calosc.qxp 2007-09-19 09:29 Page 102

ARTYKUŁ ORYGINALNE / ORIGINAL ARTICLE

Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja
© MEDSPORTPRESS, 2007; 3(6); Vol. 9, 310-318

Zaangażowanie Autorów
A – Przygotowanie projektu badawczego
B – Zbieranie danych
C – Analiza statystyczna
D – Interpretacja danych
E – Przygotowanie manuskryptu
F – Opracowanie piśmiennictwa
G – Pozyskanie funduszy

Author's Contribution
A – Study Design
B – Data Collection
C – Statistical Analysis
D – Data Interpretation
E – Manuscript Preparation
F – Literature Search
G – Funds Collection

Marzenna Bartoszewicz[1(D,E,F)], Anna Rygiel[1(C,F)], Marek Krzemiński[2(B)], Anna Przondo-Mordarska[1(A)]

[1] *Katedra Mikrobiologii AM, Wrocław*
[2] *Oddział Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu Szpital Specjalistyczny, Kościerzyna*
[1] *Department of Microbiology, Medical University in Gdańsk, Poland*
[2] *Department of Orthopaedics and Musculoskeletal Traumatology, Specialised Hospital in Kościerzyna, Poland*

Penetracja wybranego antybiotyku i antyseptyku w biofilmie tworzonym na stalowych wszczepach stosowanych w ortopedii

Penetration of a selected antibiotic and antiseptic into a biofilm formed on orthopedic steel implants

Słowa kluczowe: *dichlorowodorek octenidyny, adhezja, MIC*
Key words: *octenidine hydrochloride, adhesion, MIC*

STRESZCZENIE

Wstęp. *Celem pracy była ocena wpływu dichlorowodorku octenidyny i gentamycyny na przeżywalność bakterii i redukcję biofilmu tworzonego na metalowych implantach ortopedycznych.*

Materiał i metody. *Materiałem do badań były metalowe elementy ortopedyczne (śruby, gwoździe, fragmenty drutów stosowanych w aparatach Ilizarowa) oraz martwak kostny. Obecność i intensywność produkcji biofilmu na biomateriałach medycznych badano metodą Richardsa za pomocą wizualnej oceny redukcji TTC (2,3,5 triphenyltetrazolium chloride) przez żywe bakterie. Obecność i strukturę wytwarzanego biofilmu powstającego na elementach aparatu Ilizarowa, śrubach oraz martwaku kostnym analizowano również metodą mikroskopii elektronowej. Przeżywalność bakterii w biofilmie w stosunku do zastosowanego antybiotyku i antyseptyku badano metodą mikrorozcieńczeń w płytkach tetracyjnych wg CLSI z zastosowaniem TTC.*

Wyniki. *Większość spośród 16 badanych szczepów (S. aureus, S. epidermidis, E. coli, Enterobacter) izolowanych z implantów ortopedycznych, pochodzących od pacjentów leczonych ortopedycznie, była zdolna do tworzenia biofilmu. Badane szczepy po utworzeniu struktury biofilmu wykazywały oporność na gentamycynę i dichlorowodorek octenidyny. Badane szczepy po utworzeniu struktury biofilmu wykazywały większą wrażliwość na dichlorowodorek octenidyny w porównaniu z gentamycyną.*

Wnioski. *Przeprowadzone badania pozwalają na stwierdzenie, że zastosowanie dichlorowodorku octenidyny w zakażeniach związanych z tworzeniem struktury biofilmu na implantach ortopedycznych jest skuteczniejsze niż zastosowanie gentamycyny.*

SUMMARY

Background. *The aim of the study was to determine the impact of octenidine hydrochloride and gentamicin on bacterial survival and reduction of biofilms formed on orthopaedic metal implants.*

Material and methods. *We studied metal orthopaedic components (screws, nails, fragments of wires used in Ilizarov devices) and a bone sequester. The presence and intensity of biofilm formation on the medical biomaterials was determined using the method of Richards et al. by visual evaluation of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) reduction by viable bacteria. The presence and structure of the biofilm on the components of the Ilizarov device, screws and bone sequester was also studied by electron microscopy. Bacterial survival in the biofilm following exposure to the antibiotic and antiseptic was studied by CLSI microdilution method in microtitre plates using TTC.*

Results. *Most of the 16 strains (S. aureus, S. epidermidis, E. coli, Enterobacter) isolated from orthopaedic implants were able to form a biofilm. Established biofilms were resistant to gentamicin and octenidine hydrochloride but demonstrated greater susceptibility to octenidine.*

Conclusions. *The results of the study indicate that octenidine hydrochloride is more effective than gentamicin in the treatment of infections associated with the formation of a biofilm on orthopaedic implants.*

