

T.C
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

METİSİLİNE DİRENÇLİ STAFİLOCOCCUS AUREUS (MRSA)
DENEYSEL SIÇAN OSTEOMYELITİ MODELİNDE
İMLANTIN FOSFOMİSİN İÇEREN POLİ-(D,L)LAKTİK ASİT
(PDLA) İLE KAPLANMASININ PROFİLAKSİDEKİ
ETKİNLİĞİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ANIL GÜLCÜ

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. ALP AKMAN

DENİZLİ – 2015

T.C
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

METİSİLİNE DİRENÇLİ STAFİLOCOCCUS AUREUS (MRSA)
DENEYSEL SIÇAN OSTEOMYELITİ MODELİNDE
İMLANTIN FOSFOMİSİN İÇEREN POLİ-(D,L)LAKTİK ASİT
(PDLA) İLE KAPLANMASININ PROFİLAKSİDEKİ
ETKİNLİĞİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ANIL GÜLCÜ

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. ALP AKMAN

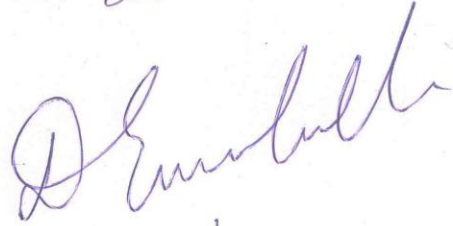
DENİZLİ – 2015

Yrd. Doç. Dr. Alp AKMAN danışmanlığında Dr. Anıl GÜLCÜ tarafından yapılan “Metisiline Dirençli Stafilococcus Aureus (MRSA) deneysel sıçan osteomyeliti modelinde implantın fosfomisin içeren Poli-(D,L)laktik asit (PDLA) ile kaplanması profilaksisinde etkinliği” başlıklı tez çalışması 17/06/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN :Prof. Dr. Ahmet Fahir DEMİRKAN



ÜYE :Prof. Dr. Emre ÇULLU



ÜYE :Yrd. Doç. Dr. Alp AKMAN



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI
Dekan

Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimim boyunca bana her konuda desteğini esirgemeyen tez hocam Yrd.Doç.Dr.Alp AKMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ortopedi ve Travmatoloji ihtisasım boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Fahir DEMİRKAN, Prof. Dr. Esat KITER, Doç. Dr.Murat OTO, Doç. Dr.Semih AKKAYA, Yrd. Doç. Dr. Nusret ÖK, Yrd. Doç. Dr. Ali Çağdaş YÖRÜKOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Harun Reşit GÜNGÖR'e teşekkürü borç bilirim. Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım değerli asistan arkadaşlarıma bu zorlu süreçteki desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca tez verilerinin deney hayvanları ile ilgili bölümünü destekleyen Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi görevlilerine; mikrobiyolojik analizler için Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı akademisyen ve çalışanlarına emeklerinden ötürü teşekkür ederim.

Son olarak tıpta uzmanlık eğitimim ve tez dönemim süresince desteğini her zaman hissettiğim eşim ve aileme teşekkür ederim.

Dr.Anıl GÜLCÜ

Denizli 2015

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLOLAR DİZİNİ	IX
RESİMLER DİZİNİ	X
ÖZET	XI
İNGİLİZCE ÖZET	XIII
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
OSTEOMYELIT	5
Etyoloji.....	7
Bulgular.....	8
<i>Klinik</i>	8
<i>Laboratuvar</i>	8
<i>Görüntüleme</i>	8
<i>Mikrobiyoloji</i>	9
Tedavi.....	10
<i>Cerrahi</i>	10
<i>Antibiyoterapi</i>	10
S. AUREUS İLİŞKİLİ İMPLANT ENFEKSİYONLARI	16
BİYOMATERYAL YÜZEYİ VE MODİFİKASYONLARI	17
GEREÇ VE YÖNTEM	19
Etik Kurul Onayı.....	19
Bakteri ve İnokülasyonun Hazırlanması.....	20
Sıçanlar ve Operatif Süreç.....	21
İzlem.....	22
Vücut Ağırlığı.....	23
Vücut Sıcaklığı.....	23
Radyografik Değerlendirme.....	23
Kan Tahlili.....	24
Mikrobiyolojik Değerlendirme	25
Patoloji	27
İstatistik.....	29
BULGULAR	30

TARTIŞMA	37
KISITLILIKLAR	42
KAYNAKLAR	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

- BT: Bilgisayarlı Tomografi
CFU: Koloniform ünite
ESM: ekstrasellüler matriks
ESR: eritrosit sedimentasyon hızı
GlpT: L- α -gliserolfosfat transport sistemi
MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu
MRI: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MRSA: metisiline dirençli stafilococcus aureus
MSSA: Metisiline duyarlı Stafilokokus Aureus
PET: Pozitron Emisyon Tomografi
PDLLA: Poli-(D,L)laktik asit
TSB: Tryptic Soy Broth
UhpT: heksoz fosfat transport
İV: İntravenöz
H&E: Hematoksilen eozin
SD: Standart sapma

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 Cierny-Mader Anatomik Sınıflaması	6
Şekil 2 Gentamisin'in kimyasal yapısı	13
Şekil 3 Fosfomisin'in kimyasal yapısı	13

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1 Osteomyelitin sınıflandırılması	5
Tablo 2 Sık osteomyelit etkenleri	7
Tablo 3 Stafilokoklara bağlı gelişen kemik, eklem veya implant ile ilişkili enfeksiyonların tedavisi ile ilgili hayvan çalışmaları	11
Tablo 4 Fosfomisin'in erişkinlerde intravenöz olarak etkili bulunduğu çalışmaların özeti	14
Tablo 5 Grupların takip süresince vücut ağırlığı için ortalama değerler ve gruplar arasında istatistiksel değerlendirme	31
Tablo 6 Grupların takip süresince vücut sıcaklığı için ortalama değerler ve gruplar arasında istatistiksel değerlendirme	32
Tablo 7 Grupların çalışma sonunda değerlendirilen patoloji skoru için ortalama değerler	33
Tablo 8 Grupların takip süresince radyoloji skoru için ortalama değerler ve gruplar arasında istatistiksel değerlendirme	34
Tablo 9 Grupların takip süresince alınan kan numunelerinde hemoglobin için ortalama değerler ve gruplar arasında istatistiksel değerlendirme	34
Tablo 10 Grupların takip süresince alınan kan numunelerinde beyaz kan hücresi için ortalama değerler ve gruplar arasında istatistiksel değerlendirme	35
Tablo 11 Grupların koyun kanlı agarda üreme görülen implant sayısı	36
Tablo 12 Grupların TSB'de üreme görülen implant sayısı	36

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 1	Metisiline Dirençli Stafilococcus Aureus'un elektron mikroskop görüntüsü 16
Resim 2	S. Aureus ve polisakkarit yapının elektron mikroskop görüntüsü 17
Resim 3	Fosfomisin disk duyarlılık testi 20
Resim 4	Cerrahi alanın görüntüsü 22
Resim 5	Cerrahi prosedür 22
Resim 6	Radyolojik olarak değerlendirilen 3 alan; R1: proksimal epifiz ve metafiz, R2: diyafiz, R3: distal epifiz ve metafiz 22
Resim 7	(a) Grup1-Kaplamasız(Kontrol), (b) Grup2-(PDLLA kaplı), (c) Grup3-(Gentamisin içeren PDLLA kaplı), (d) Grup4-(Fosfomisin içeren PDLLA kaplı). 24
Resim 8	Araştırmada deneklerden intrakardiyak enjeksiyon ile kan örneği alınması ile ilgili görüntü 25
Resim 9	Kan örneklerinin analiz için hazırlanması 25
Resim 10	Kültür için toplanan kan örnekleri 26
Resim 11	Agar besiyerine ekilmiş Kirschner teli 27
Resim 12	TSB agara ekim ve değerlendirme 27
Resim 13	Mikroskop ile histopatolojik değerlendirme 28

ÖZET

Metisiline Dirençli Stafilococcus Aureus (MRSA) deneysel sıçan osteomyeliti modelinde implantın fosfomisin içeren Poli-(D,L)laktik asit (PDLLA) ile kaplanmasının profilaksideki etkinliği.

Dr. Anıl Gülcü

Ortopedik cerrahi alanında implant kaynaklı enfeksiyonların azaltılması her geçen gün daha fazla önem kazanmaktadır. Bu çalışmada MRSA suşu kullanılarak yapılan deneysel sıçan osteomyeliti modelinde implantın fosfomisin içeren Poli-(D,L)laktik asit ile kaplanmasının profilaksideki etkinliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Araştırma için Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı alındı. Araştırma için 40 adet Wistar Albino cinsi sıçanların sol tibialarına 10^3 cfu/10 μ L olacak şekilde bakteri süspansiyonu enjekte edilerek osteomyelit oluşturuldu ve rastgele dört gruba ayrıldı. Grup 1'e kaplamasız Kirschner teli (Kontrol), Grup 2'ye PDLLA kaplı Kirschner teli (Kontrol), Grup 3'e gentamisin içeren PDLLA kaplı Kirschner teli, Grup 4'e fosfomisin içeren PDLLA kaplı Kirschner teli implante edildi. Tüm deneklerin birinci gün , 3., 7., 14., 21., 28., 35. ve 42. günlerde ölçülen rektal vücut sıcaklıkları ve vücut ağırlıkları kaydedildi. Radyolojik görünümler An ve arkadaşları tarafından modifiye edilen skorlama sistemine göre birinci gün , 7., 14., 21., 28., 35. ve 42. günlerde değerlendirildi. Deneklerden intrakardiyak enjeksiyon ile birinci gün , 14., ve 42. günlerde alınan kan örnekleri rutin laboratuvar parametreleri açısından incelendi. 42. gün çıkarılan Kirschner telleri %5 koyun kanlı agara ekildi ve takiben 5ml Tryptic Soy Broth (TSB) solüsyon içine kondu. Histopatolojik inceleme için deneklerin tibialarından elde edilen örnekler rutin işlemler sonrası hemotoksilen eozin ile boyandı. Petty ve arkadaşları tarafından tanımlanan değişkenlere göre semikantitatif olarak değerlendirildi. İstatistiksel analizler SPSS 15 programı kullanılarak yapıldı.

Grup 3'teki deneklerin ortalama radyoloji skorları diğer gruptaki deneklere göre anlamlı olarak düşük olup bu fark 42. günde en yüksek düzeye ulaşmıştı. ($p<0.001$). Mirobiyolojik incelemede ise Grup 3'te hem koyun kanlı agarı, hem de TSB solüsyonunda %20 üreme görülürken, Bu oran Grup 4'te ise %80 oranında olmuştur. Grup 1 ve 2'de bütün kültürlerde üreme oluşmuştur. Grup 3'te patoloji skoru, diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşüktü ($p=0.005$).

MRSA ilişkili implant enfeksiyonunun profilaksisi bakımından, PDLA kaplamasına fosfomisin eklenmesi gentamisin eklenmesinden daha üstün değildi. Fosfomisin eklenen PDLA kaplamanın sadece kaplamasız grupdan daha üstün olabileceği bulundu.

Anahtar kelimeler: Fosfomisin, gentamisin, implant enfeksiyonu, MRSA, sıçan, Poli-(D,L)laktik asit kaplama, PDLA, hayvan modeli, osteomyelit

SUMMARY

Effectiveness of coating implant with Poly-(D,L)lactic acid (PDLLA) including fosfomycin in the prophylaxis of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) experimental rat osteomyelitis model

Dr. Anıl Gülcü

Reduction of implant-associated infections is becoming more and more important in orthopedic surgery. The aim of this study is to investigate effectiveness of coating implant with Poly-(D,L)lactic acid (PDLLA) including fosfomycin in the prophylaxis of experimental rat osteomyelitis model occurred by using Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA).

This study was approved by Animal Research Ethics Committee. For this study, osteomyelitis was established by 10^3 cfu/10 μ L bacteria suspension injection to the left tibias of forty Wistar albino rats and divided into four groups randomly. Uncoated Kirschner wire was implanted to group 1 (Control), PDLLA coated Kirschner wire was implanted to Group 2 (Control), PDLLA which include gentamicine coated Kirschner wire was implanted to Group 3, PDLLA which include fosfomycin coated Kirschner wire was implanted to Group 4. Body weight and rectal body temperature were recorded for all subjects on the first, 3rd, 7th, 14th, 21st, 28th, 35th and 42nd day. Radiographs were taken on the first, 7th, 14th, 21st, 28th, 35th and 42nd day and assessed according to a modified score defined by An et al. Blood samples taken from the subjects with intracardiac injection on the first, 14th and 42nd day were analyzed for routine laboratory parameters. Kirschner wire was removed on the 42nd day and swapped on to 5% sheep blood agar and than is inoculated with 5ml TSB solution agar. For histopathological examination, samples obtained from rats tibias were stained with hematoxylin-eosin (HE) after routine procedures. They were evaluated semiquantitatively according to the variables described by Petty et al. Statistical analyzes were performed using SPSS 15 software(IBM,ABD).

Mean radiology scores of subjects in Group 3 was significantly lower than the other groups and this difference was more evident on the day 42. ($p < 0.001$)

In microbiological evaluations, %20 bacterial growth was observed in Group 3 which was %80 in Group 4 in both of sheep blood agar and TSB solution. Bacterial growth is observed in all culture mediums in Group 1 and 2. Pathology score in group 3 was significantly lower than other grup. ($p = 0.005$).

At the end of study, we found that adding fosfomicin instead of Gentamycin is not effective to prevent MRSA infection in rats. It was just better than uncoating.

Keywords: Fosfomicin, gentamycin, implant infection, MRSA, rat, polymer coating, PDLA, animal model, osteomyelitis

GİRİŞ

Ortopedik implantların ağırlıklı olarak kullanım alanı kemik fiksasyonu ve eklem replasmanıdır. İnternal fiksasyon malzemelerine, özellikle kemik kırıklarında geçici bir süreliğine ihtiyaç duyulur ve kemiğin iyileşmesi tamamlandıktan sonra fiksasyon malzemesi çıkarılabilir. Bu implantlar enfeksiyonlara karşı hassastır (1). Son birkaç dekatta ameliyat ortamındaki ve cerrahi işlemler sırasındaki asepsi kontrollerinin yürütülmesi ve uygun antibiyotik profilaksilerinin tanımlanması ile enfeksiyonlardan korunma ve tedavi alanında önemli gelişmeler sağlanmıştır (2). Ancak özellikle ortopedik cerrahiler sonrası enfekte ortopedik implantlardan izole edilen metisiline dirençli stafilococcus aureus (MRSA) prevelansı ile ilgili endişeler artmaktadır (3).

Mikroorganizmalar yüzeylere yapışır ve ekstrasellüler polisakkaridler üreterek biyofilm tabakası oluşturur. Kalıcı implant kullanılmasını gerektiren durumlarda (eklem replasmanı gibi) enfeksiyonun eradikasyonu için biyofilmin tamamen yok edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle protez çevresi enfeksiyonlarında cerrahi debridman, bir veya iki aşamalı değişim veya yeniden implantasyon olmadan protezin çıkarılması uygulanabilir (4). Cerrahi tedavi yaklaşımların yanında biyofilimde kolonize olan bakteriler üzerine etkili bir ajan ile birlikte uzun dönem antibiyotik tedavisi de gereklidir. Özellikle Stafilokoklar üzerine etkili olan rifampisin bu özelliklere sahip bir antibiyotiktir. Ancak direnç gelişiminin engellenmesi için rifampisin mutlaka farklı antimikrobiyal ilaçlarla birlikte kullanılmalıdır. Bu antibiyotiklerin biyofilmin olduğu bölgede yeterli kontrasyonlarda salınımın yapılması gerekmektedir. Bu amaçla Poli-(D,L)laktik asit (PDLLA) biyouyumluluk profili ile yaygın olarak kullanılan bir materyaldir (2). Tanımlanan bu tedavi yaklaşımları ile ortopedik implantlardan kaynaklanan enfeksiyonlar hastaların büyük çoğunluğunda eradike edilebilmektedir (5).

Birçok antibiyotiğin biyofilm üzerine sınırlı etkisi olmasından dolayı, enfeksiyondan korunma ve oluşan enfeksiyonun tedavisine yönelik yeni seçeneklere

ihtiyaç duyulmaktadır. Bakterilerin implant yüzeyine yapışmasını ve biyofilm oluşumunu azaltan antimikrobiyal peptitler ile implant yüzeyinin kaplanması, implant kaynaklı enfeksiyonlarda potansiyel olarak koruyucu rol oynayacaktır (6). Bu önemli adımlara rağmen implant kaynaklı enfeksiyonların erken tanısı, tedavide kullanılacak yeterli antimikrobiyal kombinasyonları, direnç gelişiminin engellenmesi ve uygun yüzey modifikasyonları konusunda araştırmalar devam etmektedir (7).

