

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**Estudio in vivo de la eficacia del cemento óseo con rifampicina
contenida en microcápsulas de alginato en el tratamiento
de la infección protésica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Irene Isabel López Torres

Directores

**Pablo Sanz Ruíz
Javier Vaquero Martín**

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación en Ciencias

Médico-Quirúrgicas

Departamento de Cirugía



**ESTUDIO IN VIVO DE LA EFICACIA DEL CEMENTO ÓSEO
CON RIFAMPICINA CONTENIDA EN MICROCÁPSULAS DE
ALGINATO EN EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN
PROTÉSICA**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por

IRENE ISABEL LÓPEZ TORRES

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación en Ciencias

Médico-Quirúrgicas

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

Estudio in vivo de la eficacia del cemento óseo con rifampicina contenida en microcápsulas de alginato en el tratamiento de la infección protésica

Memoria para optar al grado de doctor presentada por

Irene Isabel López Torres

Bajo la dirección de los doctores

**Pablo Sanz Ruíz
Javier Vaquero Martín**

Madrid, 2018

A las quince

AGRADECIMIENTOS

A los doctores D. Javier Vaquero Martín y D. Pablo Sanz Ruíz, cuya tutela, consejos e infinita paciencia han sido imprescindibles para el desarrollo de este trabajo.

Al Departamento de Farmacia, Galénica y Tecnología Alimentaria de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, en especial a Dña. Ana Isabel Fraguas Sánchez, por su sincero interés y ayuda desinteresada.

Al doctor D. Federico Navarro del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y a la doctora Dña. Rafaela Raposo de la Escuela de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid por su colaboración y tiempo en la realización e interpretación de los análisis microbiológicos y hematológicos.

A todo el personal del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por vuestra dedicación y cuidado, en especial a Pilar, Susana y Alfonso, por su ayuda constante e interés por el bienestar de los animales.

Al todos los integrantes del Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este trabajo, en especial a la doctora Dña. Esther Carbó Laso por sus valiosos consejos y su tiempo. A José Manuel Espinosa y Rodrigo Priego por su ayuda desinteresada.

A mi familia, por su constante esfuerzo y ayuda, por animarme durante todo el proyecto y por brindarme todas las oportunidades para aprender. Sin vosotros nada de esto habría sido posible.

El presente trabajo ha recibido financiación para su realización procedente de la Fundación Mutual Médica y por el Programa de Financiación de Proyectos de Investigación Santander-UCM 2016.

*“Cuando emprendas tu viaje a Ítaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias...”*

Constantino Kavafis (1863-1933)

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	17
2.1. Infección periprotésica.....	19
2.1.1. Incidencia de la infección periprotésica.....	21
2.1.2. Patogénesis.....	23
2.1.3. Tratamiento de la infección periprotésica.....	28
2.1.3.1. Tratamiento quirúrgico de la PJI.....	29
2.1.3.2. Tratamiento antibiótico de la PJI.....	36
2.2. Cementos óseos.....	41
2.2.1. Polimetilmetacrilato: propiedades y polimerización.....	41
2.2.2. Aplicación clínica de los cementos óseos.....	43
2.2.3. Cemento óseo como vehículo para la liberación de antibióticos....	46
2.2.4. Problemas de la adición de rifampicina al cemento óseo.....	52
2.3. Microcápsulas para la liberación prolongada de antibióticos.....	55
2.3.1. Microcápsulas de antibióticos para profilaxis y tratamiento de infecciones en traumatología.....	58
2.3.2. Microcápsulas de rifampicina elaboradas con alginato para el tratamiento de la infección periprotésica.....	61
2.3.2.1. Síntesis y caracterización de microcápsulas con rifampicina.....	61
2.3.2.2. Propiedades mecánicas y antimicrobianas.....	63
3. Hipótesis y objetivos.....	65
4. Material y método.....	69
4.1. Diseño del protocolo experimental y autorización del estudio por la	

autoridad competente.....	71
4.2. Diseño 3D de mesetas tibiales de conejo y estudio morfológico de la extremidad.....	77
4.2.1. Diseño e impresión 3D de las mesetas tibiales de conejo.....	79
4.2.2. Estudio anatómico y biomecánico de la rodilla del conejo.....	81
4.3. Preparación de microcápsulas de rifampicina.....	84
4.3.1. Determinación del contenido de rifampicina en las microcápsulas.....	86
4.3.2. Visualización microscópica de las microcápsulas.....	89
4.4. Evaluación in vivo de la eficacia del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina.....	93
4.4.1. Estabulación y aclimatación.....	95
4.4.2. Determinación de los valores basales.....	95
4.4.3. Esterilización del material.....	96
4.4.4. Preparación del inóculo.....	96
4.4.5. Protocolo anestésico y analgésico.....	96
4.4.6. Sustitución de la meseta tibial e inoculación.....	99
4.4.7. Primer tiempo de recambio.....	104
4.4.8. Criterios diagnósticos de infección.....	107
4.4.9. Control evolutivo: determinación de la toxicidad sistémica de la rifampicina y definición de la curva de liberación intra- articular.....	108
4.4.10. Eutanasia y toma de muestras finales.....	109
4.5. Metodología analítica.....	112
4.5.1. Análisis bioquímico y hematológico.....	118

4.5.2.	Análisis microbiológico.....	119
4.5.3.	Cuantificación de rifampicina en muestras biológicas.....	121
4.6.	Análisis estadístico.....	127
4.6.1.	Determinación del tamaño muestral.....	127
4.6.2.	Análisis estadístico.....	127
5.	Resultados.....	129
5.1.	Diseño 3D de las mesetas tibiales de conejo.....	131
5.2.	Evaluación en el modelo animal de la eficacia del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina.....	135
5.2.1.	Determinación de la homogeneidad de los grupos de estudio....	135
5.2.2.	Evolución clínica.....	136
5.2.3.	Diagnóstico de infección.....	138
5.2.4.	Evaluación de la eficacia antimicrobiana del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina.....	145
5.2.4.1.	Determinación de la liberación intra-articular de rifampicina.....	145
5.2.4.2.	Curso evolutivo de los parámetros hematológicos definitorios de infección.....	146
5.2.4.3.	Diagnóstico de infección tras 4 semanas de la colocación del espaciador de cemento.....	150
5.2.5.	Determinación de la toxicidad sistémica de la rifampicina contenida en cemento óseo.....	156
6.	Discusión.....	161
6.1.	Justificación del modelo animal de infección periprotésica.....	166
6.1.1.	Selección del modelo animal.....	166

6.1.2.	Diseño del implante.....	169
6.1.3.	Determinación de las características del inóculo bacteriano....	172
6.1.4.	Determinación cuantitativa de la presencia de infección: análisis bioquímico, hematológico y microbiológico de la PJI.....	176
6.1.5.	Justificación de la realización de un recambio en dos tiempos frente a un recambio en un tiempo.....	182
6.2.	Evaluación in vivo de la eficacia del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina en el tratamiento de la infección periprotésica.....	184
6.2.1.	Análisis del perfil de liberación intra-articular de rifampicina.....	184
6.2.2.	Determinación de la eficacia antimicrobiana del cemento con microcápsulas de rifampicina.....	188
6.2.3.	Análisis de la toxicidad de la rifampicina.....	192
6.3.	Relevancia clínica del cemento con microcápsulas de rifampicina.....	199
6.4.	Limitaciones del estudio.....	206
6.5.	Perspectivas futuras.....	208
7.	Conclusiones.....	213
8.	Bibliografía.....	217
9.	Anexo.....	249

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Infección de prótesis total de rodilla con fístula cutánea y exposición del material protésico.....	20
Figura 2: Antecedentes y número previsto de infecciones de artroplastias totales de cadera (THA), rodilla (TKA) y combinación de ambas (Total THA + TKA) en los Estados Unidos.....	21
Figura 3: Microorganismos causantes de la infección periprotésica.....	24
Figura 4: Imagen de microscopía electrónica del biofilm formado por <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> sobre un implante metálico.....	25
Figura 5: Algoritmo terapéutico PJI.....	34
Figura 6: Espaciadores con antibiótico “hechos a mano”. A) cadera con alma de clavo rush, B) cadera con alma de clavo Gamma, C) codo con una aguja de Kirschner para fijar el componente vertical y horizontal y D) rodilla.....	45
Figura 7: Curva bifásica de liberación in vitro de ciprofloxacino, gatifloxacino y levofloxacino.....	47
Figura 8: Perfil de liberación de rifampicina.....	52
Figura 9: Estructuras tipo microcápsula (izquierda) y microesfera (derecha).....	55
Figura 10: Representación de los niveles plasmáticos de un fármaco administrado en dosis múltiples y en micropartículas de liberación prolongada.....	56
Figura 11: Microencapsulación por gelificación iónica de alginato.....	62
Figura 12: Halo de inhibición de un disco de cemento con rifampicina contenida en microcápsulas de alginato.....	64
Figura 13: Procedimiento seguido para la toma de muestras sanguíneas de la vena marginal de la oreja del conejo NZW inmovilizado en un cepo.....	254

Figura 14: Aprobación del protocolo experimental por la Comunidad Autónoma de Madrid.....	251
Figura 15: Aprobación del protocolo experimental por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.....	252
Figura 16: Realización de la TC de la pata de conejo.....	78
Figura 17: Proceso de reconstrucción de la meseta tibial del conejo a partir de la imagen DICOM de la TC (izquierda), definición de las ROIs (centro) en Horos® y generación de la estructura 3D (derecha) en Autodesk® Meshmixer™.....	81
Figura 18: Rodilla derecha de conejo New Zeland White en flexión. Artrotomía parapatelar medial.....	83
Figura 19: Rodilla derecha de conejo New Zeland White en extension. Artrotomía parapatelar medial.....	83
Figura 20: Curva de calibrado de la Rifampicina en fase móvil obtenida con las condiciones analíticas recogidas en la tabla 16.....	88
Figura 21: A) Aspecto de las microcápsulas de rifampicina al microscopio electrónico (x100). B) Aspecto de superficie de las microcápsulas de rifampicina al microscopio electrónico (x1000).....	90
Figura 22: Presencia de cristales de cloruro sódico y de cloruro cálcico en la superficie de las microcápsulas de rifampicina (A: x4000; B: x800).....	91
Figura 23: Aspecto de las partículas de PMMA al microscopio electrónico (x200).....	91
Figura 24: Mezcla de fracción polvo del Palacos® R+G con microcápsulas de rifampicina.....	255
Figura 25: Imagen de la superficie del cemento con microcápsulas de rifampicina ya fraguado. Las inclusiones rojizas corresponden a la rifampicina.....	92

