antibiotic-impregnated cement spacer. *J Orthop Sci.* 2003; 8(1):26-31.

205. Tani S, Lepetsos P, Stylianakis A, Vlamis J, Birbas K, Kaklamanos L. Superiority of the sonication method against conventional periprosthetic tissue cultures for diagnosis of prosthetic joint infections. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2018; 28(1):51-7.
206. Taylor R, Maryan C, Verran J. Retention of oral microorganisms on cobalt chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. *J Prosthet Dent*. 1998; 80(5):592-7.
207. Terrier A, Büchler P, Farron A. Bonecement interface of the glenoid component: Stress analysis for varying cement thickness. *Clin Biomech*. 2005; 20(7):710-7.
208. Toms AD, Davidson D, Masri BA, Duncan CP. The management of periprosthetic infection in total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg (Br)*. 2006; 88(2):149-55.
209. Tong W, Wang R, Chai D, Li Z, Pei F. *In vitro* activity of cefepime combined with sulbactam against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 28(5):454-6.
210. Torholm C, Lidgren L, Kahlmoter G. Total hip joint arthroplasty with gentamicin-impregnated cement. A clinical study of gentamicin excretion kinetics. *Clin Orthop*. 1983; 181:99-106.
211. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR *et al*. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 2007; 357(7):654-63.
212. Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis. *Curr Infect Dis Rep*. 2008; 10(5):394-403.
213. Trebse R, Pisot V, Trampuz A. Treatment of infected retained implants. *J Bone Joint Surg Br*. 2005; 87(2):249-56.
214. Tsukayama DT, Estrada R, Gustilo RB. Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. *J Bone Joint Surg Am*. 1996; 78(04):512-523.

215. Tsukayama DT, Goldberg VM, Kyle R. Diagnosis and management of infection after total knee arthroplasty. *J Bone Surg Am.* 2003; 85 A(Suppl1):S75-80.
216. Tunney MM, Patrick P, Curran MD, Ramage G, Hanna D, Nixon JR *et al.* Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA Gene. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(10):3281-90.
217. Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR, Anderson N, Hanna D *et al.* Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg.* 1998; 80(4):568-72.
218. Tunney MM, Ramage G, Patrick S, Nixon JR, Murphy PG, Gorman SP. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from orthopedic implants following revision surgery. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(11):3002-5.
219. Van de Belt H, Neut D, Schenk W, Van Horn JR, Van der Mei HC, Busscher HJ. Gentamicin release from polymethylmetacrylate bone cements and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Acta Orthop Scand.* 2000; 71(6):625-629.
220. Van de Belt H, Neut D, Schenk W, Van Horn JR, Van der Mei HC, Busscher HJ. Infection of orthopedic implants and the use of anti-biotic-loaded bone cements: A review. *Acta Orthop Scand.* 2001; 72(6):557-71.
221. Van de Belt H, Neut D, Shenk W, Van Horn JR, Van Der Mei HC, Busscher HJ. *Staphylococcus aureus* biofilm formation on different gentamicin-loaded polymethylmethacrylate bone cements. *Biomaterials.* 2001; 22(12):1607-11.
222. Van Driek FM, Albers CGM, Van Hooff ML, Meis JF, Goosen JHM. Low sensibility of implant sonication when screening for infection in revision surgery. *Acta Orthop.* 2017; 88(3):294-9.
223. Van Eerdenbrugh B, Taylor LS. Application of mid-IR spectroscopy for the characterization of pharmaceutical systems. *Int J Pharm.* 2011; 417(1-2):3-16.
224. Van Oss CJ. Aspecific and specific intermolecular interactions in aqueous media. *J Mol Recognit.* 1990; 3:128-36.

225. Van Viugt TAG, Arts JJ, Geurts JAP. Antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads and spacers in treatment of orthopedic infections and the role of biofilm formation. *Front Microbiol.* 2019; 10:1-11.
226. Von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to *coagulase-negative staphylococci*. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2(11):677-85.
227. Wahlig H, Dineldein E. Antibiotics and bone cements: experimental and clinical long-term observations. *Acta Ortop Scand.* 1980; 51:49-56.
228. Watanakunakorn C, Tisone JC. Synergism between vancomycin and gentamicin or tobramycin for methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982; 22(5):903-5.
229. Webb JC, Spencer RF. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br.* 2007; 89:851-857.
230. Weinstein AM, Bingham DN, Sauer BW, Lunceford EM. The effect of high pressure insertion and antibiotic inclusion upon the mechanical properties of polymethylmethacrylate. *Clin Orthop.* 1976; 121:67-73.
231. Winkler H. Rationale for one Exchange of infected hip replacement using uncemented implants and antibiotic impregnated bone graft. *Int J Sci.* 2009; 6(5):247-52.
232. Yano MH, Klautau GB, Silva CB, Nigro S, Avanzi O, Mercadante MT et al. Improved diagnosis of infection associated with osteosynthesis by use of sonication of fracture fixation implants. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(12):4176-82.
233. Ziessman HA, O'Malley JP, Thrall JH. Nuclear medicine: the requisites. Boston: Ed. Elsevier; 2013. 4 ed. pp. 464.
234. Zimmerli W, Sendi P. Orthopaedic biofilm infections. *APMIS.* 2017; 125(4):353-64.
235. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 2004; 351(16):1645-54.

236. Zimmerli W. Infection and musculoskeletal conditions: Prosthetic-joint-associated infections. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006; 20(6):1045-63.

237. Zivic F, Babic M, Grujovic N, Mitrovic S, Favaro G, Gaunil M. Effect of vacuum-treatment of deformation properties of PMMA bone cement. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012; 5(1):129-38.