Bu çalışmada da MRSA deneysel sıçan osteomyeliti modelinde implantı fosfomisin içeren Poli-(D,L)laktik asit (PDLLA) ile kaplamanın profilaksidedeki etkinliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

Günden güne daha fazla sayıda insanın implanta ihtiyaç duyduğu günümüzde, ortopedik cerrahi alanında implant kaynaklı enfeksiyonların azaltılması daha fazla önem kazanmaktadır (8). Vücudun bir bölgesinde özellikle açık kırık sonrasında (9) implant varlığının enfeksiyonlara duyarlılığı arttırdığı, konağın savunma sistemini etkinleştirdiği ve bağışıklık sistemini uyardığı bilinmektedir (10). Vücut fonksiyonlarının restorasyonu veya desteklenmesi amacıyla kullanılan kalıcı implantlarda veya geçici cihazlarda biyomateryal ile ilişkili enfeksiyonlar izlenebilir. Yaşlanan popülasyonda biyomateryal kullanımı giderek artmakla birlikte biyomateryal ile ilişkili enfeksiyonların sıklığını azaltmak için az sayıda biyomateryal tasarlanabilmiştir. Bir biyomateryalin akıbeti, ekstrasellüler matriks (ESM) proteinleri, konak hücre (fibroblast, osteoblast, endotel hücreleri) integrasyonu ve bakteriyel kolonizasyonun katıldığı yüzeye tutunmak için bir yarış sonunda belirlenir (11). Canlı dokusuna implant yerleştirilmesi sonunda ESM proteinlerinden oluşan bir tabaka elde edilir. Ortopedik protezlerde dokuya özel ESM bileşenlerine ve ESM proteinleri ile kaplı yüzeye aktif bakteriyel adezyon implant üzerinde kolonizasyon ve oluşabilecek enfeksiyonunun belirleyicisidir (12). Ekstrasellüler matriks; fibrinojen, fibronektin, albümin, kollajen ve vitronektin gibi makromoleküllerin karışımından oluşan biyolojik olarak aktif bir tabakadır (13). Ekstrasellüler matriks; proliferasyon, adezyon, migrasyon, polarite, farklılaşma ve apoptosis gibi hücrelerin yaşamsal davranışlarını ve özelliklerini belirlemesi nedeniyle hayati öneme sahip son derece dinamik bir yapıdır. Konak hücrenin bu davranışları kendisini çevreleyen ESM'nin bileşenleri ve yapısal organizasyonu tarafından etkilenir (14). Konak hücreleri ve ESM arasındaki etkileşimler integrinler gibi spesifik reseptörlerin aracılığı ile gerçekleşir. Sekiz çeşit β alt birimi ve 18 çeşit α alt biriminden oluşan 25 farklı integrin heterodimeri birçok ESM proteini ile ökaryot hücre sitoskeletonu arasındaki bağlantıyı sağlar. Bu integrinler, hücre proliferasyonu ile matriks yeniden şekillenmesini düzenleyen başta fibronektin ve kollajen olmak üzere konak ESM proteinlerini bağlar. Fibronektin fragmanları

integrinler üzerinden üretilen sinyal ile pro-enflamatuar ve pro-katabolik bir cevabı aktive eder. Bu durum eğer kontrol altına alınamazsa ilerleyici matriks dejenerasyonuna neden olur (15). Ekstrasellüler matriks sadece konak hücrelerin değil bakteri hücrelerinin de tutunduğu ve kolonize olduğu bir yüzeydir. Biyomateryal yüzeyine ulaşan ve kuvvetli bir şekilde bağlanan fibroblast gibi hücreler bakterilerin canlı bir hücre yüzeyiyle karşılaşmasını sağlar. Fonksiyonel olarak konak savunma mekanizmalarına sahip olan bu canlı hücre tabakası bakteriyel yapışma ve kolonizasyona karşı direnç gösterir (16). Bununla birlikte *Staphylococcus aureus* gibi gram pozitif bakterilerin konak hücrenin plazma ve ESM proteinlerinin bağlanmasını arttıran birçok yüzey adezini açığa çıkardığı bilinmektedir. Fibronektini bağlayan mikrobiyal yüzey bileşenlerini tanıyan adeziv matriks moleküllerini açığa çıkaran bu bakteriler, birbirine benzer olarak 40-50 aminoasit kalıntı motifinin 3-6 tekrarından oluşan primer ligand bağlayıcı alanlar içerirler (17).

Kırık oluşumu sonrasında ilgili alanı enfeksiyondan korumak için yeterli yara debridmanı ile ölü veya sağlıklı olmayan dokunun uzaklaştırılması, bakteri inokülasyonunu engellemek için doku lavajı, kırığın stabilizasyonu ve yumuşak dokunun onarımı sonrası kapatılması önerilmektedir. Kırıklarda kullanılacak implantların seçimi yaralanmanın anatomik yerine, parçalı olup olmamasına, eşlik eden diğer yaralanmalara, cerrahın deneyimine ve tercihine bağlıdır. Kapalı ve açık kırıklarda kullanılabilen uzvun rijit olarak internal fiksasyonu erken mobilizasyon imkanı sağlar. Ancak kontamine olmuş veya kemiğin parçalanması nedeniyle ilave hasarların olduğu durumlarda internal fiksasyon önerilmez (18,19). Bu tür müdahalelerde sıklıkla parçalı kırıklara stabilite sağlayan ve daha az invaziv olan eksternal fiksasyon yöntemleri kullanılır. Eksternal fiksasyonlardaki temel sorun ise tedavi edilmez ise osteomyelite neden olabilen pin yolu enfeksiyonudur (20). Tel veya pin yerleştirilmesindeki teknik yetersizlik, yerleştirme sırasında doku sıcaklığının artması, implantın vücutta kalış süresi, uygulama alanındaki cilt hareketleri ve implantın kas içinde yerleşimi pin yolu enfeksiyonu için yatkınlık kazandıran etkenler arasındadır. Bu enfeksiyonlar sıklıkla *S. aureus* ve *S. Epidermidis* kaynaklıdır ve ağızdan antibiyotikler ile tedavi edilebilir. Bazen enfekte olmuş pinin temizlenmesi gibi yeterli enfeksiyon tedavisi ve uygun antibiyotiklere

rağmen bu enfeksiyonlar devam edebilir. Enfekte eksternal fiksasyon cihazları ile ilgili sorunlar; fiksasyon materyalinin ve kemiğin stabilitesini etkileyen pin gevşemesi, osteomyelite yol açabilen muhtemel derin doku ve kemik enfeksiyonlarının oluşmasını kapsar. Pin yolu enfeksiyonlarında karşılaşılan bir diğer sorun ise eksternal fiksasyon cihazının intramedüller çivi ile değiştirilmesinden sonra derin enfeksiyon insidansının artmış olmasıdır. Bu oran pin yolu enfeksiyonu olmayanlarda %6'dan az iken pin yolu enfeksiyonu olanlarda %71'e kadar bildirilmiştir (21,22).

OSTEOMYELIT

Osteomyelit “osteon”, “myelos”, ve “itis” kelimelerinden türetilmiş ve mikroorganizmaların enfeksiyöz ve enflamatuvar süreçler sonunda kemik ve kemik iliğinde hasar yaratması ile kendini gösteren ilerleyici bir hastalık olarak tanımlanmıştır (23).

Hastalığın sınıflandırılmasının temeli, hastalığın süresine, mekanizmasına ve konağın cevabına dayanır (24) (Tablo 1). Hem anatomik lokalizasyonunu hem de hastanın fizyolojik durumunu dikkate alan Cierny-Mader Sınıflaması'da yaygın olarak kullanılır (Şekil 1).

Tablo1. Osteomyelitin sınıflandırılması (25)

Osteomyelitte sınıflama

- A. Süreye Göre Sınıflandırma
 - I. Akut osteomyelit
 - II. Subakut osteomyelit
 - III. Kronik osteomyelit
 - a- Aktif kronik osteomyelit
 - b- İnaktif kronik osteomyelit
 - B. Oluş mekanizmasına göre sınıflandırma
 - I. Eksojen osteomyelit
 - a- Travmatik
 - b- İyatrojenik
 - c- Bulaşıcı odak enfeksiyonu
 - II. Hematojen osteomyelit
-

tablonun devamı.

C. Konağın cevabına göre sınıflandırma

- I. Piyojenik osteomyelit: gram (+), gram (-), anaeroblarla oluşur.
- II. Granülatöz osteomyelit: aside dirençli bakteriler, spiroketler, mantarlarla oluşur.

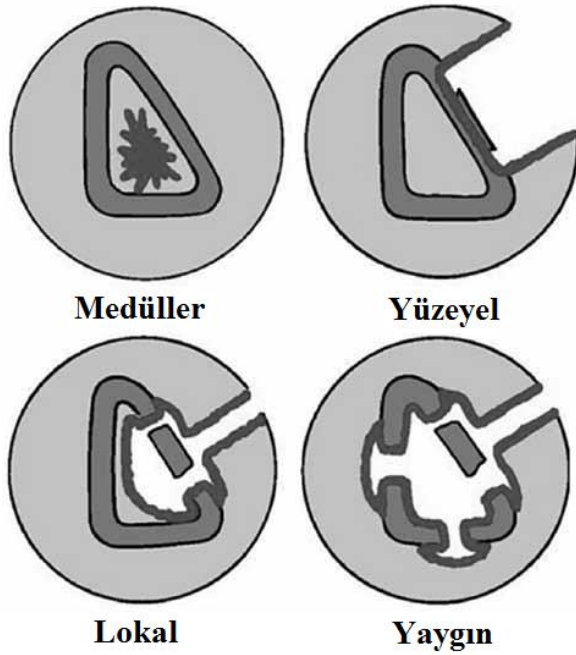
D. Anatomik Sınıflama

- Tip I. Medüller osteomyelit
- Tip II. Yüzeysel osteomyelit
- Tip III. Lokalize osteomyelit
- Tip IV. Diffüz osteomyelit

E. Fizyolojik Sınıflama

- Sınıf A. İyi sistemik defans, iyi lokal vaskülarite
- Sınıf B. Lokal (L), sistemik (S) veya kombine (L, S) olarak defansı baskılanmış
- Sınıf C. Defansı şiddetli baskılanmış, minimal sakatlık cerrahiye aday değil, tedavi hastalığın kendisinden daha kötü sonuçlara yol açar.

(Oto M. 2008'den tabloya uyarlanmıştır.)



Şekil 1. Cierny-Mader Anatomik Sınıflaması (25)

Etyoloji

Osteomyelit, çoğu zaman bakteriyel kökenli olup genel olarak iki yolla oluşur (26); hematogen yayılım ile oluşan osteomyelit, bulaşma ile oluşan osteomyelit (cerrahi, travma, komşu enfeksiyon odağı). Sık osteomyelit etkenleri Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. Sık osteomyelit etkenleri (25)

Sık Osteomyelit Etkenleri

Sık (%50’den fazla)

Stafilokokus aureus
Koagülaz-negatif stafilokok

Az sık (%25)

Streptokok
Enterokok
Psödomonas C türleri
Enterobakter türleri
Proteus türleri türleri
Escherichia coli
Serratia türleri
Anaeroblar (Peptostreptokok türleri, klostridium türleri, bakteroides fragilis)

Nadir

Mikobakterium tuberculosis
Mikobakterium avium kompleks
Rapidly growing mycobacteria
Dimorphik fungi
Kandida türleri
Aspergillus türleri
Mikoplazma türleri
Tropheryma whipplei
Brusella türleri
Salmonella türleri
Actinomyces

Berberi ve ark. 2005 ’ten uyarlanmıştır.

Bulgular

Klinik bulgular, öykü, fizik muayene, kültür ve histopatoloji, laboratuvar testleri, sintigrafi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme, pozitron emisyon tomografisi osteomyelit tanı ve takibinde kullanılan yöntemlerdir (25).

Klinik

Öykü ve muayene bulguları ile tanı konulabilmekle birlikte bulgular görüntüleme, mikrobiyoloji ve histopatoloji ile teyit edilmelidir. Hastalarda genel olarak ateş, üşüme-titreme, kırgınlık, letarji, yorgunluk gibi özgül olmayan enfeksiyon yakınmaları izlenir. Enfeksiyon alanında lokal ağrı veya fistül oluşumu görülebilir. Akut osteomyelitte tablo birkaç günlük iken, subakutta birkaç hafta, kronik osteomyelitte ise aylar ve yıllar boyu süren ağrılar vardır ve fistül varlığı tipik tanı koydurucudur.

Laboratuvar

Osteomyelitin tedavi şeklinin belirlenmesinde erken tanısı ve mikrobiyolojik testler önemli rol oynar. Biyopsi ve kültür altın standarttır. Hastanın öyküsü, muayene bulguları, görüntüleme yöntemleri ve mikrobiyolojik testler tanı destekleyen unsurlardır. Lökosit sayısı, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve CRP genellikle artmıştır. Kan kültürü antibiyoterapiden önce veya en geç 48 saat içinde değerlendirilmelidir.

Görüntüleme

Enfeksiyondan 2-3 hafta sonra direkt grafiler ile yumuşak doku şişliği, eklem mesafesinde değişiklikler, kemik destrüksiyonu ve periosteal reaksiyon izlenebilir. Ultrasonografi, yumuşak dokudaki pürülan materyalin saptanmasında yararlı olabilir. Bilgisayarlı Tomografi (BT) ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) yöntemleri radyografinin normal olduğu durumlarda; kortikomedüller destrüksiyonu, periost reaksiyonunu, eklem hasarını ve yumuşak doku yayılımının daha erken gösterilmesi

amacıyla kullanılabilir. Bilgisayarlı tomografi sekestrumun tespitinde ve iğne biopsisine rehberlik için de yararlıdır. Kemik sintigrafisinde radyofarmasötik maddeler metabolik aktivitenin arttığı kemik bölgelerine bağlanır ve akut osteomyelitin erken saptanmasında son derece duyarlıdır. Üç fazlı yapılan görüntüleme sıcak alanlar, yeni kemik oluşumunu ifade eder. Osteomyelitte üç fazda da artmış tutulum beklenir. Pozitron Emisyon Tomografi (PET), özellikle kronik osteomyelit tanısında şüpheli olgularda ilk tercih edilmesi gereken incelemedir (27-30).

Mikrobiyoloji

Osteomyelitin tanısında temel prensip olarak kan kültürleri ve kemik doku örneklemeleri antimikrobiyal ajanları başlamadan önce yapılmalıdır. Etkin mikroorganizmanın tespitinde swap kültürleri genellikle yetersizdir. Cerrahi örnekler veya perkutan kemik biyopsisinden elde edilen kültürler tercih edilmelidir. Tanısal sensitiviteyi arttırmak için kemik doku örneklerinden histopatolojik inceleme de yapılmalıdır (31).

Tedavi

Osteomyelitte tedavinin temel unsuru nekrotik dokunun temizlenmesi, ölü boşlukların doldurulması ve etkin bir antibiyoterapidir. Tedavinin belirlenmesinde Cierny-Mader Sınıflaması önem taşır. Bu sınıflama hem hastalığın anatomik lokalizasyonunu hem de hastanın fizyolojik durumunu dikkate alır. Evre 1 hastalıkta genellikle akut hematojen yayılım sonucu oluşur ve medullaya sınırlıdır. Antibiyoterapiye cevap verir ve cerrahi debridmana gerek duyulmayabilir. Evre 2’de kortikal yüzey örtünme defektine bağlı yüzeysel enfeksiyonu görülür ve erken tanınırsa antibiyoterapi ile tedavi edilebilir. Evre 3 ve 4 hastalıkta derin dokular etkilenmiştir. Evre 3’te eksizyonu sırasında stabiliteyi bozmaya neden olmayacak kortikal sekestr, Evre 4’te tanı veya debridman ile tedavi anında mekanik instabilite beklenen enfeksiyon bulguları mevcuttur. Evre 3 ve 4 ‘te hem medikal hem de cerrahi tedavi uygulanır. Her evrede hastanın durumu ve eşlik eden hastalıkları

tedavi sonuçlarını etkiler. Fizyolojik sınıflamada; Sınıf 1: enfeksiyon ve cerrahi tedaviye normal yanıt, Sınıf 2: yetersiz bağışıklık ve yara iyileşmesi, Sınıf 3: tedavi ile durumu kötüleşebilecek olanlar şeklinde yorumlanmış ve değerlendirmede konak savunması dikkate alınmıştır (25,32).