Figura 26: A) Sistema de infusión de suero en vena marginal de la oreja. B) Tubo de Guedel fabricado con protector de catéter.....	97
Figura 27: A) Cateterización de vena marginal de la oreja para mantenimiento anestésico en conejo NZW, B) Inducción anestésica por vía intramuscular, C) Administración de analgesia por vía subcutánea interescapular.....	98
Figura 28: Exposición de la articulación de la rodilla.....	99
Figura 29: A) Resección de metáfisis tibial proximal; B) Preparación de canal tibial para albergar el tetón del inserto.....	100
Figura 30: A) Mezclado de fracción líquida y polvo de Palacos® R sin antibiótico. B) Cementación de metáfisis tibial proximal.....	101
Figura 31: Implante definitivo: visión anterior de la meseta tibial de acero inoxidable cementada.....	101
Figura 32: A) Visión lateral con articulación reducida. B) Cierre de la artrotomía con sutura continua de Vicryl.....	102
Figura 33: A) Homogenización de 1mL de la solución de <i>S. aureus</i> . B) Inoculación intra-articular y C) Cierre cutáneo con seda.....	103
Figura 34: Vendaje.....	103
Figura 35: Aspecto de la rodilla tras una semana de la inoculación intra-articular de <i>S. aureus</i>	104
Figura 36: Muestras para análisis microbiológico. De izquierda a derecha: tubo Eppendorf con muestra de partes blandas, tubo Eppendorf con muestra de hueso metafisario y vial con inserto metálico y restos de cemento.....	105
Figura 37: A) Mezcla de cemento con microcápsulas de rifampicina. B) Espaciador de cemento con microcápsulas de rifampicina.....	106
Figura 38: Drenaje intra-articular. A) Implantación intraoperatoria; B) Aspecto	

tras 24 horas de la cirugía.....	107
Figura 39: A) Aspecto de la rodilla con el espaciador de cemento con rifampicina tras 4 semanas de su implantación (R1). B) Muestras para análisis microbiológico, de izquierda a derecha: espaciador de cemento, hueso y partes blandas.....	110
Figura 40: Cronograma de los procedimientos realizados durante el estudio.....	111
Figura 41: Cronograma seguido para la toma de muestras.....	117
Figura 42: Muestras sanguíneas de conejo control. A) El tubo de la izquierda corresponde al análisis bioquímico tras la centrifugación y el de la derecha al análisis hematológico. B) Muestras para análisis bioquímico tras centrifugado.....	119
Figura 43: Demostración de la formación de biofilm mediante tinción de cristal violeta tras 1 semana de la inoculación con <i>S. aureus</i>	121
Figura 44: Cromatogramas obtenidos al analizar por HPLC muestras de rifampicina (A), gentamicina (B) y rifampicina+gentamicina (C) en líquido sinovial simulado.....	124
Figura 45: Relación entre la concentración de rifampicina y el área del pico del cromatograma utilizada para la determinación del límite de detección (L.D) y el límite de cuantificación (L.C).....	126
Figura 46: Imágenes de la TC realizada a la rodilla de conejo. A) Corte coronal, B) corte axial.....	132
Figura 47: Primer diseño del inserto tibial A) Visión anteroposterior; B) Visión lateral; C) Rotura del material tras impresión 3D con poliláctico.....	133
Figura 48: Segundo diseño de inserto tibial. A) Visión anteroposterior; B) visión lateral.....	133
Figura 49: Diseño del inserto definitivo A) Visión anteroposterior; B) Visión	

lateral; C) Impresión en poliláctico; D) Impresión en acero inoxidable.....	134
Figura 50: Evolución de la media del peso (kg) en los dos grupos de estudio.....	137
Figura 51: Evolución de la media de temperatura (°C) en ambos grupos de estudio.....	137
Figura 52: CFUs aisladas en cada uno de los animales tras el primer tiempo de recambio protésico en partes blandas, hueso y meseta tibial.....	141
Figura 53: A) Fístula cutánea en rodilla infectada con salida de pus (R7). B) Ocupación articular por pus, exposición tras apertura cutánea antes de hacer la artrotomía (C2).....	143
Figura 54: Representación gráfica de la concentración de rifampicina (µg/mL) intra-articular.....	146
Figura 55: Evolución de la VSG en la primera hora (mm), leucocitos ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$), linfocitos (%) y número de plaquetas ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$) a lo largo del estudio.....	148
Figura 56: CFUs aisladas de partes blandas, hueso y espaciador al final del estudio.....	153
Figura 57: Evolución de la creatinina (mg/dL), bilirrubina total (mg/dL), AST (UI/L) y ALT (UI/L) en ambos grupos a lo largo del estudio.....	158
Figura 58: Tinción de hematoxilina-eosina del líquido articular de los conejos C5, R6, R7 y R8.....	160

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Criterios diagnósticos de PJI.....	19
Tabla 2: Incidencia de PJI en distintas localizaciones.....	22
Tabla 3: Tipos de PJI basados en la clasificación de Tsukayama.....	28
Tabla 4: Características farmacocinéticas y farmacodinámicas de la rifampicina..	39
Tabla 5: Características del antibiótico recomendadas para considerarlo adecuado para su adición al cemento.....	46
Tabla 6: Combinaciones sinérgicas de antibióticos y su efecto.....	48
Tabla 7: Antibióticos disponibles para ser añadidos al cemento óseo.....	50
Tabla 8: Antibióticos microencapsulados para el tratamiento de infecciones locales.....	58
Tabla 9: Concentración de rifampicina liberada de las microcápsulas a las 6, 24 y 48 horas y a la semana.....	63
Tabla 10: Características mecánicas del cemento con microcápsulas de rifampicina comparado con los estándares ISO 5833:2002 y con cemento con rifampicina sin microencapsular.....	64
Tabla 11: Escala de valoración de la severidad del dolor. La puntuación > 9 se considera indicación para la eutanasia anticipada del animal.....	76
Tabla 12: Hoja de recogida de datos para la evaluación de la severidad del dolor..	243
Tabla 13: Materiales empleados para el diseño de mesetas tibiales de conejo y estudio morfológico de la extremidad.....	77
Tabla 14: Parámetros de programación TC.....	79
Tabla 15: Materiales empleados para la preparación y caracterización de las microcápsulas de rifampicina.....	85

Tabla 16: Condiciones del análisis por HPLC.....	87
Tabla 17: Cuantificación de la rifampicina contenida en las microcápsulas.....	88
Tabla 18: Materiales empleados para la evaluación in vivo de la eficacia del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina.....	94
Tabla 19: Anestésicos y analgésicos utilizados.....	98
Tabla 20: Criterios diagnósticos de infección en el modelo animal.....	108
Tabla 21: Monitorización de la hepatotoxicidad secundaria a rifampicina.....	109
Tabla 22: Materiales empleados para la determinación hematológica, bioquímica y microbiológica.....	113
Tabla 23: Composición del líquido sinovial simulado.....	122
Tabla 24: Valores basales y nivel de significación.....	135
Tabla 25: Valores medios y nivel de significación del peso (kg) a lo largo del ensayo en ambos grupos de estudio.....	138
Tabla 26: Valores medios y nivel de significación de la temperatura (°C) a lo largo del ensayo en ambos grupos de estudio.....	138
Tabla 27: Peso (kg) registrado en cada uno de los animales a lo largo del estudio.....	256
Tabla 28: Temperatura (°C) registrada en cada uno de los animales a lo largo del estudio.....	257
Tabla 29: Modificación de parámetros hematológicos y bioquímicos 1 semana tras la inoculación de S. aureus.....	139
Tabla 30: Análisis de la homogeneidad de los grupos de experimentación tras la infección.....	139
Tabla 31: Resultados microbiológicos (CFU) una semana después de la infección.....	140

Tabla 32: Resultados microbiológicos (número de CFU) de cada uno de los animales una semana después de la inoculación de <i>S. aureus</i>	258
Tabla 33: Aspecto macroscópico de la articulación tras 1 semana de la inoculación de <i>S. aureus</i>	143
Tabla 34: Parámetros hematológicos, microbiológicos y clínicos definitorios de infección en cada uno de los animales 1 semana tras la inoculación.....	144
Tabla 35: Resultados de la cuantificación de rifampicina en líquido intraarticular.....	145
Tabla 36: Evolución de los parámetros inflamatorios en cada uno de los grupos a lo largo del estudio.....	149
Tabla 37: Parámetros hematológicos basales y a la semana de la inoculación de <i>S. aureus</i> de cada uno de los animales.....	259
Tabla 38: Parámetros hematológicos de cada uno de los animales a los 4 días y 1 semana de la implantación del espaciador de cemento.....	260
Tabla 39: Parámetros hematológicos de cada uno de los animales a las 2 y 3 semanas de la colocación del espaciador de cemento.....	261
Tabla 40: Parámetros hematológicos definitorios de infección en cada uno de los animales al final del estudio.....	262
Tabla 41: Parámetros hematológicos definitorios de infección en cada uno de los grupos de experimentación al final del estudio.....	150
Tabla 42: Modificación de los valores hematológicos entre el día 0 y el final del estudio.....	151
Tabla 43: Análisis antes-después de los valores hematológicos entre el día 0 y el final del estudio en cada uno de los grupos experimentales.....	151
Tabla 44: Resultados microbiológicos (CFU) al final del estudio (4 semanas tras	

el primer tiempo de recambio).....	152
Tabla 45: Resultados microbiológicos (número de CFU) de cada uno de los animales al final del estudio.....	263
Tabla 46: Aspecto macroscópico de la articulación tras 4 semanas de la implantación del espaciador de cemento.....	154
Tabla 47: Parámetros hematológicos, microbiológicos y clínicos definitorios de infección en cada uno de los animales al final del estudio.....	155
Tabla 48: Valores bioquímicos 1 semana después de la implantación del espaciador.....	159
Tabla 49: Valores bioquímicos 2 semanas después de la implantación del espaciador.....	159
Tabla 50: Valores bioquímicos 4 semanas después de la implantación del espaciador.....	159
Tabla 51: Evolución de la creatinina (mg/dL), bilirrubina total (mg/dL), AST (UI/L) y ALT (UI/L) en cada uno de los animales en el día 0 y 1 semana después del primer tiempo de recambio protésico.....	264
Tabla 52: Evolución de la creatinina (mg/dL), bilirrubina total (mg/dL), AST (UI/L) y ALT (UI/L) en cada uno de los animales a las 2 y 4 semanas del primer tiempo de recambio.....	265
Tabla 53: Revisión bibliográfica de modelos de PJI en conejo NZW.....	175
Tabla 54: Protocolos diagnósticos de PJI en la práctica clínica habitual y en el modelo animal.....	178