Liczba słów/Word count: 3918 **Tabele/Tables:** 4 **Ryciny/Figures:** 5 **Piśmiennictwo/References:** 10

Adres do korespondencji / Address for correspondence
dr Marzena Bartoszewicz
Katedra Mikrobiologii A.M. Wrocław
50-368 Wrocław, ul. Chałubińskiego 4, tel./fax: (0-71)784-13-01, e-mail: marzbp@mbio.am.wroc.pl

Otrzymano / Received *27.11.2006 r.*
Zaakceptowano / Accepted *05.03.2007 r.*

calosc.qxp 2007-09-19 09:29 Page 103

WSTĘP

Stosowanie wszczepów stanowi podstawę leczenia w ortopedii i traumatologii narządu ruchu. Zakażenia są jednym z powikłań po zabiegach wszczepienia ciała obcego, co prowadzi do przedłużenia antybiotykoterapii, często reoperacji, utraty kończyny, a nawet śmierci. Częstość zakażeń waha sie od 0.5% do 10% w zależności od zastosowanego typu implantu, rodzaju i rozległości zabiegu, a także wieku pacjenta, chorób współistniejących (cukrzyca, zaburzenia odporności), stanu odżywienia i stopnia kontaminacji pola operacyjnego. Drobnoustroje mogą pochodzić ze skóry lub błon śluzowych chorego i/lub zespołu operacyjnego, ze środowiska szpitalnego, przeniesione na rękach personelu medycznego, a także z założonych cewników i drenów.

Najczęstszymi czynnikami etiologicznymi zakażeń po operacjach ortopedycznych są Staphylococcus epidermidis 55% (pierwsze opisane zakażenia wywołane CNS to zakażenia u chorych z wszczepionymi endoprotezami (1985), Staphylococcus aureus 10%, pałeczki Gram (-) 35% [1].

Podstawowym mechanizmem zakażenia jest początkowo nieswoiste zasiedlenie biomateriału w momencie implantacji. Jeśli bakterie znajdą się na powierzchni wszczepu rozpoczyna się proces kolonizacji i akumulacji. Peters i wsp. obserwując w mikroskopie elektronowym implanty z biomateriałów, które poddawali różnoczasowej ekspozycji na gronkowce koagulazoujemne, zauważyli tworzenie mikrokolonii po 40-60 min, a rozległa kolonizacja była widoczna po 6-12 h. W miarę wydłużania czasu oddziaływania bakterii na biomateriał, komórki bakteryjne zaczynają otaczać się zewnątrzkomórkowym materiałem śluzowym pokrywając implant cienką warstwą biofilmu [2,3,4]. Biofilm chroni komórkę bakteryjną przed mechanizmami obronnymi ustroju gospodarza: utrudnia fagocytozę, opsonizację, zaburza chemotaksję, hamuje blastogenezę komórek T i B, zmniejsza penetrację antybiotyków i przeciwciał. Bakterie tworzące biofilm mają zwolniony metabolizm i podlegają zmianom fenotypowym, które warunkują ich oporność i zjadliwość [5,6]. Zapobieganie zakażeniom w ortopedii i traumatologii narządu ruchu związane z powstawaniem biofilmu na implantach wiąże się ściśle z zastosowaniem okołooperacyjnej profilaktyki antybiotykowej, właściwych technik chirurgicznych, a także właściwym przygotowaniem antyseptycznym pacjenta do zabiegu [7,8]. Przy wyborze antyseptyku należy brać pod uwagę jego szerokie spektrum (w tym bakterie produkujące śluz), brak właściwości drażniących skórę i błony śluzowe, bezbarwność preparatu, brak niepożądanych działań toksycznych (preparaty jodowe u dzieci), szybkie działanie, chemiczne zabezpieczenie przed kontaminacją.

Celem pracy była ocena wpływu dichlorowodorku octenidyny i gentamycyny na przeżywalność bakterii i redukcję biofilmu tworzonego na metalowych implantach ortopedycznych.

BACKGROUND

Implants are the mainstay of treatment in orthopaedics and musculoskeletal traumatology. Infections are a complication of foreign body implantation procedures that leads to prolonged antibiotic treatment and often necessitates repeat surgery, amputation of the affected limb or even death. The incidence of infections is from 0.5% to 10%, depending on the type of implant, the type and extent of surgery as well as patient age and co-morbidity (diabetes, immunocompromised states), nutrition status and the degree of contamination of the operating field. Microorganisms may be present on the skin or mucous membranes of the patient and/or members of the operating team, or may come from the hospital environment, be transferred on the hands of hospital staff or develop on inserted catheters and drains.