Cerrahi tedavi

Cerrahi tedavide temel unsurlar yeterli drenaj, nekrotik dokuların geniş debridmanı, ölü boşluğun tedavisi, yeterli yumuşak doku desteği ve dolaşımın düzenlenmesidir. Kırık sonrası gelişen enfeksiyonlarda kırık iyileşme sürecinde baskılayıcı antibiyoterapi uygulanır. Kırık iyileştikten sonra kalan enfeksiyon cerrahi ile tedavi edilebilir. Cerrahi sonrası yeterli yumuşak doku desteğinin sağlanması amacıyla küçük defektler için kısmi deri grefti, büyük defektler için ise lokal kas flebi kullanılabilir. Bu tedaviler ile birlikte uygulanacak hiperbarik oksijen tedavisi ile iskemik veya enfekte yaranın iyileşmesi desteklenebilir (33).

Antibiyoterapi

Antibiyotik tedavi protokolüne biyopsi veya debridman sırasında alınan kemik kültürlerinden elde edilen patojenlerin sınıflandırılmasına göre karar verilir (34). Kemik kültürü alındıktan sonra olası patojenlere etkili olacak parenteral antibiyotik tedavisi planlanır.

Etken organizma tespit edildikten sonra parenteral tedavide kullanılan antibiyotik seçiminde değişikliğe gidilebilir. Kullanılacak antibiyoterapinin etken maddesini ve uygulama yolunu (oral, parenteral, kombinasyon) seçerken mikrobiyolojik testlerdeki duyarlılık sonuçları, hasta uyumu ve ilgili uzman hekimin önerileri dikkate alınır. Açık kırıklarda enfeksiyon riskini azaltmak için sistemik antibiyotik profilaksisi ve antibiyotik emdirilmiş boncuklar önerilmektedir. Genel olarak, tedavi süresi 4-6 hafta olmakla birlikte osteomyelitin antibiyotiklerle tedavisi için daha uzun süreli tedavilere de ihtiyaç duyulabilir. Klindamisin, rifampisin, trimetoprim/sülfametaksazol ve florokinolonlar gibi antibiyotiklerin oral antibiyoterapide etkili oldukları bilinmektedir. Klindamisin, başlangıç döneminde intravenöz (İV) tedaviden sonra oral olarak kullanılır ve Stafilokoklar da dahil birçok

gram (+) bakteriye karşı etkilidir. Linezolid, MRSA ve Vankomisine dirençli Enterokoklara karşı etkilidir ve İV/oral yolla kullanılabilir. Bakterilerin protein sentezini engeller ve kemiğe iyi penetre olur. Oral kinolonlar erişkinlerde gram (-) etkenlerin tedavisinde kullanılır ve oral emilimi iyidir. Rifampisin ideal hücreler arası konsantrasyonlara ulaşır, MRSA için iyi bir duyarlılık profiline sahiptir. Sinerjik etki ve direncin engellenmesi için çoğulukla hücre duvarına etki eden antibiyotikler ile birlikte kullanılır (35). Etkenin tespit edilemediği durumlarda enfeksiyon hastaneden edinilmiş ise MRSA, hastane dışından edinilmiş ise gram (-) bakteriler de dahil olmak üzere birden fazla mikroorganizma kaynaklı olarak düşünülür ve bu yönde tedaviye başlanır.

Parenteral antibiyotikler antibiyoterapinin temelidir ve birkaç hafta kullanılır. Direnç gelişimi sık karşılaşılan bir sorun olup protez enfeksiyonlarında Staf. Epidermidis gibi bazı bakteriler antibiyotiklerin dağılımını ve organizmanın fagositozunu engelleyen bir biyofilme tutunurlar (36). Protez enfeksiyonlarında biyofilm üzerine etki eden rifampin her zaman diğer antibiyotikler ile birlikte kullanılmalıdır. Rifampin kullanılmadığı durumlarda enfeksiyonun tekrarlama ihtimalinin arttırdığı gösterilmiştir (37).

Tedavi seçiminde biyoyararlanım, düşük toksisite, kemiğe penetrasyon gibi etkenler önemlidir ve cerrahinin yapamadığı durumlarda baskılayıcı antibiyotik tedavisi önerilebilir. Ortopedik implantı olan hastalarda rifampin, ofloksasin, fusidik asit, ve trimetoprim-sülfometaksazol baskılayıcı antibiyoterapide kullanılacak ajanlardır (38). Hayvan çalışmalarında debridman sonrası kemik revaskülarizasyonun sağlanması için 4 haftaya ihtiyaç olduğu gösterilmiştir. Stafilokoklara bağlı gelişen kemik, eklem veya implant ile ilişkili enfeksiyonların tedavisi ile ilgili hayvan çalışmaları Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. Stafilokoklara bağlı gelişen kemik, eklem veya implant ile ilişkili enfeksiyonların tedavisi ile ilgili hayvan çalışmaları (39)

Antibiyotik	Bulgular
Rifampisin	Rifampisin/Siprofloksasin Etkili Rifampisin/Fleroksasin Etkili Rifampisin/Pefloksasin Etkili Rifampisin/Levofloksasin Etkili (Rifampisin/Linezolid'den

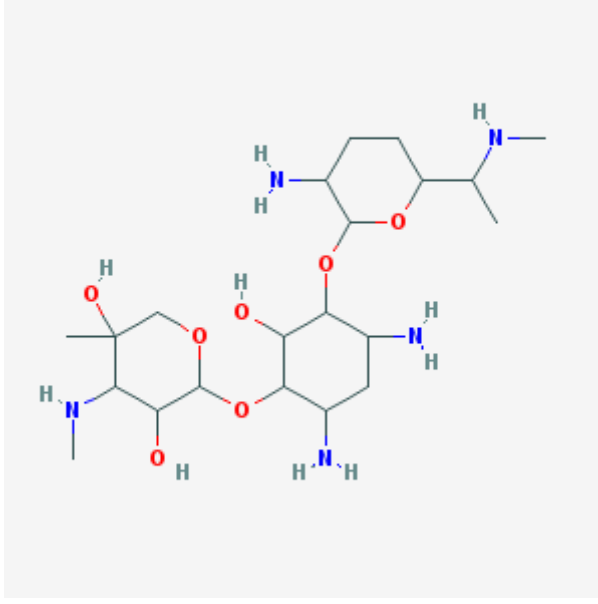
tablonun devamı.

	Rifampisin/Linezolid	etkili)
	Rifampisin/Trimetoprim/Sülfametaksazol	Etkili
	Rifampisin/Klindamisin	Etkili
	Rifampisin/Minosilin	Etkili Etkili (Rifampisin/Vankomisin'den daha az)
	Rifampisin/Azitromisin	Etkili
	Rifampisin/Klaritromisin	Etkili
	Rifampisin/Nafsilin	Etkili
Florokinolon	Levofloksasin	Etkili (yüksek dozlarda) (MSSA* osteomyelitinde Nafsilin'den daha az)
	Moksifloksasin	Etkili
	Siprofloksasin	(Kronik S.aureus osteomyelitinde sefuroksimden daha az etkili)
	Gatifloksasin	Etkili (MSSA osteomyelitinde Nafsilin ile kıyaslanabilir etki)
Oksazolidinon	Linezolid	MSSA osteomyelitinde Etkisiz
Linkozamid	Klindamisin	Etkili
Makrolid	Azitromisin	Etkisiz

*MSSA, *Metisiline duyarlı Staf. Aureus*
(Kim ve arkadaşları, 2014'ten Türkçeye uyarlanmıştır.)

Gentamisin

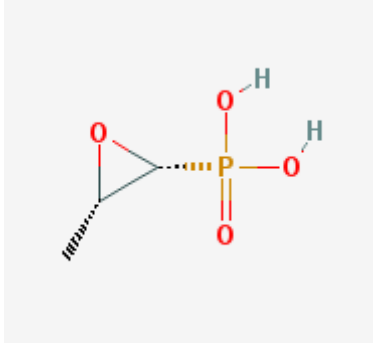
Gentamisin Gram (+) (mikobakteriler de dahil) ve Gram (-) bakteriler üzerine etkili geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Şekil 2). Bakterilerde, ribozoma bağlanmasının yanı sıra lipopolisakkaritlerin paketlenme sırasını bozarak dış membranda delikler oluşturur (40). Gentamisin kaplanmış kemik çimentoların kullanımının antibiyotik direncini tetkileme olasılığı vardır. Başlangıç dönemindeki yüksek antibiyotik salınımının ardından implant çevresindeki uzun dönem düşük konsantrasyonlar antibiyotik dirençli suşların oluşumuna neden olabilir (41). Hayvan modellerinde, gentamisinin lokal olarak uygulandığı kollajen tabaka veya demineralize kemik matriksi ile tobramisin yedirilmiş kalsiyum sülfat taneleri ile gentamisinin akut osteomyeliti önlediği gösterilmiştir (42,43).



Şekil 2. Gentamisinin kimyasal yapısı (44).

Fosfomisin

Fosfomisin (Fosfonomisin) Gram (+) ve Gram (-) bakteriler üzerine etkili geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Şekil 3). İlk kez 1969 yılında İspanya’da bulunmuş ve üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. Fosfomisin proteinlere hemen hemen hiç bağlanma göstermeyen düşük molekül ağırlıklı bir fosfonik asit derivativesidir. Fosfomisin trometamit (çözünebilir bir tuz), oral kullanım için fosfomisin kalsiyum ve intravenöz kullanım için fosfomisin disodyum olmak üzere 3 formu vardır (45).



Şekil 3. Fosfomisinin kimyasal yapısı (46).

Fosfomisin hem Gram (+) hem de Gram (-) bakterilerde fosfoenolpirüvat analogudur. Fosfomisine duyarlı olan hücrelere olmak üzere yapısal fonksiyon gösteren L- α -gliserolfosfat transport sistemi (GlpT) ve heksoz fosfat transport (UhpT) oluşumunu iki farklı transport sistemi ile girer. Bu yolla N-asetilmuramik asidin oluşumunu engelleyerek peptidoglikan sentezini inhibe eder. Beta laktam, aminoglikozid ve florokinolon grubu ile sinerjik etki gösterir. Bu etkilere ek olarak fosfomisin bakteri fimbrialarının sentezini ve hareket yeteneğini azaltarak patojenlerin üriner sistem epiteline ve üriner kateterlerinin iç yüzeyine yapışmasını ve kolonizasyonunu engellemektedir. Bu mekanizma ile inhibitör konsantrasyonların altında kalsa bile adezyonu engelleyici etki gösterebilmektedir. Bu etki sonunda bakterilere hücreye yapışabilme, üriner sistem dokuları üzerinde birikebilme ve idrar akımına karşı koyabilme yeteneği kazandıran en önemli özelliklerden biri engellenerek üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisi sağlanabilmektedir (47,48).

Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK)₅₀ ve MİK₉₀ değerleri S.aureus için sırasıyla 8 ve 16 μ g/ml'dir. Kalite kontrol suşlarında E.coli ATCC 25922 için zon çapı 23-29 mm ve MİK değeri 0.5-2.0 μ g/ml; S.aureus ATCC 25923 için zon çapı 25-33 mm ve MİK değeri 0.5-4.0 μ g/ml; P.aeruginosa ATCC 27813 için MİK değeri 2.0-8.0 μ g/ml ve E.faecalis ATCC 29212 için MİK değeri 32-128 μ g/ml olarak kabul edilmektedir. Disk difüzyon testinde koagülaz-negatif stafilokokların zon çapı için ise kesin bir ölçüt bulunmamaktadır (49). Erişkin hastalarda intravenöz uygulamada fosfomisin kullanımı ile ilgili çalışmalar Tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4. Fosfomisinin erişkinlerde intravenöz olarak etkili bulunduğu çalışmaların özeti.

Çalışma	Patojen	Enfeksiyon	Kombinasyon Tedavisi	Mortalite
Alvarez ve ark.	Serratia marcescens	Endoftalmit	Seftriakson+amikasin	0
Boulard ve ark.	Staphylococcus epidermidis	BOS şant enfeksiyonu	Aminoglikozid	0
Bureau-Chalot ve ark.	Stomatococcus mucilaginosus	Spondilodiskit	Sefotaksim	0
Florent ve ark.	Çoklu	Çoklu	Çoklu	13
Gillard ve ark.	-	Piyojenik diskit	Kinolon	0
Guerin ve ark.	Pseudomonas aeruginosa	Prostatit	Aztreonam	0
May ve ark.	Çoklu	Menenjit	Seftriakson	-
Meissner ve ark.	Çoklu	Kronik	-	26,4

<i>tablonun devamı.</i>				
Michalopoulos ve ark.	MDR Klebsiella pneumoniae	Osteomyelit Yoğun bakım kaynaklı enfeksiyon	Çoklu	18,2
Mirakhur ve ark.	Pseudomonas aeruginosa	Kistik fibrozis	Çoklu	0
Nakayama ve ark.	MRSA	Toksik şok sendromu	Vankomisin	0
Nissen ve ark.	Çoklu	Pnömoni	Ampisilin	6
Ortler ve ark.	Staphylococcus aureus	Yara enfeksiyonu	Sefmenoksim	0
Portier ve ark.	MRSA	Bakteriyemi: kemik eklem enfeksiyonu & menenjit	Sefotaksim	0
Roualdes ve ark.	Staphylococcus epidermidis Staphylococcus capitis Micrococcus varians	BOS şant enfeksiyonu	Vankomisin, Rifampin	0
Silbermann ve ark.	Staphylococcus epidermidis	Menenjit	Vankomisin	0
Ueda ve ark.	Çoklu	Çoklu	-	46,1
Yamaguchi ve ark.	MRSA	Pnömoni & sepsis	Arbekasin	0
Zink ve ark.	Staphylococcus albus	Ventriküloatriyel şant menejit	Gentamisin	0

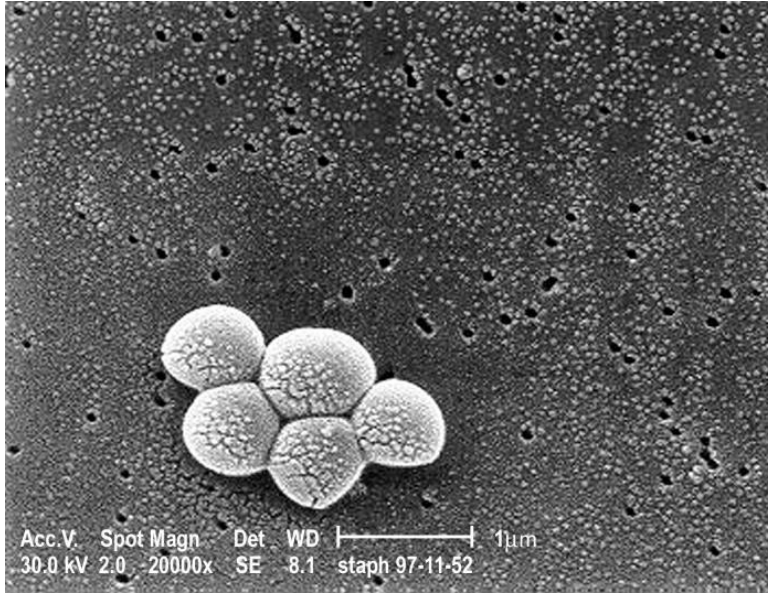
(Michalopoulos AS. 2011'den Türkçe'ye uyarlanmıştır.)

Yabancı madde, medikal cihazlar, implant yüzeyleri ve hasarlı dokulara yapışan bakteriler polisakarit ve proteinden oluşan bir polimerik matriks ile kendilerini örterler ve biyofilm oluştururlar. Biyofilmler, santral venöz kateter kaynaklı enfeksiyonlar veya üriner kateter kaynaklı enfeksiyonlar gibi hastane kökenli birçok enfeksiyonun oluşumu ve direnç oluşumunda anlamlı rol oynarlar. Biyofilmlerde antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen direnç artmıştır. Biyofilmler horizontal gen transferine zemin hazırlayarak antibiyotik direncinin yayılımını kolaylaştırırlar. Biyofilmlerin stabilitesi ve biyofilmler içindeki bakterilerde gözlenen antibiyotik direnci hastane kaynaklı enfeksiyonlarının kronikleşmesindeki temel unsurlardandır. Bakteriyel biyofilmlerin rutin tanısal testler ile tanısı zordur ve bu yapılar birçok antibiyotik ile konak savunmasına karşı doğal olarak direçlidir. Fosfomisin, özellikle florokinolonlar veya aminoglikozidler ile birlikte kullanıldığında antimikrobiyal etkisi olduğu gösterilmiştir. Fosfomisin ayrıca biyofilm yapısını kırarak diğer antibiyotiklerin geçirgenliğini artırabilir (50,51).