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAOS: American Academy of Orthopaedic Surgeons

ALT (GPT): Alanina-aminotransferasa

AST (GOT): Aspartato-aminotransferasa

AUC: Área bajo la curva

Brr: Bilirrubina

CC: Concentración

CFU: Unidades formadoras de colonias

Cmax: Concentración máxima plasmática

CME: Concentración mínima eficaz

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMI: Concentración mínima inhibitoria

Cr: Creatinina

CuO: Monóxido de cobre

DE/SD: Desviación estándar

DICOM: Digital Imaging and Communication in Medicine

DmpT: N,N-dimetil-p-toluidina

DNA: Ácido desoxiribonucleico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FDK: Feldkamp-Davis-Kress

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

IDSA: Infection Disease Society of America

ISO/ASTM: International Organization for Standardization/American Society for Testing and Materials

MgO: Monóxido de magnesio

MMA: Monómero de metilmetacrilato

MRSA: Estafilococo aureus meticilin-resistente

MSIS: Musculoskeletal Infection Society

MSSA: Estafilococo aureus meticilin-sensible

NZW: New Zeland White

OR: Odds ratio

PBS: Tampón fosfato salino

PCL: policaprolactona

PCR: Proteína C reactiva

PET: Tomografía por emisión de positrones

PGA: Ácido poliglicólico

PHVB: Poli 3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato

PJI: Infección periprotésica

PJI: Infección periprotésica

PLA: Ácido poliláctico

PLAGA: copolímero de ácido poliglicólico

PLGA: Ácido poli láctico co-glicólico

PMMA: Polimetilmetacrilato

RNA: Ácido ribonucleido

ROI: Region of interest

RPMI: Roswell Park memorial Institute

SEM: Microscopio electrónico de barrido

SiO₂: Dióxido de silicio

SVCs: Small colony variants

TC: Tomografía axial computerizada

TiO₂: Dióxido de titanio

TTA: Tuberosidad tibial anterior

VSG: Velocidad de sedimentación globular

X: Media

ZnO: Monóxido de zinc

1. RESUMEN

ESTUDIO IN VIVO DE LA EFICACIA DEL CEMENTO ÓSEO CON RIFAMPICINA CONTENIDA EN MICROCÁPSULAS DE ALGINATO EN EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN PROTÉSICA

Introducción

La infección periprotésica (PJI) es una complicación grave con incidencia creciente debido al aumento de la esperanza de vida de la población y a un aumento de la demanda funcional del paciente joven. La incidencia de PJI en la actualidad es del 2-2,4% pero se estima un incremento de la misma hasta suponer un 47,5% en 2030, posicionando la PJI como primera causa de revisión.

Los principales agentes causales de la infección periprotésica son los estafilococos coagulasa negativos, suponiendo entre el 20-39% de los casos, seguidos por el *Staphylococcus aureus*, que supone entre el 13 y el 31% del total. Estos dos microorganismos al entrar en contacto con el material protésico son capaces de adherirse a él formando un biofilm, dando lugar a dos consecuencias inmediatas: aumenta la aparición de resistencias a antibióticos al actuar como barrera física para su penetración e inhibe la respuesta inmune del huésped. Por ello la presencia de un biofilm hace que las dosis efectivas de antibiótico se multipliquen de 200 a 1000 veces.

El recambio en dos tiempos está considerado como el gold standar para el tratamiento de la infección crónica tardía y se basa en la sustitución de la artroplastia por un espaciador de cemento con antibióticos. Esta técnica permite alcanzar altas concentraciones intra-articulares de antibiótico minimizando sus efectos tóxicos a nivel sistémico. Este proceso debe acompañarse de un periodo prolongado de antibioterapia

sistémica y la rifampicina en combinación con quinolonas es el tratamiento de elección de las PJI de origen estafilocócico, que son las más frecuentes.

El principal problema de la rifampicina es que su adición al cemento óseo altera el proceso de fraguado dando lugar a un cemento de fraguado incompleto no apto para su utilización en la práctica clínica. En 2016, nuestro grupo de investigación diseñó un sistema de liberación controlada de rifampicina en forma de microcápsulas de alginato que demostró preservar las propiedades mecánicas del cemento óseo con un óptimo perfil de liberación de la rifampicina en los estudios in vitro.

Justificación y objetivos

La vehiculización de antibióticos en el cemento óseo permite su liberación local a nivel intra-articular alcanzando concentraciones elevadas minimizando la aparición de efectos tóxicos que serían inevitables de emplearse las mismas concentraciones administradas por vía sistémica. La rifampicina se considera la piedra angular del tratamiento de las infecciones periprotésicas debidas a estafilococos, habiendo demostrado actividad antibacteriana frente al biofilm, formas planctónicas e intracelulares. Dados los prometedores resultados in vitro de la liberación y eficacia del cemento con microcápsulas de rifampicina se decidió llevar a cabo la ratificación de estas propiedades in vivo. Con este fin se ha diseñado el presente estudio preclínico con animales que tiene los siguientes objetivos:

1. La definición de un modelo experimental de infección periprotésica
2. El diseño de implantes específicos de especie mediante impresión 3D
3. La consecución de la liberación de rifampicina intra-articular alcanzando niveles superiores a la CMI estafilocócica in vivo

4. La determinación mediante análisis microbiológicos de la superioridad del cemento con gentamicina y microcápsulas de rifampicina en el tratamiento de la infección periprotésica frente al cemento exclusivamente con gentamicina.
5. La demostración del adecuado perfil de seguridad in vivo de la rifampicina contenida en microcápsulas

Material y método

Para la realización de este estudio se emplearon 15 conejos New Zeland White hembra de 3kg, previa aprobación del protocolo experimental por la autoridad competente. En todos ellos se realizó la sustitución de metáfisis tibial proximal por un inserto de acero inoxidable diseñado mediante impresión 3D a partir de la reconstrucción de un TC realizado a la rodilla de un conejo procedente de otro estudio. Tras la implantación y cierre de la artrotomía se inoculó 1mL de 10^5 CFU de la cepa de *Staphylococcus aureus* meticilin-sensible ATCC® 29213™.

Una semana tras la inoculación se volvió a anestésiar a los animales para llevar a cabo el primer tiempo de recambio protésico, tomándose muestras intraoperatorias para verificar la presencia de infección y colocándose un espaciador de cemento. En este momento se dividieron los animales en dos grupos: grupo R (8 conejos) en el que se implantó un espaciador de cemento con gentamicina y un 12,5% de microcápsulas de rifampicina y el grupo C (7 conejos) en el que se empleó un espaciador con gentamicina de uso clínico habitual. Se tomaron muestras intra-articulares de los animales del grupo R a las 6, 24, 48 y 72 horas postoperatorias para definir la curva de liberación intra-articular de la rifampicina contenida en las microcápsulas. Dicha cuantificación se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Para la monitorización de la evolución de los parámetros inflamatorios definitorios de infección y de la toxicidad sistémica de la rifampicina se realizaron determinaciones analíticas, de peso y temperatura antes del inicio del estudio, durante el primer tiempo de recambio, a los 4 días del mismo y posteriormente de forma semanal hasta la finalización del estudio. La toxicidad sistémica se determinó en base a la elevación de las enzimas hepáticas, bilirrubina o de los marcadores de función renal. La evolución de los parámetros inflamatorios se definió en función de las variaciones en la VSG, recuento leucocitario, recuento plaquetario y porcentaje de linfocitos en sangre.

A las 4 semanas de la implantación del espaciador se sacrificó a los animales, realizándose posteriormente la toma de muestras finales para cultivo microbiológico.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software SPSS Statistics®, versión 22.0 para Mac (IBM, NY, USA) considerándose estadísticamente significativos valores de p menores a 0,05. La comparación entre variables cualitativas se realizó con el test χ^2 y los estudios comparativos antes-después con la prueba de la T para muestras apareadas. La comparación de variables cuantitativas normales con cualitativas dicotómicas se realizó con el test t de Student mientras que la comparación de variables cuantitativas no normales con cualitativas dicotómicas se llevó a cabo con el test U de Mann-Whitney.

Resultados

Todos los animales se recuperaron de las cirugías sin incidencias. Se consiguió carga positiva de la extremidad en todos los casos con el empleo de los implantes especie-específicos. La eficiencia de la inculación intra-articular de *S. aureus* fue del 93,3%, desarrollándose una PJI en 14 de los 15 animales.

La toma de muestras intra-articulares demostró la liberación de rifampicina desde el espaciador de cemento en concentraciones superiores a la CMI estafilocócica en todos los momentos de análisis.

Tras 4 semanas de la implantación del espaciador los cultivos microbiológicos demostraron un crecimiento de *S. aureus* significativamente menor en el grupo tratado con cemento con microcápsulas de rifampicina para las muestras obtenidas de partes blandas y hueso con $p=0,01$ y $0,031$ respectivamente. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el recuento microbiológico tras la sonicación del espaciador.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en los valores de AST, ALT, bilirrubina ni creatinina en ningún momento del estudio. Se identificó una elevación de la bilirrubina por encima de los valores normales en el grupo R que remitió de forma espontánea tras 2 semanas de la colocación del espaciador.