The most common pathogens responsible for infections following orthopaedic surgery are Staphylococcus epidermidis [55%] (the first CNS infections were actually described in patients with endoprostheses (1985)), Staphylococcus aureus [10%], and Gram-negative rods [35%] [1].

The initial pathomechanism of the infection is non-specific colonisation of the biomaterial during implantation. If there are bacteria on the surface of the implant, colonisation and accumulation begins. Peters et al. carried out an electron microscope study of biomaterial implants which they had exposed to coagulase-negative staphylococci. They observed microcolony formation after 40-60 minutes and extensive colonisation after 6-12 hours. With prolonged exposure of the biomaterial to bacteria, the bacterial cells become enveloped in an extracellular mucous substance, thus covering the implant with a thin biological film [2,3,4]. The biofilm protects the bacterial cells from the host's defence mechanisms by hindering phagocytosis and opsonisation, impairing chemotaxis, inhibiting T- and B-cell blastogenesis, and decreasing antibiotic and antibody penetration. Biofilm-forming bacteria slow down their metabolism and exhibit phenotypic changes that determine their resistance and virulence [5,6]. The prevention of infections in orthopaedics and musculoskeletal traumatology associated with the formation of a biofilm on implants relies heavily on perioperative antibiotic prophylaxis, appropriate surgical technique and adequate pre-surgery antiseptic procedures [7,8]. The antiseptic used for this purpose should have a broad spectrum of activity (including mucus-producing bacteria), should not produce irritation of the skin or mucous membranes, should be colourless, should not cause toxicity side effects (iodine preparations in children), should have a rapid onset of action and provide chemical protection against contamination.

The aim of the study was to evaluate the impact of octenidine hydrochloride and gentamicin on bacterial survival and biofilm formation on metal orthopaedic implants.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były metalowe elementy ortopedyczne (śruby, gwoździe, fragmenty drutów stosowanych

MATERIAL AND METHODS

We studied metal orthopaedic components (screws, nails, fragments of wires used in Ilizarov devices) and

calosc.qxp 2007-09-19 09:29 Page 104

w aparatach Ilizarowa) oraz martwak kostny usunięte pacjentom hospitalizowanym w Oddziale Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu Szpitala Specjalistycznego w Kościerzynie. Od każdego pacjenta pobrano po 2 próbki materiału i w odpowiednich warunkach przetransportowano do laboratorium mikrobiologicznego.

Z dostarczonego materiału zidentyfikowano szczepy S. aureus, S. epidermidis, E. coli, Enterobacter (jeden rodzaj od jednego pacjenta) (Tab. 1).

Wykrywanie biofilmu bakteryjnego

Obecność i intensywność produkcji biofilmu na biomateriałach medycznych badano metodą Richardsa za pomocą wizualnej oceny redukcji TTC (2,3,5 triphenyltetrazolium chloride) przez żywe bakterie. Stalowe implanty i fragment martwaka inkubowano przez 24 h w 37°C w probówkach zawierających po 5 ml podłoża TSB w celu pozostawienia jedynie ściśle przylegających bakterii. Następnie do podłoża dodawano po 1 kropli 1% roztworu TTC i oceniano obecność czerwonego formazanu powstającego w reakcji redukcji TTC przeprowadzanej przez aktywne metabolicznie drobnoustroje [9].

Mikroskopia elektronowa

Do wykonania zdjęć użyto materiałów wykazujących redukcję TTC na powierzchni. Obecność i strukturę wytwarzanego biofilmu powstającego na elementach aparatu Ilizarowa, śrubach oraz martwaku kostnym analizowano metodą mikroskopii elektronowej. Oglądanie oraz wykonanie zdjęć przeprowadzono we współpracy z Politechniką Wrocławską, przy użyciu mikroskopu elektronowego JSM- 5800 LV firmy Jeol.

Oznaczanie MIC antybiotyku w biofilmie

Przeżywalność bakterii w biofilmie w stosunku do zastosowanego antybiotyku, badano metodą mikrorozcień-

a bone sequester recovered from patients undergoing treatment at the Department of Orthopaedics and Musculoskeletal Traumatology of the Specialised Hospital in Kościerzyna. Two samples of the material were obtained from each patients and transported under appropriate conditions to a microbiology laboratory.

The samples yielded strains of S. aureus, S. epidermidis, E. coli, and Enterobacter (one strain from each patient), (Tab. 1)

Detection of a bacterial biofilm

The presence and intensity of biofilm production on the medical biomaterials was studied using Richards' method by visual estimation of TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) reduction by viable bacteria. The steel implants and a fragment of the sequester were incubated at 37oC for 24 hours in test tubes containing 5 ml TSB substrate each to remove all but strongly adhering bacteria. One drop of a 1% TTC solution was then added to the substrate and the tubes were screened for the presence of purple formazan, the product of reduction of TTC by metabolically active microorganisms [9].