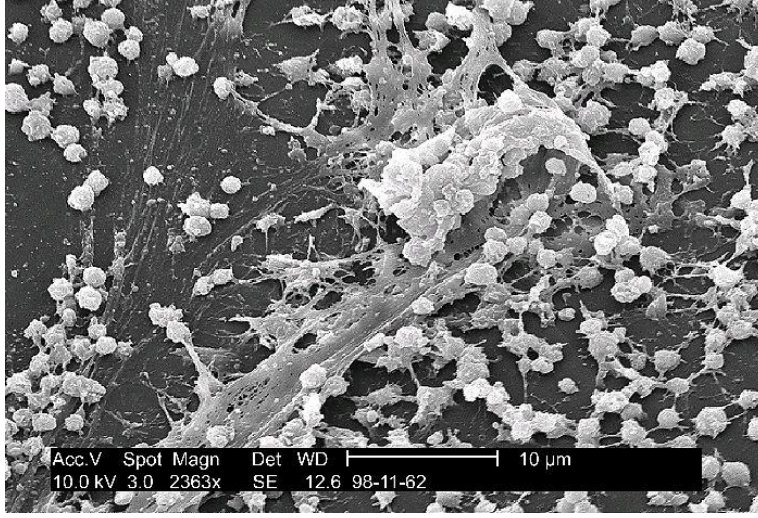
S. AUREUS İLİŞKİLİ İMPLANT ENFEKSİYONLARI

Stafilokoklar Micrococcaceae ailesi üyesi olup, hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerob, gram boyalı preparatta ikili, üçlü, ya da küme şeklinde görünen, 0.5-1.5 mm çapında gram pozitif koklardır. İnsandaki en sık patojen tür S.aureus'tur. Stafilokok türleri müköz membranlar, ve derinin normal florasında bulunur. Bu türler katalaz (+) olması ile katalaz (-) olan Streptokok türlerinden ayrılır. S. Aureus; eklem ve iskelet sistemi enfeksiyonları ile selülit, fronkül, karbonkül gibi deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının sık görülen sebeplerinden biridir (52,53). Stafilokok cinsi bakteriler implant kaynaklı enfeksiyonların yaygın görülen nedenlerindedir. S.aureus sıklıkla biyomateryal, kemik, eklem ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olurken S.epidermidis polimer ile ilişkili implant enfeksiyonlarında ön plana çıkar (54,55). Özellikle MRSA'ya karşı gelişen antibiyotik direnci kırık fiksasyonu sonrası oluşan enfeksiyonların %25-32'si MRSA kaynaklı olması nedeniyle travma cerrahisini de etkileyen yaygın bir sorundur (56).

S.aureus ve S.epidermidis başta olmak üzere birçok Stafilokok türü biyofilm oluşturur. Biyofilmlerin ayırt edici özelliği hücreleri çevreleyen ve kaplayan başta polisakkaritler olmak üzere ekstrasellüler polimerik maddelerdir (57).



Resim 1. Metisiline Dirençli Stafilococcus Aureus'un elektron mikroskop görüntüsü (58).



Resim 2. S. Aureus ve polisakkarit yapının elektron mikroskop görüntüsü (57).

Biyofilm oluşumu bakterinin yüzeye yapışması ve bakterilerin bir tabaka oluşturacak şekilde kendi arasında yapışması olmak üzere iki aşamalıdır. Biyofilm oluşuktan sonra iç bölümdeki bakteriler antibiyotiklerden ve fagositozdan korunacağı için enfeksiyonun tedavisi zorlaşacaktır (59). Biyofilm oluşumu ve koagülaz enzimi, S.aureus'un patojenitesinde önemli rol oynamaktadır. Bakterilerin mikroçevreye uyumları sırasında fenotipik ve genotipik olarak farklılaşıp daha patojen hale geldiği bilinmektedir. Endokardit, osteomyelit, deri ve implant enfeksiyonlarının persistan hale gelmesinde önemli bir rolü olduğu bilinen biyofilm yapılarındaki bakterilerin, serbest olanlara kıyasla antibiyotiklere karşı 10-1000 kat daha dirençli olduğu vurgulanmaktadır (60).

BİYOMATERYAL YÜZEYİ VE MODİFİKASYONLARI

Uygun antibiyotik profilaksisi ortopedik cerrahiler de gelişen enfeksiyon oranlarını azaltabilir. Ancak lokal damar hasarı, doku yıkımı ve ödem nedeniyle sistemik olarak uygulanan antibiyotiklerin kırık alanında ve doku-implant arayüzünde dağılımı sınırlıdır (61). Potansiyel antimikrobiyal ajanların doğrudan doku-implant arayüzüne uygulanması ile daha iyi enfeksiyon profilaksisi

sağlanabilir. Bu amaçla antibiyotik yüklü çimentolar, kollajen biyomateryaller ve implant kaplamaları olmak üzere birçok biyomateryal ile ilgili araştırmalar yapılmıştır (62). Gentamisin polimetilmetakrilat (PMMA) boncuklarının akut ve kronik enfeksiyonu azalttığı gösterilmiştir (63). Benzer şekilde gentamisin kaplanmış kollajen süngerler de kullanılabilir. Ancak PMMA boncukları 4-6 hafta sonra çıkarılmalıdır ve kollajen süngerler sürekli ve kontrollü antibiyotik salınımına izin vermez (64). Antibiyotik kaplamalı implantlar ise yeniden çıkarılması için ayrı bir prosedür gerektirmez ve yara kapanmasını geciktirmez. Önceki klinik çalışmalarda gentamisin kaplı tibial intramedüller çivinin implant ile ilişkili enfeksiyon oranını azalttığı gösterilmiştir (62,65). Günümüzde ortopedi alanında kullanılan antibiyotik içeren materyallerde sıklıkla gentamisin kullanılmaktadır. Ancak, artan gentamisin direncinin olduğu bir ortamda gentamisin salınımlı tekolojilerin etkinliğinin devam edip etmeyeceği bilinmemektedir (66). Ayrıca gentamisinin sınırlı hücre içi penetrasyona sahip olması nedeniyle implant ile ilişkili enfeksiyonlarda önemli rol oynayan intrasellüler bakterilere antibakteriyel etkisinde yetersizlik görülmektedir (67-69).

Ortopedik cerrahi işlemlerde paslanmaz çelik, titanyum, titanyum alaşımları ve ayrışabilen polimerle sıklıkla kullanılır. Paslanmaz çelik materyallerin enfeksiyon oranının titanyum implantlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (70). Femur, tibia ve humeral diyafizin kapalı ve Tip I açık kırıklarının tedavisinde intramedüller çiviler sıklıkla kullanılır. Yeni intramedüller çivilerin tasarımıyla bu implantların tip II ve tip III açık kırıklarda da kullanımı mümkün olmaktadır (16). İntramedüller çivi enfeksiyonları sıklıkla kırığın kaynamaması ve osteomyelit ile ilişkilidir. Bu durum sekestrum oluşumuna yatkınlık oluşturabilir. Bu enfeksiyonların kaynağı olan *S. aureus* and *S. epidermidis* gibi bakterilerin implant yüzeyinde biyofilm oluşturmaları nedeniyle antibiyotikler ile tedavide zorluklar yaşanmaktadır. Bu durumda tek tedavi seçeneği implantın çıkarılmasıdır. Bu nedenle, antibiyotiklere bakteriyel dirençteki artış sonucunda bakteriyel adezyonu ve kolonizasyonu engelleyen yüzeylere olan ihtiyaç daha anlamlı hale gelmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Etik Kurul Onayı

Bu araştırma için Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan; 14.10.2014 tarihli, 2014/039 sayılı toplantıda alınan karar ile ve 17.10.2014 tarihli ve 60758568-020/58916 sayılı yazı ile onay almıştır.

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nde yürütüldü. Araştırma dört farklı aşama ile tamamlandı.

1- Araştırmaya alınan denekler (sıçan) Lucke ve arkadaşları (65) tarafından tanımlanmış modellerde belirtilen yöntem ile enfekte edilerek implant ilişkili osteomyelit oluşturuldu. Araştırmada temin edilen Metisilin Dirençli Stafilococcus aureus(ATCC 43300) kökeni kullanıldı. İmplant ilişkili osteomyelit modeli için 10^3 cfu/10 μ L olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Denekler 4 grup halinde sınıflandırıldı;

Grup-1: Kaplamasız implant(Kontrol),

Grup-2:PDLLA kaplı implant (Kontrol),

Grup-3: Gentamisin içeren PDLLA kaplı implant,

Grup-4: Fosfomisin içeren PDLLA kaplı implant.

2- Araştırmanın başlangıcında (1. gün) tüm deneklerin sol tibiaları 10 μ L bakteri süspansiyonu ile kontamine edildikten sonra içine gruba uygun Kirschner telleri intramedüller olarak yerleştirildi.

3- Araştırmanın takip süresince;

- Birinci gün, 3., 7., 14., 21., 28., 35. ve 42. günlerde tüm denekler tartıldı ve rektal vücut sıcaklıkları ölçüldü,

- Her gruptaki deneklerden intrakardiyak enjeksiyon ile birinci gün, 14. ve 42. günlerde 1-2 ml kan alındı,

- İlk gün ile 7., 14.,21., 28., 35. ve 42. günlerde radyolojik değerlendirme yapıldı.

Bakteri ve İnokülasyonun Hazırlanması

Sıçanlar, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı'ndan temin edilen ATCC 43300 MRSA suşu inokulasyonu ile enfekte edildi.

Bu bakterinin penisilin, oksasilin, klindamisin ve eritromisine dirençli olduğu; vankomisin, gentamisin, nitrofurantain, linezolid, daptomisin ve teikoplanine duyarlı olduğu BD Phoenix Otomatik Mikrobiyoloji Sistemi (Becton Dickinson Ltd. USA) ile gösterildi. Elde edilen bakterinin fosfomisine duyarlı olduğu ise disk difüzyon yöntemi ile gösterildi (71) (Resim 3). Diğer MRSA suşlarındaki disk difüzyon yöntemi ile yapılan çalışmalar baz alınarak duyarlılık değerlendirildi (72).



Resim 3. Fosfomisin disk duyarlılık testi

Stafiloccus aures'un 9ml'lik Tryptic Soy Broth (TSB) solüsyonunun (Casein peptone-soymeal peptone Agar T8907 Fluka Sigma-Aldrich Ltd. USA) 1 gecelik kültüründen sonra 3ml TSB içeren steril tüplere bu solüsyondan 100 mikrolitre (μ l) transfer edildi. Bu tüpler Log Faz büyüme dönemini elde etmek için 37°C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler 3000 rpm (revolution per minute-dakikadaki devir sayısı) ile 10 dakika (dk) santifüj edildikten sonra süpernatant kısım ayrıldı. Kalan kısım 2 kez fosfat tamponlu salin (FTS) ile yıkandı. Spektrometrik kontrol

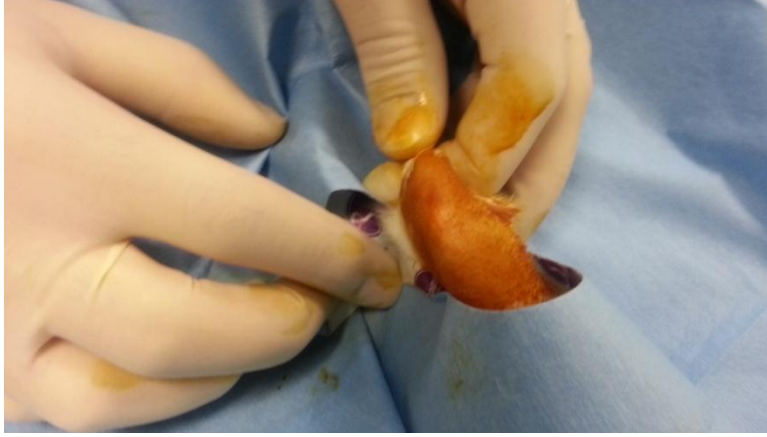
yöntemi (Phoenix Spec Nephelometer, BD, New Jersey USA) ile 6 numaralı McFarland standardı elde edilinceye kadar bakteriyel sedimente FTS eklendi.

100µl otomatik pipetlerle (Eppendorf EpTIBS, 10-100 µl) 10µl solüsyon koyun kanlı agar da ekildi. Etüv sonrası gözle koloni sayımı yapıldı. Süspansiyonlar 1,5ml'lik hacimlerle Eppendorf tüplere alınarak -80°C'de donduruldu. Cerrahi için kullanım öncesinde olası konsantrasyon dalgalanmaları ekim ve koloni sayımı ile tekrar kontrol edildi. Operatif prosedürde Kirschner teli yerleştirilmesinden sonra, medüller kavitenin kontaminasyonu için tüm gruplara 10³cfu/0,1ml Staf. aureus içeren FTS solüsyonu PPD enjektörü ile verildi.

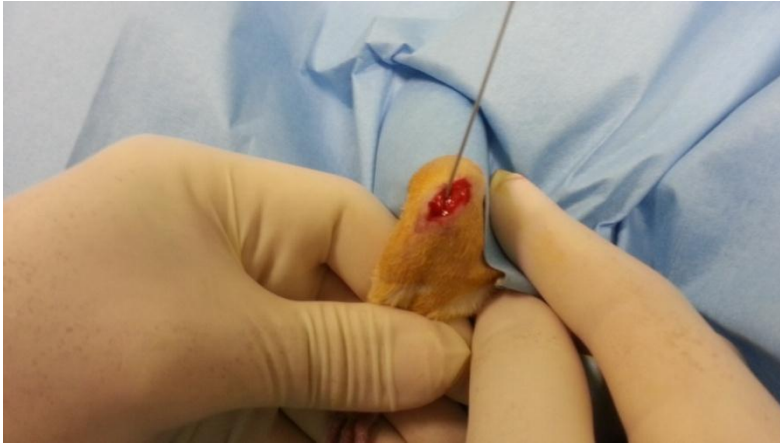
Sıçanlar ve Operatif Süreç

Araştırma için 40 adet 3 aylık, ortalama ağırlığı 250g olan, Wistar Albino cinsi sıçan kullanıldı. Cerrahi prosedür intraperitoneal anestezi ile 10 mg/kg xylazine ve 90 mg/kg ketamin verilerek yürütüldü. Poli (D, L-laktid) (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Almanya) ilaç taşıyıcı olarak seçildi. 30.000 Dalton bir molekül ağırlığına sahip 100mg PDLLA, uçucu karakterdeki 1,5 ml çözücü-kloroform içinde oda sıcaklığında eritildi. Elde edilen bu solüsyonun içerisine 10mg gentamisin ve 10 mg fosfomisin sodyum %10 luk konsantrasyonlar elde edilecek şekilde PDLLA / kloroform çözeltisi hazırlandı ve steril filtre ile filtrelendi. Steril 0.8 mm lik kirschner telleri biyomalzemeler içine bir kez daldırılarak kaplama çözeltisi ve laminar hava akım koşulları altında kurutuldu. Steril şartlarda denek tibiasına intramedüller olarak standart teknikle uygulandı. Deneklerin sol arka bacakları traş edildi ve %10 povidon iyot solüsyonu ile dezenfeksiyonu sağlandı. Steril şartların korunması için denekler steril örtülere sarıldı (Resim 4). Proksimal tibia metafizinde deri ve fasyada 5mm uzunluğunda bir insizyon yapıldı. Patellar tendon split geçilerek proksimal metafiz ve medullar kaviteye ulaşmak amacıyla 1 mm lik kirschner teli ile kortikal ve kansellöz kemikte delik açıldı (Resim 5). İlgili alandaki periost korundu. Medüller kaviteye çelik Kirschner teli (0.8mm çapında, paslanmaz çelik Tıpmed, İzmir, Türkiye) yerleştirildi (Resim 6). Medüller kanala 10³cfu/10µL olacak şekilde bakteri süspansiyonu enjekte edildi. Çalışma protokolüne göre kaplamasız implant, PDLLA kaplı implant, Gentamisin içeren PDLLA kaplı implant ya da fosfomisin içeren

PDLLA kaplı implantlar yerleştirildi. Kirschner tellerinin deneğin vücudu dışında kalan kısımları giriş yerine yakın olarak tel kesme ile kesildi. Yumuşak doku %10 povidon iyot solüsyonu ile yıkandı. Deri ve fasya uygun teknikle dikilerek cerrahi alan kapatıldı.