Discusión

Aunque son varios los trabajos de investigación en los que se desarrollan microcápsulas de antibióticos para incorporar a cemento óseos, evaluándose sus características mecánicas, eficacia y toxicidad in vitro, no existe en la bibliografía ningún modelo animal validado para la evaluación de estos sistemas in vivo. Por ello se ha diseñado un nuevo modelo in vivo para evaluar la eficacia de este cemento con microcápsulas de rifampicina reproduciendo fielmente la sistemática de un recambio en dos tiempos de la práctica clínica habitual. Este modelo preclínico ha demostrado ser adecuado para el estudio de la liberación intra-articular de la rifampicina contenida en las microcápsulas y su posible toxicidad sistémica.

Es evidente que el ritmo de síntesis de nuevos antibióticos se ha visto superado por la velocidad de aparición de microorganismos resistentes. Dado el amplio espectro de acción de la rifampicina sobre las diferentes formas de estafilococos el presente estudio abre nuevas posibilidades para el tratamiento de la PJI, al permitir su inclusión en el cemento óseo sin alterar las propiedades del mismo. Además, se ha demostrado la capacidad bactericida de dicho cemento con microcápsulas de rifampicina, consiguiéndose niveles intra-articulares por encima de la CMI estafilocócica y sin producir efectos secundarios sistémicos.

Conclusiones

1. Se ha diseñado un modelo experimental que permite reproducir de forma fiel el ambiente de la infección periprotésica obteniendo una elevada tasa de infección. Por ello se considera un modelo ideal para el estudio de su patogenia y de distintas posibilidades terapéuticas.
2. Mediante el empleo de la tecnología de impresión 3D se han fabricado implantes específicos de especie que han permitido una rápida recuperación postoperatoria de los animales. Además, su especificidad mejora la estabilidad del implante favoreciendo el desarrollo del biofilm en su superficie.
3. La liberación intra-articular de la rifampicina contenida en las microcápsulas añadidas al cemento óseo presenta niveles por encima de la CMI estafilocócica en todos los momentos de medición. Además, esta curva de liberación a partir del cemento óseo es similar a la presentada por otros antibióticos.

4. Los análisis microbiológicos han demostrado la superioridad estadísticamente significativa del uso de cemento con gentamicina asociado a microcápsulas de rifampicina frente al uso aislado de cemento con gentamicina en el tratamiento de la infección periprotésica.

5. La absorción sistémica de rifampicina no ha dado lugar a efectos secundarios graves. El único efecto encontrado ha sido la ictericia asintomática de tipo colestásico. Por ello se considera una vía segura de administración de rifampicina que permite administración de altas concentraciones de antibiótico con menor toxicidad que la vía sistémica.

6. El cemento con microcápsulas de rifampicina es eficaz en el tratamiento in vivo de la infección periprotésica por *Staphylococcus aureus* formador de biofilm.

IN VIVO STUDY OF THE EFFICACY OF BONE CEMENT WITH RIFAMPICIN CONTAINED IN ALGINATE MICROCAPSULES IN THE TREATMENT OF PROSTHETIC JOINT INFECTION

Introduction

Prosthetic joint infection (PJI) is a serious complication with increasing incidence due to the increase in the life expectancy of the population and in the functional demand of young patients. Currently, the incidence of PJI is 2-2.4% but it is estimated to arise to 47.5% in 2030, positioning the PJI as the first cause of revision.

Coagulase negative staphylococcus and *Staphylococcus aureus* are considered to be the main responsible agents of PJI, assuming the 20-39% and 13-31% of the cases respectively. Both are capable of adhere to the prosthetic material forming a biofilm, increasing the appearance of antibiotic resistance by acting as a physical barrier to its penetration and inhibiting the host's immune response. Therefore, the presence of a biofilm raises the effective antibiotic dosis among 200 to 1000 times.

Two-stage replacement in considered the gold estándar for the treatment of chronic PJI and is based on the removal of the prothesis and the implantation of a cement spacer with antibiotics. This technique allows reaching high intra-articular concentrations of antibiotic minimizing its systemic toxicity. This process must be accompanied by prolonged systemic antibiotic therapy and rifampicin in combination with quinolones is the first line treatment for staphylococcal PJI, which are the most frequent.

The main problem of rifampicin is that its addition to bone cement alters the polymerization process generating an incomplete setting cement not suitable for its use in clinical practice. In 2016, our research group designed a controlled release system of

rifampicin in form of microcapsules that demonstrated the preservation of the mechanical properties of bone cement with optimal release profile of rifampicin in in vitro studies.

Justification and objectives

The vehiculization of antibiotics in bone cement allows its local release reaching high intra-articular concentrations minimizing the systemic toxicity that would be unavoidable by the systemic administration of the same concentrations. Rifampicin is considered the cornerstone of the treatment of prosthetic infections due to staphylococci, having antibacterial activity against biofilm, planktonic and intracellular forms. Given the promising in vitro results of the release and efficacy of bone cement with rifampicin microcapsules the ratification of these properties in vivo was carried out. For this purpose, the present preclinical study with animals has been designed with the following objectives:

1. The definition of an experimental model of prosthetic joint infection
2. The design of species-specific implants by 3D printing
3. The achievement of intra-articular rifampicin release reaching levels above the staphylococcal MIC in vivo
4. The determination by microbiological analysis of the superiority of cement with gentamicina and rifampicina microcapsules in the treatment of prosthetic infection against cement exclusively with gentamicin.
5. The demonstration of the safety profile of rifampicin contained in microcapsules

Materials and methods

15 New Zealand White (NZW) rabbits of 3kg were used for the realization of this study, previous approval of the experimental protocol by the competent authority. In all of them, the tibial plateau was replaced by a stainless steel insert designed by 3D printing by the reconstruction of a CT performed on the knee of a rabbit from another study. After implantation and closure of the arthotomy, 1mL of 10^5 CFU of meticillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strain ATCC® 29213™ was inoculated.

One week after the inoculation the animals were re-anesthetized to carry out the first stage of the two-stage replacement, taking intraoperative samples to verify the presence of infection and placing a bone cement spacer. At this time the animals were divided into two experimentation groups: group R (8 rabbits) in which a cement spacer with gentamicin and 12.5% of rifampicin microcapsules was implanted and group C (7 rabbits) in which a spacer was used with gentamicin of routine clinical use. Intra-articular samples were taken from group R animals at 6, 24, 48 and 72 postoperative hours to define the intra-articular release curve of rifampicin. Said quantification was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC).

For the monitoring of the evolution of the inflammatory parameters defining infection and the systemic toxicity of rifampicin, analytical, weight and temperature determinations were taken before the beginning of the study, during the first stage of replacement, after 4 days and later on weekly until the end of the study. Systemic toxicity was determined by the elevation of liver enzymes, bilirubin and renal function markers. The evolution of the inflammatory parameters was defined according to the variations in ESR, leukocyte count, platelet count and percentage of lymphocytes in blood.

Four weeks after the implantation of the spacer the animals were sacrificed and the final samples taken for microbiological culture.

Statistical analysis was carried out with SPSS Statistics® software version 22.0 for Mac (IBM, NY, USA) considering statistically significant values of $p < 0.05$. The comparison between qualitative variables was performed with the χ^2 test and the comparative before-after studies with the T test for paired samples. The comparison of normal quantitative variables with dichotomous qualitative variables was carried out with the Student t test, while comparison of non-normal quantitative variables with dichotomous quantitative variables was carried out with the Mann-Whitney U test.

Results

All animals recovered from the surgeries without incident. Positive limb weight load was achieved in all cases with the use of species-specific implants. The efficiency of the intra-articular inoculation of *S. aureus* was 93.3%, with a PJI development in 14 of the 15 animals.

Intra-articular samples demonstrated the release of rifampicin from the cement spacer at concentrations higher than the staphylococcal MIC at all times of analysis.

4 weeks after the implantation of the spacer the microbiological cultures showed a significant lower growth of *S. aureus* in the group treated with cement with rifampicin microcapsules for the samples obtained from soft tissues and bone with $p = 0.01$ and 0.031 respectively. No statistically significant differences were detected between study groups in the values of AST, ALT, bilirubin or creatinin at any time during the study. An elevation of bilirubin above the normal values was identified in group R, this elevation remitted spontaneously 2 weeks after the placement of the spacer.

Discussion

Although there are several research works in which microcapsules of antibiotics are developed to be incorporated in bone cement, evaluating their mechanical properties, efficacy and in vitro toxicity, there is no validated animal model in the literature for the evaluation of these systems in vivo. For this reason, a new in vivo model has been designed to evaluate the efficacy of this cement with rifampicin microcapsules faithfully reproducing the systematics of a two-stage replacement of the usual clinical practice. This preclinical model has been shown to be suitable for studying the intra-articular release of the rifampicin contained in microcapsules and its possible systemic toxicity.

The rate of synthesis of new antibiotics has been surpassed by the speed of development of resistant microorganisms. Given the broad spectrum of action of rifampicin on the different forms of staphylococci, the present study opens new possibilities for the treatment of PJI, by allowing its inclusion in bone cement without altering its mechanical properties. In addition, the bactericidal capacity of said cement with rifampicin microcapsules has been demonstrated, achieving intra-articular levels above staphylococcal MIC and without producing systemic side effects.

Conclusions

1. An experimental model that allows faithful reproduction of the prosthetic infection environment has been designed obtaining a high rate of infection. Therefore, it is considered an ideal model for the study of its pathogenesis and different therapeutic strategies.
2. Through the use of 3D printing technology, species-specific implants have been developed allowing quick postoperative recovery of the animals. In addition, its

- specificity improves the stability of the implant, subserving the development of the biofilm on its surface.
3. The intra.-articular release of rifampicin contained in the microcapsules added to bone cement presents levels above the staphylococcal MIC at all times of measurement. In addition, this release curve is similar to the presented by other antibiotics.
 4. Microbiological cultures have demonstrated the statistical superiority of the use of cement with gentamicin associated with rifampicin microcapsules versus the isolated use of cement with gentamicin in the treatment of periprosthetic joint infection.
 5. The systemic absorption of rifampicin has not resulted in serious side effects. The only effect found was an asymptomatic cholestatic jaundice. Therefore, it is considered a safe route of administration of rifampicin that allows administration of high concentrations of antibiotic with less toxicity than the systemic route.
 6. Rifampicin microcapsule cement is effective in the in vivo treatment of prosthetic joint infection caused by biofilm-forming *Staphylococcus aureus*.