Electron microscopy studies

Images were obtained of samples demonstrating TTC reduction on the surface. The presence and structure of the biofilm formed on components of the Ilizarov device, screws and bone sequester was analysed using electron microscopy. The samples were viewed and images obtained in collaboration with the Wrocław University of Technology using an JSM- 5800 LV electron microscope manufactured by Jeol.

Determination of antibiotic MIC in the biofilm

Bacterial survival in the biofilm following exposure to the antibiotic was studied by CLSI microdilution method

Tab. 1. Rodzaje drobnoustrojów izolowane z posiewów stalowych implantów od pacjentów po zabiegach ortopedycznych
Tab. 1. Microorganisms isolated from steel implants obtained from patients after orthopaedic surgery

Pacjent Patient	1		2		3		4		5		6		7		8	
Materiał Material	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Wyizolowany drobnoustrój Isolate	S.aureus	S.aureus	S.epidermidis	S.epidermidis	S.aureus	S.aureus	E.coli	E.coli	Enterobacter sp	Enterobacter sp	S.aureus	S.aureus	E.coli	E.coli	E.coli	E.coli

Tab. 2. Wartości stężeń antybiotyku i dichlorowodorku octenidyny użyte do odczytu wartości MIC
Tab. 2. The values of antibiotic and octenidine hydrochloride concentrations used for MIC determination

Nr dołka Well no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Stężenie antybiotyku i octenidyny [µg/ml] Antibiotic and octenidine concentrations	0.12	0.24	0.48	0.97	1.95	3.9	7.8	15.6	31.25	62.5	125	250

calosc.qxp 2007-09-19 09:29 Page 105

czeń w płytkach tetracyjnych wg CLSI. Do badań użyto gentamycyny oraz szczepów produkujących biofilm, które in vitro wykazywały wrażliwość na stosowany lek. Odpowiednią zawiesinę szczepów (5x105 kom/dołek) nanoszono do poszczególnych studzienek po 200ul. Płytkę inkubowano 24 h/ 37°C celem wytworzenia biofilmu. Do przepłukanych PBS-em dołków dodawano kolejne rozcieńczenia antybiotyku w MHB (0,12 – 250 g/ml), (Tab. 2). Kontrolę stanowiła planktonowa hodowla badanego szczepu. Odczytu dokonywano po 24 h inkubacji z TTC, oceniając jego redukcję w żywych komórkach do czerwonego formazanu.

Oznaczanie MIC antyseptyku w biofilmie

Przeżywalność bakterii w biofilmie w stosunku do zastosowanego antyseptyku, badano metodą mikrorozcieńczeń w płytkach tetracyjnych wg CLSI. Do badań użyto dichlorowodorku octenidyny oraz szczepów produkujących biofilm. Odpowiednią zawiesinę szczepów (5x105 kom/ dołek) nanoszono do poszczególnych studzienek po 200ul. Płytkę inkubowano 24 h/ 37°C celem wytworzenia biofilmu. Do przepłukanych PBS-em dołków dodawano kolejne rozcieńczenia antyseptyku w MHB (0,12-250 /ml) (Tab. 2). Kontrolę stanowiła planktonowa hodowla badanego szczepu. Odczytu dokonywano po 24 h inkubacji z TTC, oceniając jego redukcję w żywych komórkach do czerwonego formazanu.

WYNIKI

Większość spośród 16 badanych szczepów (S. aureus, S. epidermidis, E. coli, Enterobacter) izolowanych z implantów ortopedycznych, pochodzących od pacjentów leczonych ortopedycznie była zdolna do tworzenia biofilmu po 24 godzinach inkubacji i wytwarzała struktury biofilmu na średnim lub wysokim poziomie na obu lub jednej próbce.

Produkcję biofilmu uwidoczniono makroskopowo metodą Richardsa oraz zdjęciami w mikroskopie elektronowym, scaningowym (Ryc. 1, 2, 3).

in microtitre plates. We used gentamicin and biofilm-producing strains that were sensitive to the antibiotic in vitro. 200ul suspension of the appropriate strain (5x105 cells/well) was placed in each well. The plate was incubated at 37oC for 24 hours so that a biofilm could form. The antibiotic at successive dilutions (0.12-250 g/ml) in MHB was added to PBS-rinsed wells (Tab. 2). A planktonic culture of the same strain served as a control. The reduction of TTC in viable cells to purple formazan was assessed visually after 24 h incubation with TTC.