Resim 4. Cerrahi alanın görüntüsü



Resim 5. Cerrahi prosedür

İzlem

Araştırmanın izlem sürecinde tüm denekler birinci gün , 3., 7., 14., 21., 28., 35. ve 42. günlerde tartıldı ve rektal vücut sıcaklığı ölçüldü. Tüm deneklerde birinci gün ile 7., 14., 28., 35. ve 42. günlerde radyolojik değerlendirme yapıldı. Her gruptaki deneklerden intrakardiyak enjeksiyon ile birinci gün , 14 ve 42. günde 1-2

ml kan alındı. İzlem dönemindeki bu prosedürler intraperitoneal anestezi ile gerçekleştirildi.

Vücut Ağırlığı

Tüm denekler birinci gün , 3., 7., 14., 21., 28., 35. ve 42. günlerde hassas elektronik tartı kullanılarak tartıldı. Vücut ağırlıkları gram (g) olarak kaydedildi.

Vücut Sıcaklığı

Tüm deneklerin birinci gün , 3., 7., 14., 21., 28., 35. ve 42. günlerde vücut sıcaklığı ölçüldü. Vücut sıcaklığı santigrat derece (°C) olarak kaydedildi.

Radyografik Değerlendirme

Radyografik görüntüler, postero-anterior (PA) ve lateral olarak birinci gün ile 7., 14., 28. 35. ve 42. günlerde odak ile film arasındaki uzaklık 110cm olacak şekilde elde edildi. Bu görüntüleme için dijital X-ray filmi ve X-ray ünitesi (Choongwae Medical Co.Ltd, Kore) kullanıldı. Radyolojik görünümler An ve arkadaşları (73) tarafından modifiye edilen skorlama sistemine göre değerlendirildi. Osteomyelit oluşumu ve ilerlemesinin bulguları için proksimal epifiz ve metafiz (R1), diyafiz (R2) ile distal epifiz ve metafiz (R3) değerlendirildi (Resim 6 ve 7).

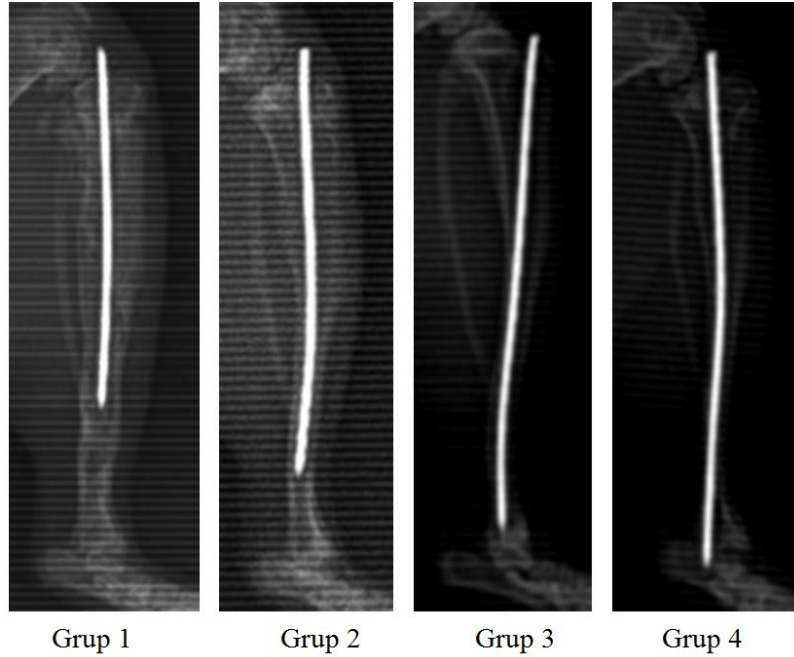


Resim 6. Radyolojik olarak değerlendirilen 3 alan; R1: proksimal epifiz ve metafiz, R2: diyafiz, R3: distal epifiz ve metafiz.

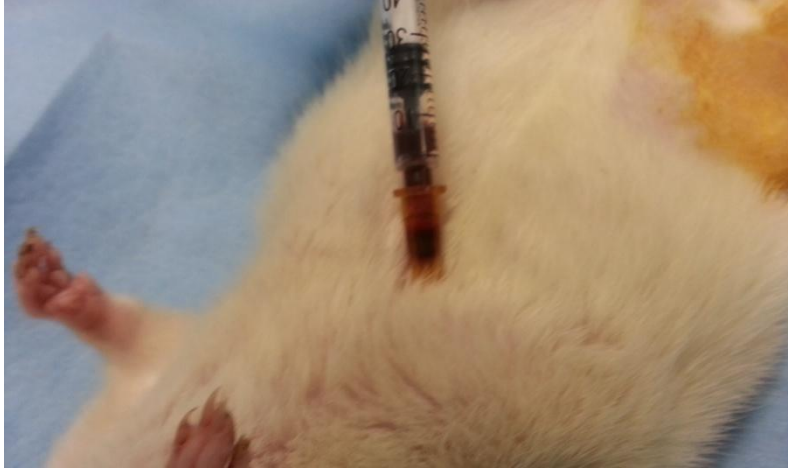
Elde edilen radyografik görünüm; 1-Periosteal reaksiyon, 2-Osteolizis, 3-Yumuşak doku şişliği, 4-Deformite, 5-Genel tutulum, 6-Spontan kırık, 7-Sekestrum oluşumu açısından değerlendirildi (Resim 8). İlk 5 değişken her radyografi alanında 4 değerli olarak (0-Yok, 1-Hafif, 2-Orta, 3-İleri); son iki değişken ise radyografinin genelinde 2 değerli olarak (0-Yok, 1-Var) değerlendirildi. Buna göre bir sıçanın alabileceği maksimum skor ilk 5 parametre için 45, 6. ve 7. parametreler için ise 2 idi. Toplam en yüksek skor 47 olacak şekilde değerlendirildi.

Kan Tahlili

Her gruptaki deneklerden intrakardiyak enjeksiyon ile birinci gün ,14. ve 42. günlerde 1-2 ml kan alındı (Resim 8). Alınan örnekler rutin laboratuvar parametreleri (hemoglobin, beyaz kan hücresi sayısı) açısından incelendi (Resim 9).



Resim 7. (a) Grup1: Kaplamasız implant(Kontrol), (b) Grup2:PDLLA kaplı implant (Kontrol),(c) Grup3, Gentamisin içeren PDLLA kaplı implant, (d) Grup4, Fosfomisin içeren PDLLA kaplı implant.



Resim 8. Araştırmada deneklerden intrakardiyak enjeksiyon ile kan örneği alınması ile ilgili görüntü



Resim 9. Kan örneklerinin analiz için hazırlanması

Mikrobiyolojik Değerlendirme

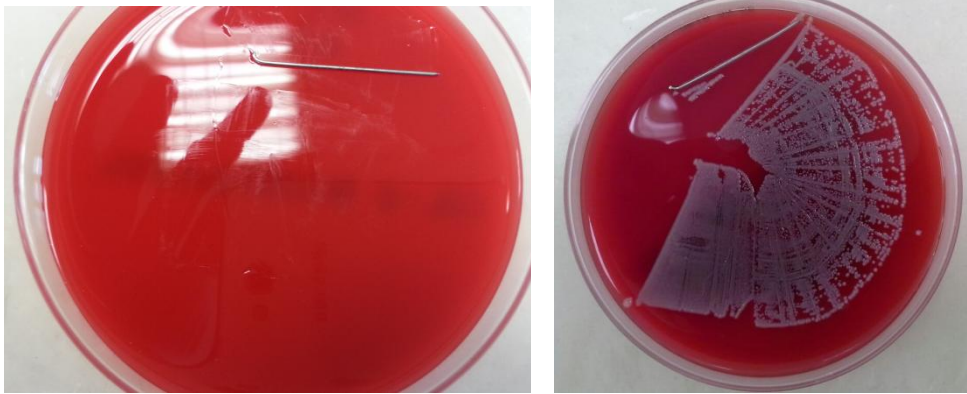
Sıçanlar 42.gün sonunda sistemik enfeksiyon gelişiminin değerlendirilmesi için alınan kan örnekleri kültür şişelerine (BD BACTEC FX, aerobik kültür şişesi, Sparcks Maryland, USA) ekim yapıldı (Resim 10). Kirschner telinin giriş ucundan sürüntü alındı (Besiyeri eküvyon çubuğu transport Swap, BTR Ltd, Ankara). Kirschner teli çıkarıldıktan sonra %5 koyun kanlı agara (Columbia Agar %5 ship blood, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) ekim yapıldı. (Resim 11). Daha sonra Kirschner telleri 5ml TSB solüsyonuna koyuldu. 37°C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra agardaki bakteri kolonileri (CFU) sayıldı. TSB’deki bakteriyel

üreme ise, bulutlu görünüm üremenin olduğunu; berrak görünüm ise üremenin olmadığını gösterecek şekilde değerlendirildi (Resim 12).

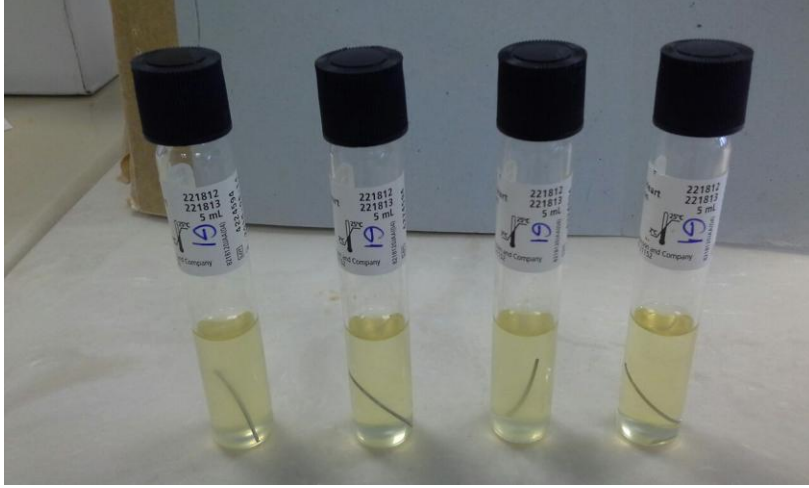
Swap, kan kültürü ve koyun kanlı agardan izole edilen bakteriler gram boyama, katalaz, plazma koagülaz ve otomatik cihazda tanımlama ve resistans açısından değerlendirildi (BD Phoenix 100, Maryland, USA).



Resim 10. Kültür için toplanan kan örnekleri



Resim 11. Agar besiyerine ekilmiş Kirschner teli



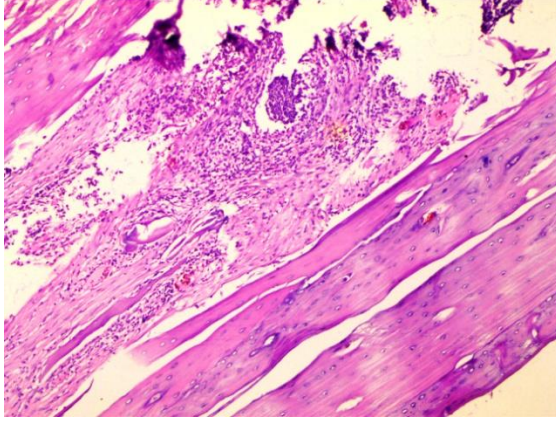
Resim 12. TSB agara ekim ve değerlendirme

Patoloji

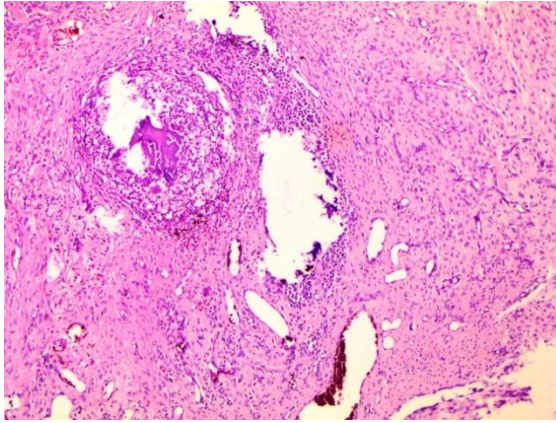
Her grup için rastgele seçilmiş 5 deneğin tibiaları alındı ve 24 saat %10'luk formaldehit solüsyonunda bekletildi. Dekalsifikasyon solüsyonunda kesilecek kıvama gelinceye kadar bekletilen tibialar longitudinal olarak kesilerek medüller yüz açığa çıkarıldı. Takiben proksimal epi/metafiz, diafiz, distal epi/metafiz olacak şekilde 3 bölgeye ayrıldı. .

Rutin takip işleminden sonra preparat parafine gömüldü. Bir paslanmaz çelik mikrotom bıçağı (Leica RM2265 microtome - Bensheim, Germany) yardımı ile 5 mikrometrelilik kesitler hazırlandı. Kesitler hemotoksilen eozin ile boyandı. Hemotoksilen eozin boyalı kesitler Petty ve arkadaşları (74) tarafından tanımlanan değişkenlere göre değerlendirildi. Skorlama sistemi:1-Abse formasyonu, 2-Sekestrum formasyonu, 3-Kortikal genişleme, 4-Kortikal destrüksiyon şeklinde sınıflandı. Sınıflamada 1'den 4'e kadar olan değişkenler için semikantitatif olarak 0:Yok, 1:Var şeklinde değerlendirme yapıldı. En yüksek skor 12 olacak şekilde skorlama tamamlandı.

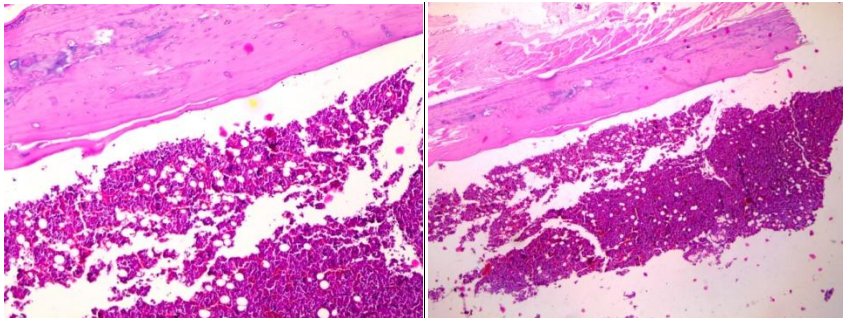
GRUP-1 Apse ve sekestrum oluşumu H&E X10



GRUP-1 Apse ve sekestrum oluşumu H&E X 20



GRUP-3 Doğal görünümlü kemik iliği H&E X10 ve H&E X 20



Resim 13:Mikroskop ile histopatolojik değerlendirme

İstatistik

Veriler SPSS V22 (IBM,ABD)istatistik analiz programı ile analiz edildi. Bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımlı grup karşılaştırmalarında ise Friedman Testi kullanıldı.Veriler %95 güvenilirlik aralığında değerlendirilmiş olup,0,05'in altındaki değerler istatistiksel olarak anlamı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma sırasında hayvan kaybı yaşanmadı ve çalışmadan çıkarılan denek olmadı.

Tüm deneklerin birinci gün , 3., 7., 14., 21., 28., 35. ve 42. günlerde ölçülen vücut ağırlığı değerlendirildiğinde; deneklerin vücut ağırlığı değerleri çalışmanın son gününde birinci gününe göre anlamlı olarak daha yüksekti. Çalışma grupları değerlendirildiğinde, deneklerin vücut ağırlığı değerleri yönünden bütün ölçüm günlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (Tablo5). Bu ölçümde Grup 1'deki kaplamasız implant(Kontrol) deneklerin ortalama vücut ağırlığı Grup3-Gentamisin içeren PDLLA kaplı implant ve Grup-4'e Fosfomisin içeren PDLLA kaplı implant göre anlamlı olarak düşüktü.

Takip süresinde Grup 1'deki deneklerde diğerlerine göre daha az kilo alımı görülürken ($p=0.004$), tüm deneklerde istatistiksel olarak anlamlı kilo alımı gözlemlendi.

Tüm deneklerin birinci gün , 3., 7., 14., 21., 28., 35. ve 42. günlerde ölçülen rektal vücut sıcaklıkları değerlendirildiğinde; çalışmanın birinci günü ile son günü arasında deneklerin vücut sıcaklığı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Tablo 6). Çalışma grupları değerlendirildiğinde, deneklerin vücut sıcaklıkları ortalaması yönünden çalışmanın birinci günü ile son günü arasında anlamlı fark yoktu.