2. INTRODUCCIÓN

2. 1. INFECCIÓN PERIPROTÉSICA

La infección tras la artoplastia en cirugía ortopédica es una complicación devastadora tanto para el paciente como para el cirujano. Su presencia implica una pérdida significativa de la funcionalidad del miembro afecto y un riesgo considerable de afectación sistémica, pudiendo desencadenar un cuadro séptico con fracaso multiorgánico y producir la muerte.

La mortalidad a 5 años de los pacientes diagnosticados de infección protésica (PJI) ha demostrado ser mayor que la del cáncer de mama, melanoma y linfoma de Hodgkin (232). Además, la mortalidad a 1 y 5 años tras una revisión séptica de una artoplastia es 2,5 veces superior a la mortalidad tras revisión aséptica. Tanto la incidencia en auge de la PJI, su elevado coste como la morbimortabilidad que asocia hacen indispensable el desarrollo de nuevas estrategias que reduzcan la incidencia de esta complicación (328).

Actualmente la infección periprotésica se define por la Musculoeskeletal Infection Society (MSIS) (215) como se refleja en la tabla 1:

Uno de los siguientes criterios mayores:

- Dos cultivos periprotésicos positivos con microorganismos fenotípicamente idénticos.
- Presencia de fístula que se comunique con la articulación (figura 1).

O por la presencia de un mínimo de tres de los siguientes criterios menores:

- Proteína C reactiva (PCR) y velocidad de sedimentación globular (VSG) elevadas en suero.
- Leucocitosis o esterasa leucocitaria positiva en líquido sinovial.
- Neutrofilia en líquido sinovial.
- Análisis histológico positivo en tejido periprotésico.
- Un cultivo positivo.

Tabla 1: Criterios diagnósticos de PJI



Figura 1: Infección de prótesis total de rodilla con fístula cutánea y exposición del material protésico

Desde la publicación de estos criterios en 2011 algunos autores han propuesto algunas modificaciones, sobre todo centradas en el valor diagnóstico de otros parámetros intra-articulares cuyas técnicas de cuantificación se han desarrollado en los últimos años. Cabe destacar el trabajo publicado por Parvizi et al en 2018 (214) en el que se mantienen los criterios mayores diagnósticos de infección pero modifica los criterios menores y añade una serie de criterios intraoperatorios. Añade a los criterios menores la determinación de α -defensina y PCR intra-articulares e incluye dentro de los criterios diagnósticos intraoperatorios la presencia de pus, un cultivo positivo y un análisis anatomopatológico positivo para infección. Define como niveles diagnósticos de infección de PCR intra-articular aquellos mayores a 6,9mg/L y valores de α -defensina >1 . A pesar de los resultados de este trabajo, hay autores que siguen siendo precavidos a la hora de considerar los niveles de α -defensina como criterio diagnóstico de PJI (231).

2. 1. 1. Incidencia de la infección periprotésica (PJI)

El aumento de la esperanza de vida de la población asociado a la mayor demanda funcional de los pacientes jóvenes han producido un aumento en el número de artroplastias de cadera y rodilla que se realizan anualmente en todo el mundo, por lo que la incidencia de infecciones protésicas está aumentando de forma progresiva (171). Estudios recientes alertan sobre una incidencia de PJI del 2% en las artroplastias primarias de cadera y 2,4% en las de rodilla. Además, en la cirugía de revisión la incidencia de infección en estas localizaciones asciende hasta el 5-12%. Se estima que el número de infecciones tras una cirugía de revisión de una artroplastia total de cadera se incrementará de 3.400 casos en 2005, a 46.000 en 2030 (140). Actualmente, el 14,8% de las revisiones de artroplastias de cadera y el 25% de las revisiones de artroplastias de rodilla son secundarias a infección, esperándose el aumento de estos porcentajes hasta un 47,5% en 2030, posicionando a la PJI como primera causa de revisión (213). La evolución de la incidencia de la infección protésica se encuentra reflejada en la figura 2.

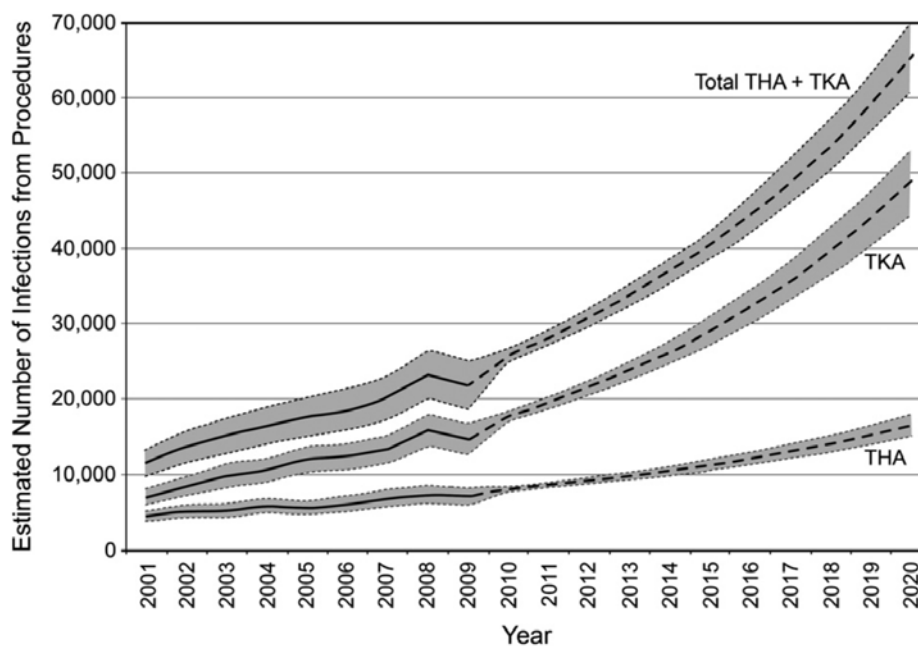


Figura 2: Antecedentes y número previsto de infecciones de artroplastias totales de cadera (THA), rodilla (TKA) y combinación de ambas (Total THA + TKA) en los

Estados Unidos. La línea continua representa las cifras hasta 2012, la línea discontinua las estimaciones hasta 2020 y el sombreado el IC95% de dichos valores (140).

En el caso de las artroplastias de hombro la incidencia de infección de las artroplastias invertidas y anatómicas es del 5% y 0,4-2,9% respectivamente (73) pero la incidencia de infección tras una cirugía de revisión en esta localización asciende hasta el 15% según la serie consultada (206). En la artroplastia de codo, cirugía en auge en los últimos años, la incidencia de infección documentada es muy variable en función de la serie consultada oscilando entre el 1,2 y 11,7% (208, 270). Muchos autores asocian estas altas tasas de infección con la alta proporción de pacientes con artritis reumatoide en los que se realiza este procedimiento y con el escaso tejido blando circundante que aumenta las probabilidades de dehiscencia de la herida quirúrgica (2, 302). La incidencia de PJI en distintas localizaciones se encuentra reflejada en la tabla 2.

Localización	Incidencia	Fuente
Artroplastia total de cadera primaria	2%	Malizos et al. 2017 ⁽¹⁷¹⁾
Artroplastia de rodilla primaria	2,4%	Kurtz et al. 2012 ^(140, 213)
Revisión de artroplastia de cadera/rodilla	5-12%	
Artroplastia invertida de hombro	5%	Florschutz et al. 2015 ⁽⁷³⁾
Artroplastia anatómica de hombro	0,4-2,9%	Pdegimas et al. 2015 ⁽²⁰⁶⁾
Revisión artroplastia de hombro	15%	
Artroplastia primaria de codo	1,2 y 11,7%	Somerson et al. 2015 ⁽²⁷⁰⁾ Park et al. 2013 ⁽²⁰⁸⁾
Artroplastia de tobillo	1,5-3,5%	Hsu et al. 2015 ⁽¹⁰⁹⁾
Tabla 2: Incidencia de PJI en distintas localizaciones		

Este aumento en la prevalencia de la infección protésica tiene una traducción económica: en EEUU el coste de las revisiones por infección en 2002 fue de 900 millones de dólares y se estima que en 2020 será de 1,6 billones (126). En nuestro medio, el coste de cada revisión oscila entre 80.000-95.000€, cinco veces más que la artroplastia primaria. Este incremento del coste directo se debe a que la cirugía de revisión debida a PJI es más compleja que la artroplastia primaria, asociándose a una mayor necesidad de transfusiones de sangre, uso de implantes más complejos, mayor tiempo quirúrgico y mayor estancia hospitalaria (23). Además, la PJI produce un aumento de los costes indirectos, no incluidos en las cifras previamente comentadas, al disminuir el rendimiento laboral de los pacientes jóvenes y aumentar los requerimientos económicos para la provisión de cuidados tras el alta hospitalaria (285).

2. 1. 2. Patogénesis

El desarrollo de una infección protésica viene determinado por dos factores: las características del paciente y las del microorganismo implicado. En cuanto a las **características del paciente**, la principal circunstancia asociada al desarrollo de una PJI es la presencia de una infección superficial de la herida quirúrgica en el postoperatorio con un OR de 36. Recientes meta-análisis determinan la obesidad como importante factor de riesgo para el desarrollo de una infección tras una artroplastia, con OR=4 para IMC > 40 seguido por la diabetes mellitus mal controlada con OR=3,72. Otros factores de riesgo identificados son la neoplasia concomitante, hipertensión arterial, IMC > 30, inmunosupresión (tratamiento con corticoides, artritis reumatoide, VIH, VHC, etc.), clasificación de la American Society of Anesthesiologist ≥ 3 , hábito tabáquico,

consumo de alcohol, consumo de drogas y colonización nasal por *S. aureus* (19, 22, 40, 127, 193, 232, 255).