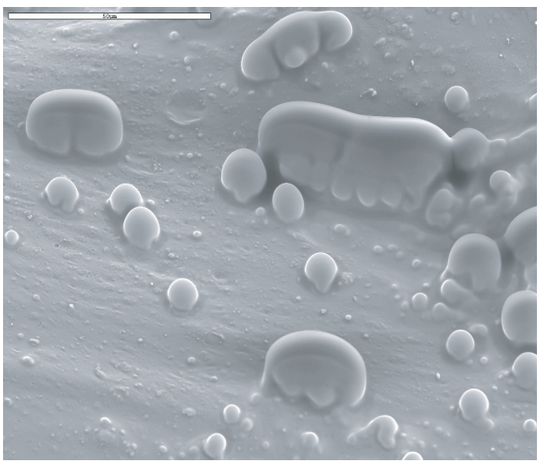
Determination of antiseptic MIC in the biofilm

Bacterial survival in the biofilm following exposure to the antiseptic was studied by CLSI microdilution method in microtitre plates. Octenidine hydrochloride and biofilm-producing strains were used. 200ul suspension of the appropriate strain (5x105 cells/well) was placed in each well. The plate was incubated at 37°C for 24 hours so that a biofilm could form. The antiseptic at successive dilutions (0.12-250 g/ml) in MHB was added to PBS-rinsed wells (Tab. 2). A planktonic culture of the same strain served as a control. The reduction of TTC in viable cells to purple formazan was assessed visually after 24 h incubation with TTC.

RESULTS

Most of the 16 strains (S. aureus, S. epidermidis, E. coli, Enterobacter) isolated from orthopaedic implants obtained from patients were capable of forming a biofilm following 24 hour incubation and formed moderately or highly developed biofilm structures in either both or one sample.

Biofilm formation was visualised macroscopically using Richards' method and photographs obtained with a scanning electron microscope (Fig. 1, 2, 3).



Ryc. 1. Struktura biofilmu w mikroskopie elektronowym na martwaku kostnym – pacjent z objawami martwicy kości (Enterobacter sp.)

Fig. 1. A biofilm structure observed in electron microscopy on a bone sequester obtained from a patient with bone necrosis (Enterobacter sp.)

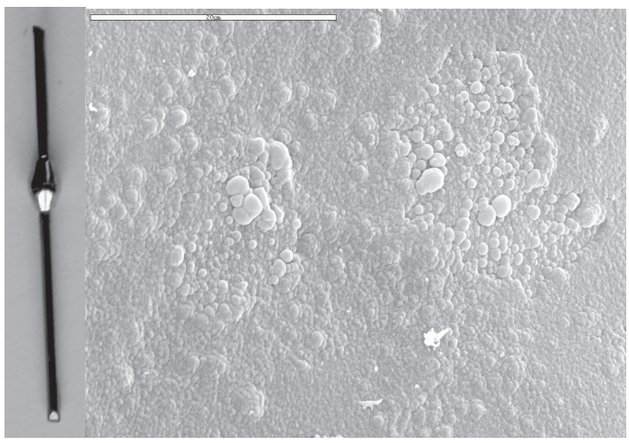
calosc.qxp 2007-09-19 09:29 Page 106

Badane szczepy po utworzeniu struktury biofilmu wykazywały oporność na gentamycynę i dichlorowodorek octenidyny w stosunku do hodowli planktonowej, gdzie wartości MIC klasyfikowały szczep jako wrażliwy (Ryc. 4).

Once the biofilm was formed, the strains demonstrated resistance to gentamicin and octenidine hydrochloride compared to the planktonic culture, with MIC in the latter indicating that the strain was sensitive to the drugs (Fig. 4).

Fig. 2. Struktura biofilmu w mikroskopie elektronowym na metalowej śrubie – pacjent z klinicznymi objawami zakażenia, metoda Richardsa dodatnia (E. coli)

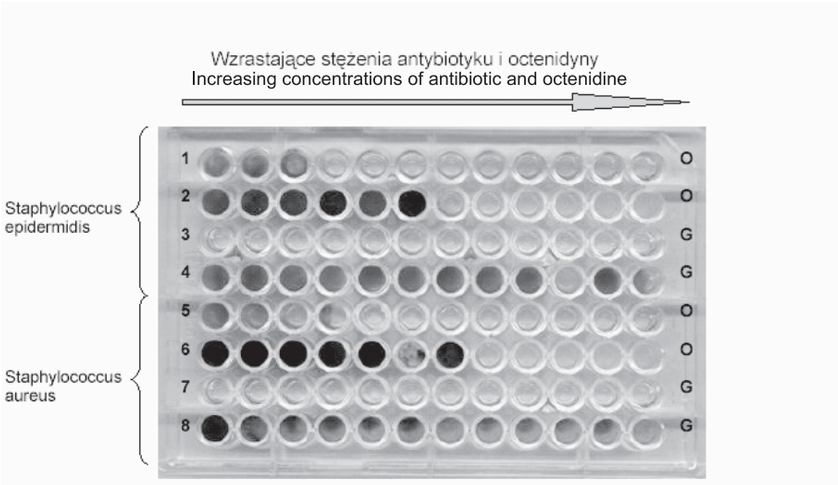
Fig. 2. A biofilm structure observed in electron microscopy on a steel screw obtained from a patient with a clinical infection, Richard's positive (E. coli)



Ryc. 3. Struktura biofilmu w mikroskopie elektronowym na metalowej części aparatu Ilizarowa (S. aureus) – pacjent z klinicznymi objawami zakażenia, metoda Richardsa ujemna.