Tablo 5. Grupların takip süresince vücut ağırlığı için değerler ve gruplar arasında istatistiksel değerlendirme

		Grup1	Grup2	Grup3	Grup4	P
kilo0	Ortalama \pm SD	251,42 \pm 5,28	254,57 \pm 6,47	258,58 \pm 5,12	261,22 \pm 5,76	0,003*
	Medyan (Min - Maks)	252,75 (242,3 - 258,2)	256,25 (239,5 - 262,3)	259,25 (248 - 267,1)	259,65 (254,3 - 273,4)	
kilo3	Ortalama \pm SD	251,96 \pm 5,35	254,87 \pm 6,06	258,93 \pm 5,3	261,24 \pm 5,47	0,004*
	Medyan (Min - Maks)	253,95 (243,1 - 258,1)	256,85 (240,2 - 260,4)	260,2 (248,1 - 267,4)	259,5 (255 - 272,5)	
kilo7	Ortalama \pm SD	252,6 \pm 5,16	255,93 \pm 6	259,9 \pm 5,27	262,36 \pm 5,25	0,002*
	Medyan (Min - Maks)	254,75 (244,2 - 258,6)	257,45 (241,5 - 261,2)	261,5 (249 - 268,3)	260,1 (257 - 273,8)	
kilo14	Ortalama \pm SD	252,99 \pm 5,16	256,57 \pm 6,06	260,58 \pm 5,08	262,31 \pm 5,17	0,004*
	Medyan (Min - Maks)	254,5 (244,6 - 259,3)	257,6 (242,6 - 263,1)	262,05 (250,1 - 269)	260,6 (255 - 271)	
kilo21	Ortalama \pm SD	253,19 \pm 5,43	257,71 \pm 6,32	261,28 \pm 5,11	263,58 \pm 5,32	0,002*
	Medyan (Min - Maks)	254,8 (244,5 - 260,1)	260,75 (243,2 - 264,2)	262,4 (250,7 - 269,8)	262,05 (258 - 274,3)	
kilo28	Ortalama \pm SD	253,34 \pm 5,05	258,03 \pm 6,37	262,04 \pm 4,95	264,1 \pm 5,53	0,001*
	Medyan (Min - Maks)	254,65 (244,7 - 260,2)	261,05 (244 - 265,2)	263,1 (252 - 270,2)	263,05 (257,3 - 275)	
kilo35	Ortalama \pm SD	254,16 \pm 5,48	258,98 \pm 5,9	262,74 \pm 4,91	264,51 \pm 5,8	0,002*
	Medyan (Min - Maks)	255,15 (244,8 - 260,8)	261,65 (245,3 - 265,9)	263,65 (253 - 271,2)	262,6 (258 - 276)	
kilo42	Ortalama \pm SD	254,53 \pm 5,43	259,05 \pm 5,9	263,3 \pm 4,74	265,12 \pm 5,8	0,002*
	Medyan (Min - Maks)	255,35 (245,4 - 261,2)	261,25 (245,1 - 266,2)	264,1 (254 - 271,5)	263,5 (258,3 - 276,5)	
P		0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	

*p<0,05 (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır)

Tablo 6. Grupların takip süresince vücut sıcaklığı için değerler ve gruplar arasında istatistiksel değerlendirme

		Grup1	Grup2	Grup3	Grup4	p
ateş0	Ortalama ± SD	37,46 ± 0,25	37,48 ± 0,25	37,52 ± 0,27	37,48 ± 0,28	0,949
	Medyan (Min - Maks)	37,5 (37,1 - 37,8)	37,5 (37,1 - 37,8)	37,55 (37,1 - 37,8)	37,55 (37,1 - 37,9)	
ateş3	Ortalama ± SD	37,46 ± 0,24	37,53 ± 0,22	37,52 ± 0,21	37,6 ± 0,18	0,456
	Medyan (Min - Maks)	37,4 (37,1 - 37,9)	37,55 (37,2 - 37,8)	37,5 (37,2 - 37,9)	37,6 (37,3 - 37,8)	
ateş7	Ortalama ± SD	37,5 ± 0,35	37,6 ± 0,27	37,58 ± 0,28	37,6 ± 0,25	0,915
	Medyan (Min - Maks)	37,55 (37 - 37,9)	37,65 (37,1 - 37,9)	37,6 (37,2 - 38)	37,6 (37,2 - 37,9)	
ateş14	Ortalama ± SD	37,46 ± 0,38	37,52 ± 0,26	37,54 ± 0,18	37,57 ± 0,22	0,882
	Medyan (Min - Maks)	37,45 (36,8 - 37,9)	37,45 (37,1 - 38)	37,6 (37,1 - 37,7)	37,55 (37,2 - 37,9)	
ateş21	Ortalama ± SD	37,37 ± 0,38	37,43 ± 0,19	37,45 ± 0,22	37,53 ± 0,2	0,735
	Medyan (Min - Maks)	37,4 (36,8 - 37,9)	37,45 (37,2 - 37,8)	37,5 (37,1 - 37,8)	37,5 (37,2 - 37,8)	
ateş28	Ortalama ± SD	37,58 ± 0,29	37,31 ± 0,21	37,55 ± 0,19	37,53 ± 0,19	0,059
	Medyan (Min - Maks)	37,65 (37,1 - 37,9)	37,3 (37 - 37,6)	37,55 (37,3 - 37,9)	37,6 (37,1 - 37,8)	
ateş35	Ortalama ± SD	37,49 ± 0,26	37,48 ± 0,21	37,48 ± 0,16	37,51 ± 0,21	0,882
	Medyan (Min - Maks)	37,55 (37 - 37,8)	37,5 (37,2 - 38)	37,5 (37,2 - 37,7)	37,5 (37,2 - 37,9)	
ateş42	Ortalama ± SD	37,53 ± 0,23	37,39 ± 0,21	37,42 ± 0,18	37,48 ± 0,23	0,544
	Medyan (Min - Maks)	37,6 (37,2 - 37,9)	37,4 (37,1 - 37,7)	37,4 (37,2 - 37,7)	37,45 (37,2 - 37,8)	
P		0,827	0,104	0,149	0,597	

*p<0,05 (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır)

Tüm deneklerin birinci gün , 7., 14., 21., 28., 35. ve 42. günlerde radyolojik görüntülerindeki tutulum düzeyi üzerinden hesaplanan radyoloji skoru değerlendirildiğinde; deneklerin radyoloji skoru ortalamaları çalışmanın son gününde birinci gününe göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.001$). Çalışma grupları değerlendirildiğinde, deneklerin radyoloji skoru ortalaması yönünden bütün ölçüm günlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (Tablo 8). Bu ölçümlere 7., 14., 21. ve 28. günlerde skorların homojen dağılım gösterdiği tespit edilirken; 35. ve 42. günlerde dağılım heterojendi. Grup 3'teki (Gentamisin içeren PDLLA kaplı implant) deneklerin ortalama radyoloji skorları diğer gruptakilere deneklere göre anlamlı olarak düşük olup bu fark 42. günde en yüksek düzeye ulaşmıştı. ($p<0.001$).

İzlemin 14 ve 21. gününde Grup 4'te (Fosfomisin içeren PDLLA kaplı implant) radyolojide gösterilen hasar Grup 1'e (Kaplamaşız implant) göre daha düşük görülmekle birlikte ($p=0.001$), 42. günde bu fark anlamlı değildi ($p=0.912$) (Tablo 8).

Her grup için rastgele seçilmiş 5 deneğin patoloji skorları incelendiğinde deneklerin patoloji skoru ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi (Tablo 7). Grup 3'te (Gentamisin içeren PDLLA kaplı implant) patoloji skoru, diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşüktü ($p:0,005$).

Tablo 7: Grupların çalışma sonunda değerlendirilen patoloji skoru için ortalama değerler

	n=5	Grup1	Grup2	Grup3	Grup4	p
Patoloji skoru	Ortalama \pm SD	10,2 \pm 1,6	9 \pm 1,58	2,4 \pm 1,14	8,2 \pm 1,3	0,005
	Medyan (Min - Maks)	9 (9 - 12)	9 (7 - 11)	2 (1 -4)	8 (7 -10)	

* $p<0,05$ (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır)

Tablo 8. Grupların takip süresince radyoloji skoru için ortalama değerler ve gruplar

		Grup1	Grup2	Grup3	Grup4	p
Röntgen7	Ortalama ± SD	3,2 ± 1,55	2,4 ± 1,26	0,9 ± 0,57	1,4 ± 0,84	0,002*
	Medyan (Min - Maks)	4 (0 - 5)	2,5 (0 - 4)	1 (0 - 2)	1 (0 - 3)	
Röntgen14	Ortalama ± SD	7,8 ± 1,14	5,5 ± 1,27	2,4 ± 0,52	3,1 ± 0,88	<0,001*
	Medyan (Min - Maks)	8 (6 - 9)	6 (3 - 7)	2 (2 - 3)	3 (2 - 5)	
Röntgen21	Ortalama ± SD	9,6 ± 0,97	7,7 ± 1,34	3,7 ± 0,67	6,8 ± 1,32	<0,001*
	Medyan (Min - Maks)	9,5 (8 - 11)	8 (5 - 9)	4 (3 - 5)	7 (4 - 9)	
Röntgen28	Ortalama ± SD	16,1 ± 2,96	16,4 ± 3,72	5,5 ± 1,35	14,9 ± 2,85	<0,001*
	Medyan (Min - Maks)	16 (10 - 21)	16,5 (11 - 22)	5,5 (4 - 8)	15,5 (10 - 19)	
Röntgen35	Ortalama ± SD	18,6 ± 3,06	18 ± 3,33	7 ± 1,41	17,3 ± 2,54	<0,001*
	Medyan (Min - Maks)	18 (14 - 23)	17,5 (13 - 24)	7 (5 - 9)	18 (14 - 20)	
Röntgen42	Ortalama ± SD	19,6 ± 3,06	19,4 ± 2,95	8,4 ± 0,97	19,1 ± 2,13	<0,001*
	Medyan (Min - Maks)	19 (15 - 24)	18,5 (15 - 25)	8,5 (7 - 10)	19 (16 - 22)	
p		<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	

arasında istatistiksel değerlendirme

*p<0,05 (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır)

Deneklerin birinci gün , 14. ve 42. günlerde alınan kan numunelerinin analizinde hemoglobin değerleri yönünden gruplar arasında birinci gün izlenen farklılık anlamlı idi (p<0.001) Grup 2 de hemoglobin değeri anlamlı olarak yüksekti fakat 14. ve 42.günlerde bu farklılık izlenmedi (Tablo 9). Beyaz kan hücresi sayısı (WBC) yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Tablo 10).

Tablo 9. Grupların takip süresince alınan kan numunelerinde hemoglobin için ortalama değerler ve gruplar arasında istatistiksel değerlendirme

		Grup1	Grup2	Grup3	Grup4	p
hb0	Ortalama ± SD	14,07 ± 1,3	16,85 ± 0,66	14,98 ± 1,19	15,39 ± 1,39	0,001*
	Medyan (Min - Maks)	14 (11,7 - 16)	16,75 (15,7 - 18)	14,5 (13,6 - 17,1)	15,15 (13,8 - 17,6)	
hb14	Ortalama ± SD	14,57 ± 1,54	15,08 ± 2,13	14,36 ± 1,67	15,87 ± 1,17	0,212
	Medyan (Min - Maks)	14,9 (12 - 16,4)	15,7 (11,6 - 17,4)	13,95 (12 - 17,1)	16,05 (13,2 - 17,1)	
hb42	Ortalama ± SD	14,81 ± 1,43	15,71 ± 1,82	15,66 ± 1,07	16,07 ± 1,33	0,332
	Medyan (Min - Maks)	15,15 (12,4 - 16,7)	16,2 (11,7 - 17,5)	15,55 (14,1 - 17,6)	16,05 (13,8 - 18)	
p		0,584	0,045*	0,202	0,741	

*p<0,05 (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır)

Tablo 10. Grupların takip süresince alınan kan numunelerinde beyaz kan hücresi için ortalama değerler ve gruplar arasında istatistiksel değerlendirme

		Grup1	Grup2	Grup3	Grup4	p
WBC0	Ortalama \pm SD	8,65 \pm 2,03	7,72 \pm 1,32	7,41 \pm 1,87	6,75 \pm 1,36	0,167
	Medyan (Min - Maks)	8,8 (6 - 11,7)	7,4 (5,6 - 10,2)	7,6 (4,3 - 10,1)	6,8 (4,2 - 8,9)	
WBC14	Ortalama \pm SD	7,58 \pm 1,15	6,8 \pm 1,83	7,41 \pm 1,7	7,6 \pm 1,51	0,744
	Medyan (Min - Maks)	7,3 (6 - 10)	6,85 (3,7 - 9,3)	7,25 (4,9 - 10,4)	7,6 (4,7 - 10,1)	
WBC42	Ortalama \pm SD	8,03 \pm 1,54	8,51 \pm 1,9	7,84 \pm 1,18	7,97 \pm 1,07	0,871
	Medyan (Min - Maks)	7,65 (5,3 - 10,2)	7,95 (6,6 - 13,4)	7,85 (6,5 - 10,1)	7,85 (6,8 - 10)	
p		0,656	0,199	0,926	0,202	

*p<0,05 (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır)

Mikrobiyoloji

Araştırmanın 42. günde tüm sıçanlardan alınan kan kültürlerinde üreme olmadı. Grup 1'deki tüm yuvarlama kültürlerinde 10^5 'in üzerinde, Grup 2'de tüm agarlarda 10^5 'in üzerinde, Grup 4'teki 8 adet agarda 10^5 civarında üreme görülürken, Grup 4'ün 2 agarında üreme görülmedi. Grup 3'te ise 2 adet 10^3 'ün altında üreme olurken 8 adet agarda üreme olmadı. TSB solüsyonlarında ise Grup 1 ve Grup 2'de tüm solüsyonlarda üreme mevcuttu. Grup 3'te ise 2 adet tüpte bulanıklık görülürken, 8 adet tüp berraktı. Grup 4'te ise 8 adet tüpte bulanıklık mevcut iken, 2 adet tüp berrak olarak izlendi. Alınan sürüntü örneklerinde Staf. aureus üremesi olmadı.

Bu çalışmamızda PDLLA ile kaplamanın hiçbir koruyucu özelliği olmadığını, buna fosfomisin eklendiğinde koruyuculuğu sadece %20 oranında olduğu görülmüştür. Ancak gentamisin ekleme koruyuculuk oranını %80'e çıkartmıştır.

Tablo 11. Grupların koyun kanlı agarda üreme görülen implant sayısı

		Grup1	Grup2	Grup3	Grup4	Toplam	
Koyun kanlı agar	yok	n	0	0	8	2	10
		Grup içi %	0,0%	0,0%	80,0%	20,0%	25,0%
	var	n	10	10	2	8	30
		Grup içi %	100,0%	100,0%	20,0%	80,0%	75,0%
Toplam		n	10	10	10	10	40
		Grup içi %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tablo 12. Grupların TSB’de üreme görülen implant sayısı

		Grup1	Grup2	Grup3	Grup4	Toplam	
TSB	Üreme						
	yok	N	0	0	8	2	10
		Grup içi %	0,0%	0,0%	80,0%	20,0%	25,0%
	var	N	10	10	2	8	30
		Grup içi %	100,0%	100,0%	20,0%	80,0%	75,0%
Toplam		N	10	10	10	10	40
		Grup içi %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

TARTIŞMA

Ortopedik cerrahi girişimlerden sonra aseptik cerrahi şartlara ve uygun profilaktik antibiyotiklere rağmen MRSA benzeri, antibiyotiklere dirençli ve implant yüzeylerinde biyofilm tabakası oluşturan enfeksiyonlar günümüzde önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu çalışmada MRSA ile deneysel implant ilişkili sıçan osteomyelit modeli oluşturulmuş, implantın profilaksinde kullanılan gentamisin içeren PDLLA ile kaplanmasının, implantı sadece PDLLA veya fosfomisin içeren PDLLA ile kaplamaya üstün olduğu; implantı fosfomisin içeren PDLLA ile kaplamanın ise sadece Kaplamasız göre üstün olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

PDLLA kaplamalar başlangıçta implantların kemik entegrasyonunu arttırmak için tasarlanmıştır. Daha sonra biyoaktif maddelerin kontrollü salınımı için bir matriks olarak etkinliği gösterilmiştir. Kaplamada biyoaktif madde olarak antibiyotikler sıklıkla kullanılır. Biyofilm formasyonunun ve bakteri kolonizasyonunun engellenmesi için kaplamalar aktif antibiyotikleri lokal olarak taşır (75,76).