Respecto a las **características del microorganismo implicado**, los principales microorganismos causantes de la infección protésica son los estafilococos coagulasa negativos (20,2-39,9%) y el *Staphylococcus aureus* (13-31%), cepas meticilinsensibles y resistentes, siendo menos frecuente el aislamiento de Streptococcus (5,8-6,5%), Enterococcus (3,9-7%), anaerobios (0,9-9%), hongos (0,3-2,3%) y micobacterias (0,6%) (3, 290) (figura 3).

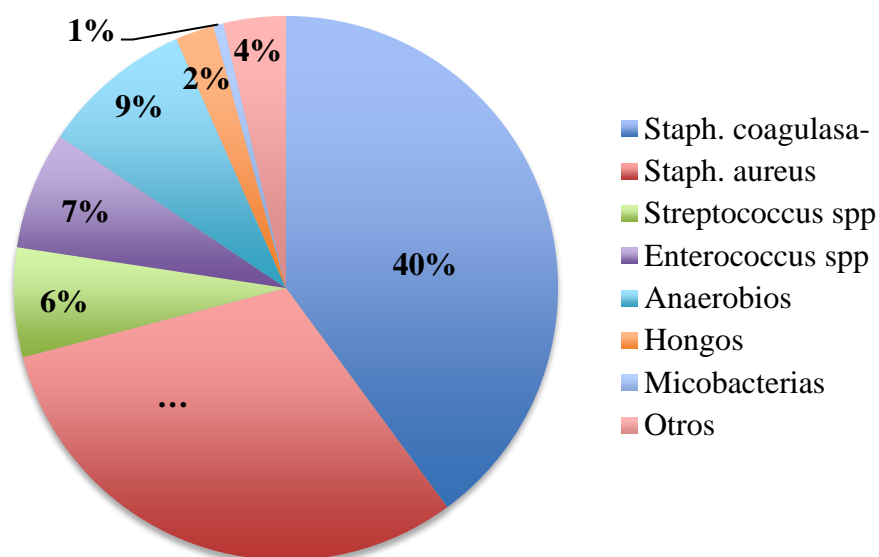


Figura 3: Microorganismos causantes de la infección periprotésica

Los microorganismos, especialmente los estafilococos, al entrar en contacto con el material protésico, son capaces de adherirse a él creando un biofilm. Definimos el biofilm como aquella comunidad de microorganismos englobados en una matriz estructural adherida a un sustrato, en nuestro caso el implante articular. Además, la presencia de este cuerpo extraño produce una disfunción del sistema inmune a nivel local con disminución de células NK y linfocitos y acumulo de granulocitos anómalos alrededor del implante debido a la fagocitosis frustrada que induce su degranulación y

producción de superóxido (326). Este ambiente de hipovascularización e inmunodeficiencia local junto con el depósito de proteínas del huésped en la superficie del implante generan una situación ideal para la adhesión bacteriana y desarrollo del biofilm, llegando a suponer un riesgo del 30-40% de padecer una PJI en el contexto de una sepsis por *S. aureus* (325).

Así, el biofilm se concibe como el conjunto de una gran cantidad de microorganismos englobados en una matriz extracelular con un espesor estimado de unos 50µm (figura 4). En función de la localización del microorganismo en la estructura del biofilm su acceso a nutrientes y oxígeno será variable, determinando así su nivel de actividad. Aquellos microorganismos que están más alejados de la superficie del biofilm tienen menor acceso a nutrientes y oxígeno por lo que se encuentran menos activos, siendo menos sensibles a la acción de los antibióticos y dando lugar a la forma sésil de estos microorganismos descrita por Lewis et al (155). Además, desde los biofilms maduros de gran volumen se produce una liberación de microorganismos en forma planctónica que son capaces de generar nuevos biofilms a distancia si encuentran otro cuerpo extraño (235).

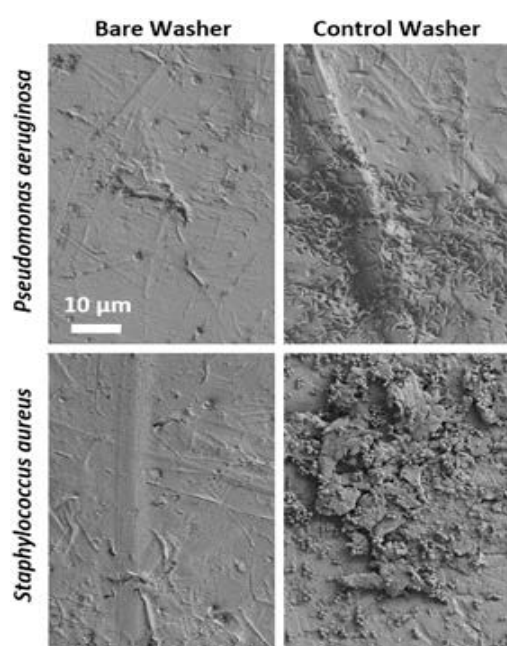


Figura 4: Imagen de microscopía electrónica del biofilm formado por *P. aeruginosa* y *S. aureus* sobre un implante metálico. La columna de imágenes de la izquierda muestra el control sin microorganismos mientras que la columna de la derecha muestra la colonización y estructura del biofilm. De Chopra et al (2017) (44)

La formación de un biofilm tiene dos consecuencias clínicas inmediatas: aumenta la aparición de resistencias a antibióticos e inhibe la respuesta inmune del huésped. Respecto a la aparición de resistencias, la matriz y las capas de microorganismos adheridos a ella funcionan como una barrera física para la penetración del antibiótico, circunstancia que unida a las áreas ácidas e hipovascularizadas que rodean el biofilm, impide su acceso al territorio afectado a concentraciones eficaces. La eficacia antimicrobiana requiere penetración, dependiente de gradiente de concentración, del antibiótico en el biofilm hasta conseguir la concentración mínima inhibitoria (CMI). Las bacterias que componen el biofilm, al estar en forma sésil, poseen un metabolismo disminuido, por lo que la eficacia bactericida de los antibióticos se ve disminuida. Además, existen canales en la estructura del biofilm que permiten el paso de escasas moléculas de antibiótico alcanzándose en su interior concentraciones subletales que han demostrado aumentar las resistencias al seleccionar los mutantes resistentes del biofilm, dando lugar a que la CMI de una gran cantidad de antibióticos se vea aumentada cuando los microorganismos se encuentran dentro de un biofilm. A estos mecanismos de tolerancia específicos del biofilm debemos añadir los mecanismos habituales de las bacterias para desarrollar resistencias como son la expulsión del antibiótico mediante bombas de eflujo, bloqueo del transporte transmembrana del antibiótico, producción de enzimas inhibitorias como las β -lactamasas o el intercambio de plásmidos (72, 182). Por este motivo las dosis activas de antibiótico in vitro frente a una bacteria englobada en un biofilm es de 200 a 1000 veces superior a la necesaria frente a formas planctónicas de la misma (55). Esto hace insuficiente el tratamiento antibiótico intravenoso dado que su toxicidad no permite la administración de dosis lo suficientemente elevadas para ser eficaces a nivel articular (15).

Respecto a la inhibición de la respuesta inmune del huésped, la matriz que conforma el biofilm impide la fagocitosis de los microorganismos por parte de los polimorfonucleares y la penetración de los anticuerpos. Esta ineffectividad de la respuesta inmune hace que se desarrolle una inflamación crónica en la periferia del implante con la consiguiente lesión de los tejidos circundantes. Los detritus procedentes de estos tejidos se emplean como nutrientes por los microorganismos que conforman el biofilm perpetuando la infección (182).

La infección puede desarrollarse por diferentes mecanismos: contaminación directa o por proximidad, diseminación hematogena o recurrencia de una infección previamente diagnosticada.

Las guías actuales de la American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) (57), del Infection Disease Society of America (IDSA) (204), del International Consensus on PJI (212) y del Liestal Algorithm Suizo (181) hacen una clara distinción entre diferentes tipos de PJI basándose en la clasificación de Tsukayama que deben tenerse en cuenta para establecer la actitud terapéutica adecuada (tabla 3) (85):

Tipo	Definición	Incidencia
Infección postquirúrgica precoz	La que ocurre en el primer mes de la cirugía	35%
Infección postquirúrgica tardía	Inicio después del primer mes independientemente de la estabilidad de los componentes	50%
Infección hematógena aguda	Aparece después del primer mes pero el inicio de la clínica es aguda sobre una prótesis sin síntomas previos. Se considerará aguda si la duración de los síntomas es menor de 3 semanas.	10%
Cultivos intraoperatorios positivos	Aquellos obtenidos durante la cirugía de revisión de una prótesis supuestamente aséptica	5%
Tabla 3: Tipos de PJI basados en la clasificación de Tsukayama		

La distinción entre infección periprotésica precoz y tardía se basa en la suposición de que hacen falta al menos 3 semanas para que madure el biofilm en la superficie de los componentes, circunstancia que haría necesaria su retirada. Recientemente se ha demostrado que los microorganismos pueden dar lugar a un biofilm maduro en pocos días, por lo que la clasificación de las infecciones protésicas y su consiguiente tratamiento está en continua revisión (85, 252, 327).

2. 1. 3. Tratamiento de la infección periprotésica

Los principales objetivos del tratamiento de una PJI son el alivio del dolor, la restauración de la función articular y la erradicación de la infección. Para conseguirlo, el abordaje terapéutico debe ser multidisciplinar con actuación conjunta de traumatólogos,

cirujanos plásticos, intensivistas, médicos especialistas en infecciones y microbiólogos (204, 233). En la mayoría de los casos el tratamiento se basa en tres pilares: la optimización del estado general del paciente (control glucémico, tratamiento de la inmunosupresión, etc), tratamiento quirúrgico para disminuir la carga bacteriana y un tratamiento antibiótico de larga duración.

2. 1. 3. 1. Tratamiento quirúrgico de la PJI

El tratamiento quirúrgico de la PJI viene determinado por el tiempo desde el inicio de los síntomas y el microorganismo causante de la misma. En condiciones normales se contemplan dos tipos de tratamiento en función de la necesidad de retirar el implante para la curación de la misma: la irrigación y desbridamiento manteniendo el implante y el recambio protésico con sus diferentes variantes (recambio en un tiempo, recambio en dos tiempos, artrodesis y resección).