Fig. 3. A biofilm structure observed in electron microscopy on a steel component of an Ilizarov device obtained from a patient with a clinical infection, Richard's negative (S. aureus)

calosc.qxp 2007-09-19 09:29 Page 107



Ryc. 4. Przykładowy odczyt wartości MIC badanych szczepów Staphylococcus epidermidis i Staphylococcus aureus w biofilmie tworzonym na płytkach polistyrenowych w stosunku do hodowli planktonowej.
Fig. 4. An example MIC value reading for Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus in a biofilm formed on polystyrene plates compared with the planktonic culture

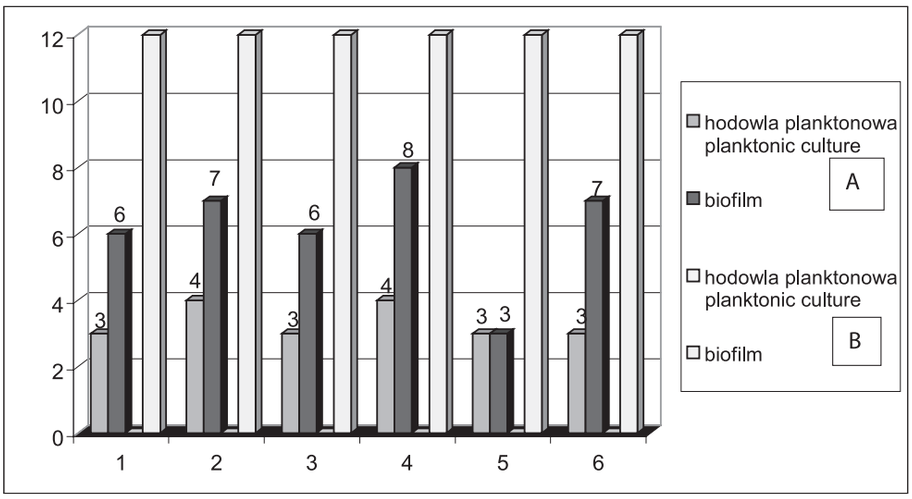
Tab. 3. Wartości MIC dla gentamycyny w hodowli planktonowej i biofilmie z uwzględnieniem kategorii wrażliwości, dla sześciu z wyizolowanych szczepów
Tab. 3. The MIC values of gentamicin in planktonic culture and biofilm with drug resistance categories for six of the isolated strains

	Gentamycyna / Gentamicin					
Szczep strain	1	2	3	4	5	6
MIC[µg/ml] Hodowla planktonowa Planktonic culture	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12	<0.12
Kategoria Category	S	S	S	S	S	S
MIC[µg/ml] Biofilm	250	250	250	250	250	250
Kategoria Category	R	R	R	R	R	R

Tab. 4. Wartości stężeń hamujących dla dichlorowodorku octenidyny w hodowli planktonowej i biofilmie, dla sześciu z wyizolowanych szczepów
Tab. 4. The values of inhibitory concentration in the planktonic culture and biofilm for six of the isolated strains

	Dichlorowodorek octenidyny Octenidine hydrochloride					
Szczep Strain	1	2	3	4	5	6
Stężenie hamujące w hodowli planktonicznej Inhibitory concentration, planktonic culture [µg/ml]	0.48	0.97	0.48	0.97	0.48	0.48
Stężenie hamujące w biofilmie Inhibitory concentration, biofilm [µg/ml]	3.9	7.8	3.9	15.6	0.48	7.8

calosc.qxp 2007-09-19 09:29 Page 108



Ryc. 5. Przeżywalność bakterii planktonicznych i w biofilmie w zależności od użytego antybiotyku i antyseptyku (wartości MIC). A – dichlorowodorek octenidyny, B – gentamycyna

Fig. 5 Survival of bacteria in the planktonic culture and the biofilm by antibiotic and antiseptic used (MIC). A – octenidine hydrochloride, B – gentamicin

Wartości MIC w biofilmie dla gentamycyny zazwyczaj przekraczały wartości MIC w hodowli planktonowej o kilka stopni logarytmicznych, co oznaczało w interpretacji wrażliwości zmianę kategorii ze szczepu wrażliwego na szczep oporny (Tab. 3, 4, Ryc. 5).