Mevcut literatürde akut osteomyelit modeli için genellikle 10^4 - 10^9 CFU/10 μ L bakteri kullanılmıştır (88-90). Lucke ve arkadaşlarının (65) sıçan tibiasına Kirschner teli uyguladıkları ve MRSA ile implant ilişkili sıçan osteomyelit modelini kullandıkları bir çalışmada 10^3 CFU bakteri kullanılmış, bu düzeyde bile enfeksiyonun oluştuğu gösterilmiştir.

Poelstra ve arkadaşları (91), tavşanların lumbal omurgasında MRSA ile uyguladıkları implant ilişkili enfeksiyon modelinde 10^2 CFU/10 μ L bakteri ekimi yapılan grupta 2 denekte üremenin gösterilemediği, 10^6 CFU/10 μ L bakteri ekimi yapılan grupta ise pürülen akıntı ve apse oluşumunun gözlendiğini, dolayısıyla imlant ile ilişkili enfeksiyon modelinde en uygun bakteri sayısının 10^3 CFU/10 μ L olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da Lucke ve arkadaşlarının modeline benzer bir model uygulanarak 10^3 CFU/10 μ L bakteri kullanılmıştır. Bu model ile Grup 1 ve Grup 2'de tüm solüsyonlarda üreme mevcuttu. Bu durum sıçanlarda tibia bölgesine implant uygulanarak oluşturulacak MRSA kaynaklı osteomyelit modelinde enfeksiyonun mikrobiyolojik olarak gösterilebilmesi için 10^3 CFU/10 μ L bakteri

ekiminin yeterli olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Lucke ve arkadaşlarının yapmış oldukları ilk çalışmalarda gentamisin içeren PDLLA ile kaplamanın ve kaplamasız titanyum k-teli içeren implant ilişkili hayvan osteomyelit modelinde gentamisinin etkin olduğunu saptamışlar (65). Daha sonra aynı modelde PDLLA ile kaplamayı tek doz iv. antibiyotik verilmesi ile karşılaştırıldığında çalışmada sadece gentamisin içeren PDLLA ile kaplamanın %90, iv tek doz gentamisin ve PDLLA kaplamalı implant kullanımında %80, sadece iv gentamisin uygulamasında %15 oranında enfeksiyon gelişimini engellediği saptanmış (87).

Ofluoğlu ve arkadaşlarına göre (92), sıçan omurgasında titanyum vida implantasyon sonrası dekortike laminaya 10^6 CFU/10 μ L S.aureus inokülasyonunun spinal enfeksiyonlar için profilaksi, tedavi ve cerrahi sonrası enfeksiyonun değerlendirilmesi için uygun bir hayvan modelidir. Aynı çalışmada 10^2 ve 10^3 CFU/10 μ L bakteri inokülasyonlarında mikrobiyolojik olarak enfeksiyon işaretleri görülürken patolojik olarak bulgular sadece 10^6 CFU/10 μ L bakteri ekiminde gözlenmişti. Bizim çalışmamızda ise bu bulgular ile çelişkili olarak 10^3 CFU/10 μ L S.aureus ekiminde bile patolojik sonuçlar gözlenmiştir. Bu durum çalışmamızın izlem süresinin Ofluoğlu ve arkadaşlarının çalışmasına göre daha uzun olmasından veya vertebra ile tibiadan histopatolojik farklılıklarından kaynaklanmış olabilir. Ofluoğlu ve arkadaşlarının çalışmasında sıçanlar sadece 2 hafta sonra sakrifiye edildiği için 10^3 CFU/10 μ L ekim ile patolojik bulguların görülmesi için yeterli zaman sağlanamamış, 10^6 CFU/10 μ L ekimde patolojik bulgular daha erken oluşmuştur.

Perioperatif olarak sistemik antibiyotik kullanımının yanı sıra yüksek başarı oranları ile lokal uygulamalar da gerçekleştirilmiştir. Gentamisinin kemik enfeksiyonlarının profilaksi ve tedavisinde lokal olarak kullanımı yaygındır. En sık kullanılan iki şekli gentamisin yüklü kemik çimentoları ile yapılan endoprotez ameliyatları ve polimetil metil akrilat boncuklarıdır (82). Çalışmamızda PDLLA kaplı implantta kullanılan gentamisin enfeksiyon profilaksisinde temel olarak boşluk doldurucu olarak sıklıkla kullanılmaktadır (65). Bu durumda ince bir PDLLA kaplaması doku/implant arayüzünde antibiyotik sağlayan bir ilaç taşıyıcısı olarak görev yapar. Gentamisin belirli bir süre için yüksek doku seviyeleri sağlayacak şekilde yüksek bir başlangıç salınımı gösterir (83). Yaklaşık 6 saat süren bu hızlı

başlangıç salınımından sonra doku/implant arayüzüne en az 96 saat süren bir antibiyotik salınımı sağlanır (84). Polimer tabakasının kalın olması durumunda ise gentamisin salınım kinetiği değişiklik gösterir. Strobel ve arkadaşları (85), tek kat PDLLA kaplamada gentamisin tamamının salındığını; 4 kat PDLLA kaplamada başlangıç gentamisin düzeyin 1/3'ünün salınmadan kaldığı göstermişlerdir. Sadece PDLLA, Gentamisin içeren PDLLA, Teikoplanin içeren PDLLA ve Teikoplanin ve gentamisin içeren PDLLA ile K-telleri ile yapılan deneysel bir çalışmada, implant çevresinde canlı bakteri sayısının azaldığı, bu değişimin gentamisin grubunda daha belirgin olduğu gösterilmiştir (86). Fuchs ve arkadaşları (62) tarafından, tibia shaftının açık ve kapalı kırıklarının cerrahi tedavisinde gentamisin kaplı intramedüller çivi kullanılmasının 6 ay sonunda klinik, laboratuvar ve radyoloji ile değerlendirilen iyileşmeye katkı sağladığı bildirilmiş; bu durum travma ve revizyon hastalarında da enfeksiyonun önlenmesi için gentamisin kaplı implantların kullanılabilmesi şeklinde yorumlanmıştır. Deneysel hayvan çalışmalarında ve insan çalışmalarında PDLLA kaplı implantlardan lokal gentamisin salınımının implant kaynaklı osteomyeliti engelleyebileceği ve sistemik antibiyotik tedavisini destekleyebileceği gösterilmiştir (87). Bizim çalışmamızda literatürle uyumlu olarak agarda ve TSB'de üreme görülen implant sayısı en düşük olarak gentamisin içeren PDLLA kaplı grupta idi.

Literatürde fosfomisin biyofilm üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır ve genel olarak üriner sistem enfeksiyonları ve florokinolon kombinasyonları ile ilgilidir. Mevcut çalışmalarda fosfomisin kombinasyon tedavilerinde biyofilmler üzerine güçlü terapötik etkisi tespit edilmiştir. Kateter kaynaklı ve hastaneden edinilmiş üriner sistem enfeksiyonlarında 4 farklı antibiyotik oral kullanımda *Pseudomonas aeruginosa* ve *E.coli* biyofilmi üzerine etkisini değerlendiren bir çalışmada siprofloksasin ve amoksisilin/klavulanik asitin, fosfomisin ve kotrimaksazole göre daha güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (50). Ofloksasine farklı duyarlılıkta *Pseudomonas aeruginosa* türleri ile oluşan biyofilminde fosfomisin ile sinerjik etki oluştuğu, fosfomisin hücrede morfolojik değişiklikler meydana getirerek hücreye ofloksasin alımını ve akümüleyonunu arttırdığı gösterilmiştir (77). Benzer şekilde prulifloksasin ve fosfomisin kombinasyonunun biyofilm üzerine etkili olduğu hayvan modellerinde bildirilmiştir (78). Post operatif intraabdominal apselerde fosfomisin biyofilmi

kırarak diğer antibiyotiklerin etkisini arttırdığı gösterilmiş olup (51), biyofilmlerdeki azalmış geçirgenliğin direnç mekanizmalarında rol oynadığı dikkate alınarak, biyofilmlere yüksek oranda penetre olabilmemesinin fosfomisin etkinliğine katkıda bulunan önemli faktörlerden olduğunu düşündürmektedir. Diğer bir çalışmada; fosfomisin bakteri hücrelerine girmesini sağlayan transport sistemi (sn-glycerol 3-phosphate transport) ekspresyon seviyesi anaerobik koşullarda artmış, ancak fosfomisin negatif yüklü bakteriyel glikokaliks ile reaksiyona girmemiştir. Bu gözlemler fosfomisin çok tabakalı biyofilmlere penetre olabildiğini ve hücrelere düşük büyüme hızı ile olan fazda taşındığını düşündürmektedir (79). Fosfomisin kombinasyon mükemmel terapötik etkisi, fosfomisin bağışıklık sistemi üzerine etkisi sonucu da olabilir. Fosfomisin lenfosit fonksiyonunu ve birçok sitokin salınımını etkiler. Fosfomisin antiinflamatuvar etkisi hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Fosfomisin sitokin kaskadını bozarak akut-faz inflamasyon yanıtını düzenleyebilir ve bu etki fosfomisin antibakteriyel etkisinden bağımsızdır (80).

Poepl ve arkadaşlarının yaptığı MRSA ile oluşturulan şıçan osteomyelit tedavisinde daptomisin iv. olarak kullanılmasının plasebodan üstün olduğu, fosfomisine göre yetersiz olduğu saptanmıştır. Daptomisin ve fosfomisin kombine verilmesi sonucunda sadece fosfomisin verilmesine göre farksız olduğu gösterilerek daptomisin etkisiz olduğu vurgulanmıştır (93). Bu grubun aynı modelde yaptıkları ilk çalışmalarında fosfomisin plaseboya üstün olduğu saptanmıştır (94).

Garrigos ve arkadaşlarının MRSA içeren doku kafesi modelinde daptomisin, imipenem ve rifampisin, fosfomisin ile iv kombinasyonlu ve kombinasyonsuz karşılaştırmalı tedavisinde tekli olarak rifampisin diğerlerine oranla anlamlı olarak etkin bulunurken (%60, %25-30) kombinasyonlu tedavilerinde daptomisin ve rifampisin (%94) en etkin olurken, fosfomisin ve rifampisin (%79), fosfomisin ve daptomisin (%82) etkinlik düzeyinde kaldığı gösterilmiştir (95). Voller ve arkadaşlarının bu konuyla ilgili çalışmaları mevcut olup, yaptıkları ilk çalışmada tavşanda osteomyelit oluşturarak (10^7 CFU *S.aures*) gentamisin içeren hidroksiapatit kaplamaya RGD (arginine, glycine, aspartik asit peptidi) eklemenin etkili olup olmadığını araştırmışlardır. Her iki durumda da kaplamanın etkin olduğu

gösterilmiştir. Bu çalışmada paslanmaz kirschner teli kullanılmıştır (96). Daha sonraki yaptıkları ikinci çalışmada yine aynı modelde ve aynı kaplama tekniğini kullanarak (bu kez titanyum kirschner teli ile) MSSA ve MRSA suşlarında karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. Bütün gruplarda rifampisin-gentamisin kombinasyonunun enfeksiyon profilaksisi açısından etkili bulunmuştur (97) Voller ve arkadaşlarından sonrasında gentamisin içeren PDLLA kaplı tibia çivisi (UTN PROtect®, Depuy&Synthes, ABD) tarafından piyasaya sürülmüştür. Kompleks tibia kırığı ve geç revizyon içeren tibia kırığı olan 21 hastadaki ön çalışmadaki sonuçları yayınlanmış olup, sonuçlar açık olmamakla beraber bu tip çivilerin kullanımını desteklediği şeklinde rapor edilmiştir (98). Ancak aradan 4 yıl geçmiş olmasına rağmen daha büyük popülasyonu ve uzun dönem sonuçlarını içeren yayın bu tezin yazıldığı dönemde henüz yayınlanmamıştır.

Mihailescu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fosfomisin, daptomisin, tegasiklin monoterapileri ve rifampin ile kombinasyonları MRSA (Bizim deneyimizde de olduğu gibi ATCC 43300.) ile albino kobaylardaki doku kafesi çalışmasında daptomisin-rifampisinin iv kombinasyonu (%67), fosfomisin-rifampisim iv kombinasyonu (%83) oranında tedavi sağlarken, tüm monoterapiler ve rifampisin içermeyen kombinasyon tedavileri yetersiz kalmıştır. Bu sebepten rifampinin antibiyofilm ajanı olarak kullanılması gerektiği rapor edilmiştir (99).

Alt ve arkadaşları (81), MSSA ve MRSA'ya karşı çimentosuz endoprotezin rifampisin-fosfomisin kaplandığı bir tavşan enfeksiyon profilaksisi modeli üzerinde çalışmışlardır. Kaplamasız veya rifampisin-fosfomisin kaplamalı K telleri tavşan tibiasına yerleştirildikten sonra 10^5 veya 10^6 ünite patojen ile kontamine edilmiştir. Kontrol grubunun tamamında anlamlı enfeksiyon bulguları ve kültür pozitifliği görülmüştür. Sonuç olarak rifampisin-fosfomisin kaplamanın hem MSSA hem de MRSA'ya karşı mükemmel antibakteriyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında Fosfomisin-Rifampisin grubunda %83 koruma elde ederken, kaplamasız grupta hiçbir koruma sağlayamamaktadır. Bizim çalışmamızda ise Gentamisin %80 koruma sağlarken, fosfomisinin sadece %20 oranında koruma sağlamıştır. Kaplamasız ve antibiyotik içermeyen PDLLA kaplamanın ise hiçbir

koruma sağlamadığı gösterilmiştir. Bu durum bize Alt ve arkadaşlarının sunduğu ve literatürde benzerleri olan kombinasyon çalışmalarında, etkinliğin fosfomisin dışındaki antimikrobiyal ajandan kaynaklandığını veya fosfomisinin kendi antibakteriyel etkisinden ziyade biyofilm üzerine potansiyel etkilerinden dolayı diğer antimikrobiyal ajanın etkinliğini arttırdığını düşündürmektedir.

KISITLILIKLAR

Çalışmamızın kısıtlılıklarından birisi her alt grupta 10 denek olacak şekilde planlanan sınırlı örneklem sayısıdır. Çalışma sırasında hiçbir deneğin kaybedilmemiş olması ve grupların sayılarında azalma olmaması dikkate alınsa da sonuçları yorumlarken çalışmanın istatistiksel gücünün sınırlılığı akılda tutulmalıdır. Çalışmamızda daha geniş bir grupta farklı sayıda (10^2 , 10^6) inokülasyon yapılabilmiş olsaydı özellikle düşük sayıda etkenin olduğu ekimlerde fosfomisin içeren PDLLA ile sadece PDLLA arasındaki farklılık daha belirgin hale gelebileceğinden enfeksiyonun şiddetine göre klinisyeni yönlendirebilecek öneriler sunulabilirdi. Son olarak farklı gruplardaki deneklerin vücut ağırlıklarının eşleştirilmemiş olmasının enfeksiyona cevap konusunda farklılıklar yaratabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

SONUÇ

Bu çalışmamızda temel olarak implant kaplamasında fosfomisin eklenmesinin gentamisin eklenmesinden üstün olmadığı, fosfomisin içeren PDLLA kaplamanın, Kaplamasız gruptan daha iyi olduğunu bulduk. Yukarıda belirtilen çalışmalar ve bizim sonuçlarımız fosfomisinin antibiyotik profilaksisinde lokal etkinliğinin olmayabileceği yönünde olup; bu durumun biyofilme yetersiz kalabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak bizim çalışmamız sırasında 14.günde fosfomisin içeren PDLLA kaplamanın, Kaplamasız gruba üstün olduğunu 42. günde istatistiksel olarak anlamlı görülmemesinin doz bağımlı olabileceğini düşündürmektedir. Fakat daha yüksek konsantrasyonlardaki antibiyotik kullanımının polimer (PDLLA) integritesini bozabileceği ve göz önüne alınmalıdır. Bu nedenlerle daha ileri çalışmaların yapılarak geliştirilmesinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Lewallen EA, Riester SM, Bonin CA, Kremers HM, Dudakovic A, Kakar S et al. Biological strategies for improved osseointegration and osteoinduction of porous metal orthopedic implants. *Tissue Eng Part B Rev.* 2015;21:218-30.
2. Campoccia D, Visai L, Renò F, Cangini I, Rizzi M, Poggi A et al. Bacterial adhesion to poly-(D,L)lactic acid blended with vitamin E: toward gentle anti-infective biomaterials. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103:1447-58.
3. Ehrensberger MT, Tobias ME, Nodzo SR, Hansen LA, Luke-Marshall NR, Cole RF, et al. Cathodic voltage-controlled electrical stimulation of titanium implants as treatment for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* periprosthetic infections. *Biomaterials.* 2015;41:97-105.
4. Zimmerli W. Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *J Intern Med.* 2014;276:111-9.
5. Laffer RR, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W. Outcome of prosthetic knee-associated infection: evaluation of 40 consecutive episodes at a single centre. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:433-9.
6. Zhang L, Yan J, Yin Z, Tang C, Guo Y, Li D et al. Electrospun vancomycin-loaded coating on titanium implants for the prevention of implant-associated infections. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:3027-36.
7. Ketonis C, Parvizi J, Jones LC. Evolving strategies to prevent implant-associated infections. *J Am Acad Orthop Surg.* 2012;20:478-80.
8. Gillespie WJ, Walenkamp GH. Antibiotic prophylaxis for surgery for proximal femoral and other closed long bone fractures. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;3:1-68.
9. Chern A, Greenberg SE, Thakore RV, Sathiyakumar V, Obrebsky WT, Sethi MK. Factors driving readmissions in tibia and femur fractures. *Adv Orthop.* 2015;2015:974543.