La **irrigación y desbridamiento con mantenimiento del implante** está indicada para el tratamiento de aquellos pacientes con componentes fijos, sin fístula cutánea y con un diagnóstico de infección precoz dentro de los 3 meses posteriores a una artroplastia primaria con menos de 3 semanas de síntomas o aquellas prótesis previamente asintomáticas que llevan menos de 3 semanas con clínica infecciosa. También se emplea en pacientes que no cumplan estos criterios pero cuyo estado general impide la realización de procedimientos más agresivos, aunque en este caso la tasa de curación de la infección es precaria (204). No se recomienda realizar solo irrigación y desbridamiento en aquellos pacientes con factores de riesgo de recurrencia tales como el mal estado de partes blandas circundantes, inmunodeprimidos o gérmenes

multirresistentes como el *S. aureus* meticilin-resistente (MRSA) por el alto riesgo de persistencia de la infección y desarrollo de infecciones polimicrobianas (85, 119).

Este procedimiento implica irrigación profusa de la articulación con alrededor de 6-9 litros de suero, pero los protocolos a seguir son múltiples, sin haberse alcanzado consenso sobre la mejor pauta a seguir. El desbridamiento debe ser amplio, retirándose todo aquel tejido no sangrante de naturaleza blanda u ósea (85). Debe asociarse un recambio de los componentes modulares para disminuir la carga biológica al retirar el biofilm: la cabeza e inserto en las prótesis de cadera y el polietileno en las prótesis de rodilla, permitiendo así una mejor limpieza de la cara posterior de la articulación. Deben tomarse muestras microbiológicas intraarticulares en el momento de la cirugía que determinarán el cambio de antibioterapia empírica a un tratamiento antibiótico específico en el postoperatorio. Las tasas de éxito publicadas tras la realización de este procedimiento varían desde el 10 al 75% según la serie consultada (136, 166, 201), y las publicaciones existentes, aunque escasas, parecen indicar que la tasa de fracaso de un recambio en dos tiempos es mayor en aquellos pacientes en los que se ha realizado una irrigación con retención del implante previa (83, 257).

Dentro de la **cirugía de recambio de la prótesis infectada** existen dos opciones terapéuticas: el recambio en un tiempo y el recambio en dos tiempos. La principal premisa para realizar un *recambio en un tiempo* es el aislamiento preoperatorio del microorganismo y la definición de su sensibilidad a antibióticos, indicándose este tipo de cirugía en aquellas situaciones en las que el microorganismo identificado tenga un tratamiento antibiótico eficaz que alcance concentraciones intra-articulares efectivas bien por su acceso hematógeno o por su acción tras la administración intra-articular. El recambio en un tiempo implica la resección de la cicatriz previa y retirada de todo

cuerpo extraño presente en la articulación (prótesis, cemento, restrictores, etc). Debe asociar un desbridamiento exhaustivo de cualquier tejido no sangrante de naturaleza ósea o de partes blandas, con toma de muestras para cultivo microbiológico, seguido de lavado pulsátil profuso. En este mismo tiempo se realiza la implantación de un nuevo componente protésico, cuya necesidad de cementación se encuentra en continuo debate. Se consideran, de manera generalizada, como contraindicaciones para la realización de un recambio en un tiempo la presencia de (85):

- Sepsis.
- Al menos dos recambios en un tiempo previos fallidos.
- Lesión neurovascular.
- Cultivos negativos que impiden la antibioterapia dirigida.
- Lesión de partes blandas que pueda dificultar el cierre de la herida quirúrgica.
- Presencia de fístula que pueda contaminar los cultivos intraoperatorios dificultando la identificación del microorganismo causal.
- Infección por microorganismos de alta virulencia o que requieran el uso de antibióticos que no pueden añadirse al cemento óseo.

De presentarse cualquiera de las contraindicaciones previas se recomienda la realización de un recambio en dos tiempos. El recambio en un tiempo ha demostrado producir menor morbilidad que el recambio en dos tiempos y una mayor y más rápida recuperación funcional del paciente. Además, es un procedimiento más barato, estimándose 1,7 veces más económico que el recambio en dos tiempos y parece conseguir mejores resultados en lo que a años de vida ajustados por calidad se refiere (133, 313). El principal problema de este tipo de cirugía de sustitución articular es que, al igual que ocurría con la irrigación y desbridamiento, sus resultados pueden verse

fácilmente comprometidos por aquellas comorbilidades del paciente previamente descritas que facilitan la persistencia de la infección como la diabetes, obesidad, inmunosupresión, hábito tabáquico, enfermedad renal, etc, por lo que la selección y optimización preoperatoria del paciente deben ser muy cuidadosas (119). Teniendo en cuenta esta exhaustiva selección del paciente, la tasa de curación tras el recambio en un tiempo varía entre el 86 y el 100% (82).

El **recambio en dos tiempos** está considerado como el tratamiento de elección de la infección protésica tardía, cualquiera debida a gérmenes resistentes a antibióticos anti-biofilm (rifampicina y quinolonas) y como segunda opción tras el fracaso de la irrigación y desbridamiento en las infecciones precoces (126).

Este procedimiento implica un primer tiempo de retirada de todo el material extraño y desbridamiento agresivo de hueso y partes blandas. Tanto en el desbridamiento como durante la extracción de los componentes protésicos se debe poner especial atención en minimizar la pérdida de stock óseo al tiempo que se eliminan todas las áreas de osteolisis y necrosis. El desbridamiento debe asociarse a la toma de muestras microbiológicas intraoperatorias, entre 3 y 6, dentro de las cuales deben incluirse muestras intramedulares y de la cápsula posterior en el caso de las prótesis de rodilla. En este mismo tiempo se colocará un espaciador de cemento óseo que debe contener un antibiótico con actividad frente al microorganismo asilado, siendo primordial que consiga alcanzar concentraciones bactericidas intra-articulares y que permita conservar el espacio articular reduciendo la contractura de partes blandas periarticulares facilitando a su vez la carga de la extremidad. Esta liberación intra-articular de antibióticos produce la muerte de aquellos microorganismos que no hayan sido retirados durante el lavado y desbridamiento de la articulación. Este primer tiempo

de recambio se asocia a tratamiento antibiótico sistémico de entre 3 y 6 meses de duración (17).

Tras este periodo de tratamiento se recomienda esperar un tiempo sin administración de antibiótico antes de proceder al segundo tiempo de recambio protésico. En la actualidad, no existe consenso sobre cuál es el tiempo óptimo para la realización del segundo tiempo de recambio, recomendándose esperar al menos dos semanas y hasta 6 meses tras el primer tiempo según la publicación consultada (204, 312, 327). Esto se debe, en parte, a que no disponemos de ningún marcador que nos permita asegurar la resolución de la infección para llevar a cabo el segundo tiempo (212). Aun así, durante estas dos semanas se recomienda la determinación analítica de PCR y VSG pero, aunque es cierto que sus niveles descienden tras el primer tiempo de recambio, los niveles previos al segundo tiempo son bastante heterogéneos y no se consideran especialmente representativos del estado de la infección, por lo que no permite predecir el fracaso del recambio (141, 142). Tras dos semanas libres de tratamiento antibiótico también se recomienda realizar un cultivo de líquido articular, prueba con alta especificidad (92-100%) pero de sensibilidad variable (0-100%) (165, 188). El uso de otros marcadores de infección, como las interleukinas 6 y 8 parecen ser prometedores en el diagnóstico de PJI pero el umbral diagnóstico, la sensibilidad y especificidad individual y colectiva aun estan en proceso de esclarecimiento (150, 320). Respecto al papel de la α -defensina, estudios recientes establecen como diagnósticos de infección aquellos valores superiores a 1 en líquido articular (214). En cualquier caso, se ha demostrado que una espera superior a 6 meses entre los dos tiempos de recambio no se asocia con un aumento de eficacia en la erradicación de la infección en tanto que disminuye la recuperación funcional (119). De sospecharse persistencia de la infección se recomienda repetir el desbridamiento y el recambio del espaciador (85).

El segundo tiempo del recambio en dos tiempos implica la retirada del espaciador, limpieza y desbridamiento de la articulación y colocación de una nueva prótesis. Deben obtenerse nuevas muestras para cultivo microbiológico y, de ser positivas, se asociará tratamiento antibiótico intravenoso postoperatorio de larga duración. La tasa de curación de la infección tras un recambio en dos tiempos oscila entre el 65 y el 100% en función de la serie consultada, siendo la positividad de los cultivos intraoperatorios durante el segundo tiempo el principal factor asociado con el fracaso terapéutico (7, 248). El resumen del algoritmo terapéutico de la PJI se encuentra reflejado en la figura 5.