Badane szczepy po utworzeniu struktury biofilmu wykazywały większą wrażliwość na dichlorowodorek octenidyny w porównaniu z gentamycyną.

The biofilm MIC for gentamicin was usually higher than the plankton culture MIC by several logarithmic orders, which was interpreted as a categorial change from a sensitive to a resistant strain (Tab. 3, 4, Fig. 5).

Once the biofilm was formed, the strains were more sensitive to octenidine hydrochloride than to gentamicin.

DYSKUSJA

Zakażenia po zabiegach ortopedycznych nie są częste, lecz ich następstwa bywają dotkliwe dla pacjenta i kosztowne. Z doniesień różnych autorów wynika, że są one najczęściej wynikiem kontaminacji biomateriału w momencie jego implantacji lub są rezultatem przejściowej bakteriemii [1]. Wielodyscyplinarne badania pozwoliły na określenie adhezji jako jednego z mechanizmów umożliwiającego zakażenie po wszczepieniu implantu do organizmu ludzkiego [7]. Jak wynika z wielu doniesień cały czas trwają prace nad odwracalnością adhezji poprzez modyfikację składu chemicznego powierzchni wszczepów, a także właściwe stosowanie środków antyseptycznych [3, 4, 8]. Konsekwencją przylegania nieswoistego jest adhezja swoista i ścisłe przyleganie bakterii do powierzchni w postaci cienkiej struktury złożonej z komórek bakterii połączonych zewnątrzkomórkowym śluzem nazywanej biofilmem. Warunkiem zapobiegania zakażeniom w ortopedii i traumatologii narządu ruchu związanych z powstawaniem biofilmu na implantach wiąże się ściśle z zastosowaniem okołooperacyjnej profilaktyki antybiotykowej, właściwych technik chirurgicznych, a także właściwym przygotowaniem antyseptycznym pacjenta do zabiegu. Wielokierunkowym działaniem w zmniejszaniu ryzyka zakażenia po operacjach or-

DISCUSSION

Infections following orthopaedic surgery are not common, but their sequelae can be troublesome and costly to treat. Various authors have indicated that the infections are usually due to contamination of the biomaterial during implantation or a transient bacteraemia [1]. Multidisciplinary studies have revealed the role of adhesion as a mechanism responsible of infection following implantation of a device [7]. Numerous papers report on on-going studies of the reversibility of adhesion through modification of the chemical composition of implant surface or appropriate use of antiseptic agents [3,4,8]. Non-specific adhesion gives rise to specific adhesion and close adherence of bacteria to the surface in the form of a thin structure made up of bacterial cells bonded by extracellular mucus referred to as a biofilm. The prevention of infections in orthopaedics and musculoskeletal traumatology associated with the formation of a biofilm on implants relies heavily on perioperative antibiotic prophylaxis, the choice of appropriate surgical technique and appropriate pre-surgery antiseptic procedures. Perioperative antibiotic prophylaxis is a multifocal modality serving to reduce the risk of infection following surgery in orthopaedics [7,9]. Current standards of perioperative care in Poland recommended by the national

calosc.qxp 2007-09-19 09:29 Page 109

topedycznych jest stosowanie okołooperacyjnej profilaktyki antybiotykowej [7,9]. Obecnie w Polsce w standardzie okołooperacyjnym stosuje się zgodnie z zaleceniami konsultanta krajowego cefazolinę w dniu operacji przed zabiegiem bolus 2g, a następnie przez 2-3 dni 3x1,0 iv. Natomiast wybór przez autorów pracy gentamycyny jako atybiotyku wynikał z jej dostępności oraz faktu częstego stosowania miejscowego przy zabiegach ortopedycznych.

Przy wyborze dichlorowodorku octenidyny kierowano się jego szerokim spektrum działania, przede wszystkim na bakterie produkujące śluz, a także brakiem właściwości drażniących skórę i błony śluzowe, bezbarwnością preparatu, brakiem niepożądanych działań toksycznych i szybkim działaniem, potwierdzonym w doniesieniach innych autorów [10].

Pomimo małej liczby doniesień dotyczących badań in vitro nad powstawaniem i redukcją biofilmu na wszczepach ortopedycznych wyniki uzyskane przez autorów nawiązują do badań prowadzonych przez grupę A. Trampuza w Bazylei [8]. Szczególnie przydatne dla klinicysty jest otrzymanie z laboratorium wartości minimalnego stężenia hamującego antybiotyku i antyseptyku (MIC) określającego dawkę terapeutyczną podawaną pacjentowi. Doniesienia innych autorów potwierdzają brak penetracji antybiotyku przez strukturę biofilmu [9], natomiast dobra redukcje tej struktury przez dichlorowodorek octenidyny [10].

Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy wymagaj kontynuacji i potwierdzenia na większym materiale chorych.

consultant comprise a 2 g cephazolin bolus on operative day before surgery followed by 1.0 g intravenous cephazolin three times daily for 2-3 days. Our choice of gentamicin for use in prophylaxis was determined by availability of the drug and its popularity as a topical agent during orthopaedic surgery.

The use of octenidine hydrochloride was based on its broad spectrum of activity, particularly against mucus-producing bacteria, and lack of skin or mucosal irritation, colourless appearance, lack of toxicity and a rapid onset of action confirmed in other studies [10].

Despite a dearth of in vitro studies on the formation and reduction of biofilms on orthopaedic implants, the results of the present study are related to those obtained by a team headed by A. Trampuz in Basle [8]. Clinicians particularly benefit from laboratory data on the minimal inhibitory concentration (MIC) of an antibiotic or antiseptic, which determines the therapeutic dose administered to the patient. The reports of other authors confirm that the antibiotic investigated in this study does not penetrate the biofilm [9], while good biofilm reduction can be obtained using octenidine hydrochloride [10].

The results of the present study need to be further investigated and confirmed against a larger patient population.

WNIOSKI

1. Przeprowadzone badania pozwalają na stwierdzenie, że zastosowanie dichlorowodorku octenidyny w zakażeniach związanych z tworzeniem struktury biofilmu na implantach ortopedycznych jest skuteczniejsze niż zastosowanie gentamycyny.
2. Badane szczepy po utworzeniu struktury biofilmu wykazywały oporność na gentamycynę w stosunku do hodowli planktonowej, gdzie wartości MIC klasyfikowały szczep jako wrażliwy. Wartości MIC w biofilmie zazwyczaj przekraczały wartości MIC w hodowli planktonowej o kilka stopni logarytmicznych
3. Otrzymane wyniki stanowią podstawę do kontynuacji prac związanych z oceną powstawania biofilmu na powierzchni implantów stosowanych w ortopedii i traumatologii narządu ruchu, zwłaszcza pod kątem stosowania profilaktyki zakażeń w okresach śród- i okołooperacyjnych.

Praca realizowana w ramach Grantu KBN 2PO5D134 26

CONCLUSIONS

1. The results of the study indicate that octenidine hydrochloride is more effective than gentamicin in the treatment of infections associated with the formation of a biofilm on orthopaedic implants.
2. Once the biofilm was formed, the strains demonstrated resistance to gentamicin compared to the planktonic culture, with MIC in the latter indicating that the strain was sensitive to the drugs. The biofilm MIC values were usually higher than the plankton culture MIC values by several logarithmic orders.
3. The results of the study provide a basis for future investigations of the formation of a biofilm on surfaces of implants used in orthopaedics and musculoskeletal traumatology, especially with regard to intra- and perioperative prophylaxis of infections.

This study was funded from Committee for Scientific Research Grant 2PO5D134 26

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

1. Allen D M. Orthopedic implant infections: current management strategies. Ann Acad Med Singapore 1997; 26: 687-690.
2. Hermann M, Baudaux D, Pittet R. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates from foreign material. J Inf Dis 1998; 158: 693-701.
3. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vannitanakom N, Mack D, Götz F. Molecularv basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. Mol Microbiol 1996; 20: 1083-1091.
5. Mack D. Molecular mechanisms of Staphylococcus epidermidis biofilm formation. An YH, Friedman RJ,editors. Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications.New York; Humann Press; 2000. str. 1-27. Hosp Infect 1999; 43; 113- 125.

calosc.qxp 2007-09-19 09:29 Page 110

6. Boland T, Latour RA, Sutzenberger FJ. Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. An YH, Friedman RJ,editors. Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications.New York; Humann Press; 2000. str. 29- 41.
7. Carlsson, E F, Hanssen A D, Duffy M. Risk factors for prostethetic joint infection: case-control study. Clin Infect Dis 1998; 27: 1247-1254
8. Trampuz A, Osmon DR, Hanssen AD, Steckelberg J M. Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. Clin Orthop 2003; 6: 69-88
9. Boxma H, Broekhuizen T, Patka P, Oosting H. Randomised controlled trial of single-dose antibiotic prophylaxis in surgical treatment of closed fractures: the Dutch Trauma Trial. The Lancet 1996; 347: 1133-1137
10. Dettenkofer M, Jonas D, Wiechmann C, Rossner R, Frank U, Zentner J, Daschner F D. Effect of Skin Disinfection with Octenidine Dihydrochloride on Insertion Site Colonization of Intravascular Catheters. Infection 2002; 30: 282-285