10. Pajarinen J, Jamsen E, Konttinen YT, Goodman SB. Innate Immune Reactions in Septic and Aseptic Osteolysis around Hip Implants. *J Long Term Eff Med Implants*. 2014;24:283-96.
11. Busscher HJ, van der Mei HC, Subbiahdoss G, Jutte PC, van den Dungen JJ, Zaat SA, et al. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. *Sci Transl Med*. 2012;4:153.
12. Montanaro L, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G, et al. Scenery of Staphylococcus implant infections in orthopedics. *Future Microbiol*. 2011;6:1329-49.
13. Styriak I, Lauková A, Fallgren C, Wadström T. Binding of extracellular matrix proteins by animal strains of staphylococcal species. *Vet Microbiol*. 1999;67:99-112.
14. Yue B. Biology of the extracellular matrix: an overview. *J Glaucoma*. 2014;23:20-3.
15. Loeser RF. Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biol*. 2014;39:11-6.
16. Harris LG, Richards RG. Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury*. 2006;37:3-14.
17. Joh D, Speziale P, Gurusiddappa S, Manor J, Höök M. Multiple specificities of the staphylococcal and streptococcal fibronectin-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules. *Eur J Biochem*. 1998;258:897-905.
18. Brown NL, Rose MB, Blueschke G, Cho EH, Schoenfish MH, Erdmann D et al. Bioburden after Staphylococcus aureus inoculation in type 1 diabetic rats undergoing internal fixation. *Plast Reconstr Surg*. 2014;134:412-19.
19. Roesgen M, Hierholzer G, Hax PM. Post-traumatic osteomyelitis. Pathophysiology and management. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1989;108:1-9.
20. Antoci V, Ono CM, Antoci V Jr, Raney EM. Pin-tract infection during limb lengthening using external fixation. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2008;37:150-4.

21. Scalea TM, Boswell SA, Scott JD, Mitchell KA, Kramer ME, Pollak AN. External fixation as a bridge to intramedullary nailing for patients with multiple injuries and with femur fractures: damage control orthopedics. *J Trauma*. 2000;48:613-21.
22. Maurer DJ, Merkow RL, Gustilo RB. Infection after intramedullary nailing of severe open tibial fractures initially treated with external fixation. *J Bone Joint Surg Am*, 1989;71: 835 -8.
23. Malhotra R, Chan CS, Nather A. Osteomyelitis in the diabetic foot. *Diabet Foot Ankle*. 2014;30;5.
24. Oto M. Kronik osteomyelit'te tanı ve medikal - cerrahi tedavi kombinasyonunun değeri. *Pamukkale Tıp Dergisi* 2008;1:50-8.
25. Kalander AM, Güner S. Kronik osteomyelit. *TOTBİD Dergisi* 2011;10:216-24.
26. Öztuna V. Osteomyelit patofizyolojisi ve tedavi prensipleri. *TOTBİD Dergisi*. 2005;4:63-71.
27. Günal Ö, Tuncel O, Ülger A. A comprehensive review of osteomyelitis. *Çağdaş Tıp Dergisi* 2012;2: 50-63.
28. Acikgoz G, Averill LW. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis: typical patterns of bone involvement in whole-body bone scintigraphy. *Nucl Med Commun*. 2014;35:797-807.
29. Pugmire BS, Shailam R, Gee MS. Role of MRI in the diagnosis and treatment of osteomyelitis in pediatric patients. *World J Radiol*. 2014;6:530-7.
30. Revest M, Patrat-Delon S, Devillers A, Tattevin P, Michelet C. Contribution of 18fluoro-deoxyglucose PET/CT for the diagnosis of infectious diseases. *Med Mal Infect*. 2014;44:251-60.
31. Korean Society for Chemotherapy; Korean Society of Infectious Diseases; Korean Orthopaedic Association. Clinical guidelines for the antimicrobial treatment of bone and joint infections in Korea. *Infect Chemother*. 2014;46:125-38.
32. Cierny G 3rd, Mader JT, Penninck JJ. A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;414:7-24.
33. Shah J. Hyperbaric oxygen therapy. *J Am Col Certif Wound Spec*. 2010;2:9-13.

34. Dhanoa A, Singh VA, Mansor A, Yusof MY, Lim KT, Thong KL. Acute haematogenous community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an adult: case report and review of literature. *BMC Infect Dis.* 2012;12:270.
35. Kishner S, Khan FA, Laborde JM. Osteomyelitis Treatment & Management. in *Osteomyelitis* (Ed) Harris Gellman. Medscape, Erişim Tarihi: 21.04.2015.
36. Raad I, Alrahan A, Rolston K. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis.* 1998;26:1182-7.
37. Forrest GN, Tamura K. Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:14-34.
38. Calhoun JH, Manring MM. Adult osteomyelitis. *Infect Dis Clin North Am.* 2005;19:765-86.
39. Kim BN, Kim ES, Oh MD. Oral antibiotic treatment of staphylococcal bone and joint infections in adults. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:309-22.
40. Kittinger C, Marth E, Windhager R, Weinberg AM, Zarfel G, Baumert R et al. Antimicrobial activity of gentamicin palmitate against high concentrations of *Staphylococcus aureus*. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22:1447-53.
41. Tunney MM, Ramage G, Patrick S, Nixon JR, Murphy PG, Gorman SP. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from orthopedic implants following revision hip surgery. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:3002-5.
42. Riegels-Nielsen P, Espersen F, Hölmich LR, Frimodt-Møller N. Collagen with gentamicin for prophylaxis of postoperative infection. *Staphylococcus aureus* osteomyelitis studied in rabbits. *Acta Orthop Scand.* 1995;66:69-72.
43. Beardmore AA, Brooks DE, Wenke JC, Thomas DB. Effectiveness of local antibiotic delivery with an osteoinductive and osteoconductive bone-graft substitute. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87:107-12.
44. Gentamycin. PubChem Kimya Veritabanı, Erişim Tarihi: 21.04.2015
45. Michalopoulos AS, Livaditis IG, Gougoutas V. The revival of fosfomicin. *Int J Infect Dis.* 2011;15:732-9.
46. Phosphonomycin. PubChem Kimya Veritabanı, Erişim Tarihi: 21.04.2015.

47. Ruxer J, Możdżan M, Siejka A, Loba J, Markuszewski L. Fosfomicin and nitrofurantoin in the treatment of recurrent urinary tract infections in type 2 diabetic women: a preliminary report. *Diabetologia Doświadczalna i Kliniczna* 2006;6:5.
48. Annika I. Nilsson, Otto G. Berg, Olle Aspevall, Gunnar Kahlmeter, Dan I. Andersson. Biological costs and mechanisms of fosfomicin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2850–8.
49. Baylan O. Fosfomicin: past, present and future. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44:311-21.
50. Rodríguez-Martínez JM, Ballesta S, Pascual A. Activity and penetration of fosfomicin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;30:366-8.
51. Kusachi S, Nagao J, Saida Y, Watanabe M, Okamoto Y, Asai K et al. Antibiotic time-lag combination therapy with fosfomicin for postoperative intra-abdominal abscesses. *J Infect Chemother.* 2011;17:91-6.
52. Freney J, Kloos WE, Hajek V, Webster JA, Bes M, Brun Y, et al. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci of the International Committee on Systematic Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49:489-502.
53. Ak Ö. Benzonana NA, Balkan İİ, Özer S. Katalaz negatif staphylococcus aureus'a bağlı bir yumuşak doku infeksiyonu: olgu sunumu. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi* 2004;3:170-1.
54. Barth E, Myrvik QM, Wagner W, Gristina AG. In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomaterials.* 1989;10:325-8.
55. Yoon YK, Kim ES, Hur J, Lee S, Kim SW, Cheong JW, et al. Oral Antimicrobial Therapy: Efficacy and Safety for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections and Its Impact on the Length of Hospital Stay. *Infect Chemother.* 2014;46:172-81.
56. Chen AF, Schreiber VM, Washington W, Rao N, Evans AR. What is the rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Gram-negative infections in open fractures? *Clin Orthop Relat Res.* 2013;471:3135-40.
57. Hardin Library for the Health Sciences, University of Iowa. <http://hardinmd.lib.uiowa.edu/cdc/staph/sem3.html>, Erişim Tarihi: 21.04.2015
58. Hardin Library for the Health Sciences, University of Iowa. <http://hardinmd.lib.uiowa.edu/cdc/staph/sem2.html>, Erişim Tarihi: 21.04.2015.

59. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*. 1999;67:5427-33.
60. Gültaş N, Bayrakal V, Bayar İH. Gentamisin etkisi altındaki *staphylococcus aureus* suşlarının biyofilm ve koagülaz yanıtları ile mikroçevre ilişkisinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2013;46:19-26.
61. Gosselin RA, Roberts I, Gillespie WJ. Antibiotics for preventing infection in open limb fractures. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;(1):CD003764.
62. Fuchs T, Stange R, Schmidmaier G, Raschke MJ. The use of gentamicin-coated nails in the tibia: preliminary results of a prospective study. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2011;131:1419-25.
63. Ostermann PA, Seligson D, Henry SL. Local antibiotic therapy for severe open fractures. A review of 1085 consecutive cases. *J Bone Joint Surg Br*. 1995;77:93-7.
64. Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury*. 2006;37:S105-12.
65. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP et al. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone*. 2003;32:521-31.
66. Malhas AM, Lawton R, Reidy M, Nathwani D, Clift BA. Causative organisms in revision total hip & knee arthroplasty for infection: Increasing multi-antibiotic resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* and the implications for antibiotic prophylaxis. *Surgeon*. 2014; 6:1-6.
67. Riool M, de Boer L, Jaspers V, van der Loos CM, van Wamel WJ, Wu G, et al. *Staphylococcus epidermidis* originating from titanium implants infects surrounding tissue and immune cells. *Acta Biomater*. 2014;10:5202-12.
68. Boelens JJ, Dankert J, Murk JL, Weening JJ, van der Poll T, Dingemans KP, et al. Biomaterial-associated persistence of *Staphylococcus epidermidis* in pericatheter macrophages. *J Infect Dis*. 2000;181:1337-49.
69. Metsemakers WJ, Emanuel N, Cohen O, Reichert M, Potapova I, Schmid T, et al. A doxycycline-loaded polymer-lipid encapsulation matrix coating for the prevention of implant-related osteomyelitis due to doxycycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Control Release*. 2015. 10.1016/j.jconrel.2015.04.022.

70. Schildhauer TA, Robie B, Muhr G, Köller M. Bacterial adherence to tantalum versus commonly used orthopedic metallic implant materials. *J Orthop Trauma*. 2006;20:476-84.
71. Allerberger F, Klare I. In-vitro activity of fosfomycin against vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother*. 1999;43:211-7.
72. Barry AL, Pfaller MA, Fuchs PC, Tenover FC, Reller LB, Allen SD et al. Interpretive criteria and quality control parameters for determining bacterial susceptibility to fosfomycin tromethamine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993;12:352-6.
73. An YH, Friedman RJ. Animal models of orthopedic implant infection. *J Invest Surg*. 1998;11:139-46.
74. Petty W, Spanier S, Shuster JJ, Silverthorne C. The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. *J Bone Joint Surg Am*. 1985;67:1236-44.
75. Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res*. 2001;58:449-55.
76. Jennings JA, Carpenter DP, Troxel KS, Beenken KE, Smeltzer MS, Courtney HS, et al. Novel Antibiotic-loaded Point-of-care Implant Coating Inhibits Biofilm. *Clin Orthop Relat Res*. 2015.21.
77. Monden K, Ando E, Iida M, Kumon H. Role of fosfomycin in a synergistic combination with ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *J Infect Chemother* 2002;8:218–26.
78. Cai Y, Fan Y, Wang R, An MM, Liang BB. Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomycin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and biofilm infections in a rat model. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:563–6.
79. Mikuniya T, Kato Y, Ida T, Maebashi K, Monden K, Kariyama R, et al. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomycin in a rat urinary tract infection model. *J Infect Chemother* 2007;13:285–90.
80. Morikawa K, Oseko F, Morikawa S. Immunomodulatory effect of fosfomycin on human B-lymphocyte function. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:270-5.
81. Alt V, Kirchhof K, Seim F, Hrubesch I, Lips KS, Mannel H, et al. Rifampicin-fosfomycin coating for cementless endoprostheses: antimicrobial effects against

- methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Acta Biomater.* 2014;10:4518-24.
82. Blaha JD, Calhoun JH, Nelson CL, Henry SL, Seligson D, Esterhai JL Jr, et al. Comparison of the clinical efficacy and tolerance of gentamicin PMMA beads on surgical wire versus combined and systemic therapy for osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;295:8-12.
 83. Teller M, Gopp U, Neumann HG, Kühn KD. Release of gentamicin from bone regenerative materials: an in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;81:23-9.
 84. Nelson CL, Hickmon SG, Harrison BH. Elution characteristics of gentamicin-PMMA beads after implantation in humans. *Orthopedics.* 1994;17:415-6.
 85. Strobel C, Schmidmaier G, Wildemann B. Changing the release kinetics of gentamicin from poly(D,L-lactide) implant coatings using only one polymer. *Int J Artif Organs.* 2011;34:304-16.
 86. Gollwitzer H, Ibrahim K, Meyer H, Mittelmeier W, Busch R, Stemberger A. Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:585-91.
 87. Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Schiller R, Stemberger A, et al. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone.* 2005;36:770-8.
 88. Korkusuz F, Uchida A, Shinto Y, Araki N, Inoue K, Ono K. Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites. *J Bone Joint Surg Br.* 1993;75:111-4.
 89. Littlewood-Evans AJ, Hattenberger MR, Lüscher C, Pataki A, Zak O, O'Reilly T. Local expression of tumor necrosis factor alpha in an experimental model of acute osteomyelitis in rats. *Infect Immun.* 1997;65:3438-43.
 90. Ekince B. Sıçan omurgasında implant ilişkili enfeksiyon modelinde vankomisin emdirilmiş metilmetakrilatın tedavi etkinliği. Tıpta Uzmanlık Tezi, 2007, İstanbul.
 91. Poelstra KA, Barekzi NA, Grainger DW, Gristina AG, Schuler TC. A novel spinal implant infection model in rabbits. *Spine (Phila Pa 1976).* 2000;25:406-10.
 92. Oflluoglu EA, Zileli M, Aydın D, Baris YS, Kuçukbasmaci O, Gonullu N, et al. Implant-related infection model in rat spine. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2007;127:391-6.

93. Poepl W, Tobudic S, Lingscheid T, Plasenzotti R, Daptomycin, fosfomicin, or both for treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an experimental rat model, *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4999–5003.
94. Poepl W, Tobudic S, Lingscheid T, Plasenzotti R. Efficacy of fosfomicin in experimental osteomyelitis due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55: 931–3.
95. Garrigos C, Murillo O, Lora Tamayo J, Verdaguer R, Tubau F, Cabellos C et al. Fosfomicin-daptomycin and other fosfomicin combinations as alternative therapies in experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:606-10.
96. Alt V, Bitschnau A, Osterling J, Sewing A. The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prosthesis on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials.* 2006;27:4627-34.
97. Alt V, Kirchof K, Seim H. Rifampicin-fosfomicin coating for cementless endoprostheses: antimicrobial effects against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Acta Biomater.* 2014;10:4518-24.
98. Fuchs T, Stange R, Schmidmaier G, Raschke MJ. The use of gentamicin-coated nails in the tibia: preliminary results of a prospective study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2011;131: 1419–25.
99. Mihailescu R, Tabin UF, Corvec S. High activity of fosfomicin and rifampin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* biofilm in vitro and in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58: 2547–53.