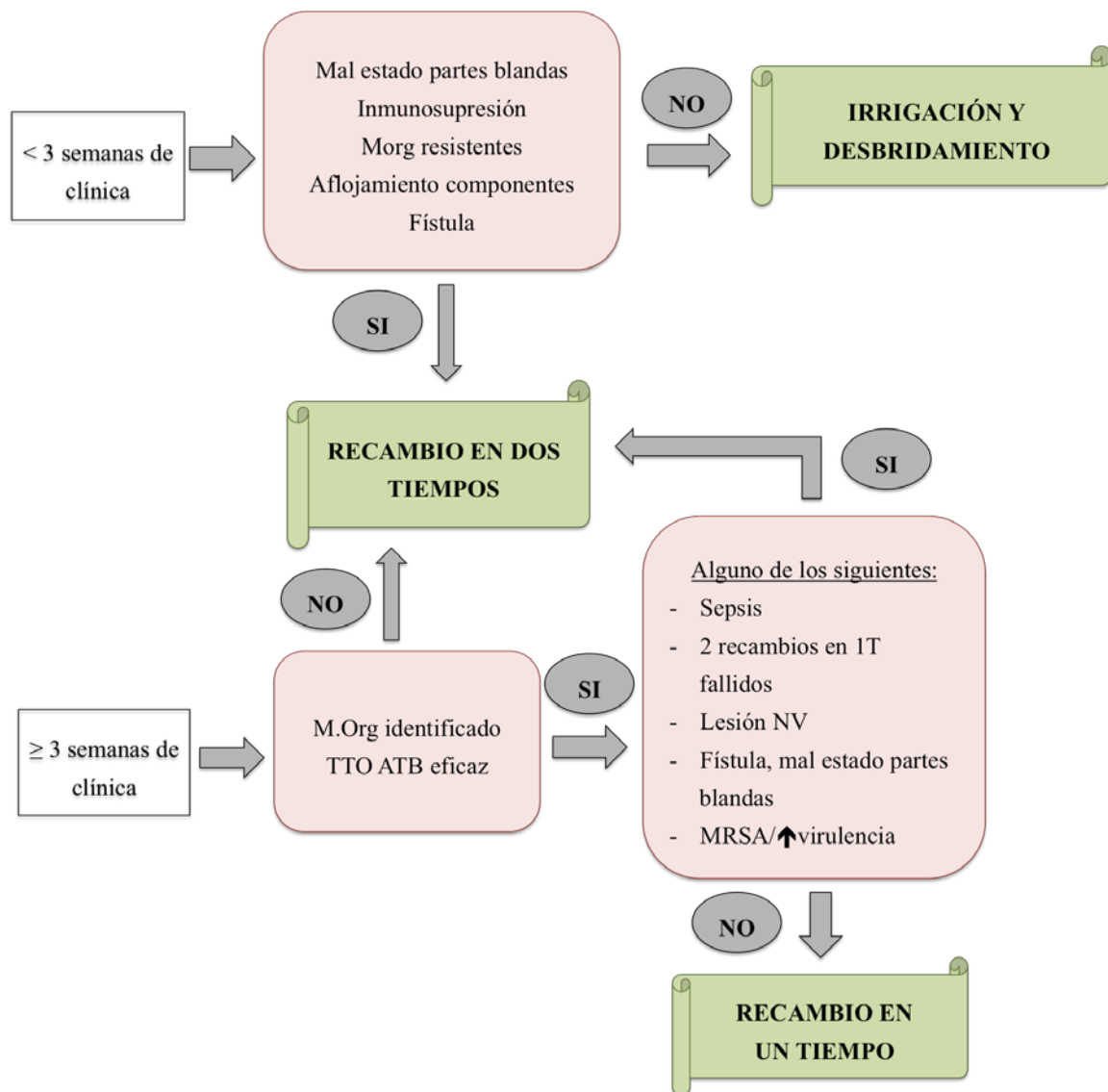


Figura 5: Algoritmo terapéutico

Existen una serie de opciones terapéuticas que no son consideradas como tratamientos de primera línea frente a la infección periprotésica pero que deben ser tenidos en cuenta ante pacientes con características especiales:

TRATAMIENTO SUPRESOR CRÓNICO

El objetivo es el control de la infección a nivel local pero no la erradicación de la misma, dando lugar a una prótesis asintomática y funcional. Se indica en pacientes muy ancianos o con muchas comorbilidades que no permiten realizar un tratamiento quirúrgico de mayor envergadura que la irrigación y desbridamiento. Para considerar esta opción terapéutica debemos encontrarnos ante una prótesis sin signos de aflojamiento infectada por un microorganismo poco virulento para el que exista tratamiento antibiótico oral efectivo. Solo está contraindicado en aquellos pacientes portadores de válvulas cardiacas u otros implantes sin evidencia de infección (85, 229). Puede realizarse con cotrimoxazol, cloxacilina, minociclina, cefadroxilo y cefalexina. La monoterapia con rifampicina no está indicada dada la elevada tasa de desarrollo de resistencias. Se han descrito resultados favorables en un 60-86% de los casos (175, 250).

ARTROPLASTIA DE RESECCIÓN

En el caso de PJI localizadas en la rodilla queda reservada para aquellos pacientes con muy baja demanda funcional, ya que se prefiere la artrodesis de dicha articulación, pero en PJI localizadas en la cadera se considera como opción válida en pacientes inmunodeprimidos o usuarios de drogas por vía parenteral en los que las probabilidades de éxito de un recambio son muy bajas (308).

ARTRODESIS

Es el tratamiento clásico de las PJI localizadas en la rodilla pero es una técnica en desuso dado el éxito de los recambios en uno y dos tiempos. Actualmente se consideran buenos candidatos para la artrodesis aquellos pacientes jóvenes y activos con lesión irreparable del aparato extensor y stock óseo limitado, o cualquier paciente con PJI secundaria a microorganismos multi-resistentes que no ha podido controlarse por otros métodos (314).

AMPUTACIÓN

Se considera la última opción y actualmente solo supone un 0,1% de las PJI localizadas en la rodilla (263). Se encuentra reservada para aquellos casos con infecciones no controlables asociadas a riesgo vital o pacientes con importante lesión de partes blandas asociada a defectos óseos masivos que impiden la realización de una artrodesis.

2. 1. 3. 2. Tratamiento antibiótico de la PJI

El tratamiento antibiótico es un pilar fundamental en el tratamiento de la PJI y debe individualizarse en función de las características del microorganismo, el resultado del antibiograma y las características del paciente. Debe iniciarse intraoperatoriamente y consta de un periodo inicial de tratamiento intravenoso de amplio espectro hasta el aislamiento del microorganismo causante, momento en el que se cambia a antibioterapia dirigida. El protocolo de antibioterapia empírica inicial varía en función del centro, encontrándose combinaciones de vancomicina 1g/12h asociada a meropenem 500mg/8h

(17), teicoplanina 600mg/24h con meropenem 1g/8h o monoterapia con vancomicina 15mg/kg/12h, teicoplanina 10-12mg/kg/24h, daptomicina 6-10mg/kg/24h o ciprofloxacino 400mg/12h (233). Como excepción cabe destacar que en aquellos casos en los que se realice un recambio en un tiempo, como el microorganismo causal ha sido aislado preoperatoriamente, el tratamiento se realizará de forma dirigida desde el diagnóstico (29).

Se prefiere el inicio del tratamiento por vía intravenosa frente a la oral porque permite alcanzar la concentración mínima bactericida en periodo de tiempo menor. Existen múltiples protocolos y aunque la duración ideal del tratamiento antibiótico aun no ha sido determinada (119, 212) se tiende a administrar antibiótico sistémico entre 3 y 6 meses tras la cirugía. En aquellos casos en los que se trate de microorganismos sensibles el tratamiento oral suele basarse en combinaciones de antimicrobianos con efecto anti-biofilm: rifampicina (activa frente a gram positivos) con quinolonas (eficaz frente a gram negativos) (56, 85, 212). En aquellos casos en los que se lleve a cabo un recambio en dos tiempos parece haber mayor consenso en la duración del tratamiento recomendándose tratamiento antibiótico durante 3 meses para PJI localizadas en la cadera y 6 meses para PJI localizadas en la rodilla (78, 204, 212) iniciándose en el primer tiempo de la cirugía y será intravenoso durante al menos las 2 primeras semanas.

La rifampicina se considera la piedra angular del tratamiento de las PJI de origen estafilocócico, sean meticilin-resistentes (MRSA) o meticilin-sensibles (MSSA), que son las más frecuentes (166, 233, 234). Por ello, todas las opciones quirúrgicas previamente descritas incluyen en su tratamiento antibiótico el uso de rifampicina oral asociada a otro antibiótico, especialmente quinolonas, aunque no existe consenso sobre cuándo debe iniciarse el tratamiento con rifampicina ni sobre la dosis o frecuencia de

administración ideal (204, 212). La rifampicina es un derivado semisintético de la rifamicina que se obtiene del *Streptomyces mediterranei*. Es un antibiótico de amplio espectro con acción bactericida sobre los estafilococos, que actúa fijándose a la subunidad β de la RNA-polimerasa DNA-dependiente bacteriana inhibiendo su actividad y con ello la síntesis de RNA. La aparición de resistencias es frecuente y se debe a modificaciones en el gen *rpoB* que codifica esta subunidad de la RNA-polimerasa impidiendo así la fijación del antibiótico. Se han identificado factores de riesgo para el desarrollo de resistencia a rifampicina en la práctica clínica como el sexo masculino, al menos 3 cirugías de revisión previas, el tratamiento previo con rifampicina en pautas inadecuadas y la presencia de una elevada carga bacteriana en el lugar de actuación (1). El uso de la rifampicina está ampliamente extendido en el tratamiento y profilaxis de las infecciones asociadas a cuerpos extraños en las que los estafilococos producen un biofilm, dado que ha demostrado ser eficaz tanto en su eliminación como en la prevención de la formación del mismo (159, 166). La asociación con las quinolonas, especialmente ciprofloxacino o levofloxacino, es necesaria para minimizar la aparición de resistencias a antibióticos, estrategia ya descrita en el tratamiento de infecciones por micobacterias (125). La biodisponibilidad oral de la rifampicina es del 90% pero su administración repetida induce la expresión a nivel hepático de la enzima desacetilante, acelerando su aclaramiento y disminuyendo su semivida plasmática, que pasa de ser de 3-5 horas al inicio de la administración a 2 horas tras 2 semanas de tratamiento (72).

La rifampicina es un antibiótico con acción concentración-dependiente y tiene un efecto postantibiótico largo. El mejor parámetro para predecir su actividad bactericida es la relación AUC/CMI, donde AUC es el área bajo la curva y CMI es la concentración mínima inhibitoria (103, 191). La concentración máxima plasmática

(C_{max}) de la rifampicina tiene una buena correlación con el AUC y algunos autores consideran que el cociente C_{max}/CMI parece estar asociado con la selección de resistencias (95). Dado que no existe consenso sobre la dosis o intervalo de administración ideales, encontramos pautas en la literatura que varían de 300mg/8h, 450mg/12h, 600mg/24h o 10mg/kg/12h. De ellas, la administración de 600mg/24h parece ser la mejor tolerada pero aumenta el cociente C_{max}/CMI en comparación con las administraciones cada 12 horas por lo que podría aumentar la aparición de resistencias (212). En la tabla 4 se encuentran resumidas las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de la rifampicina.

Biodisponibilidad oral	90%
Unión a proteínas plasmáticas	88,6%
Semivida plasmática	3-5h inicial; 2-3 horas tras autoinducción de metabolismo
Metabolismo	Metabolismo hepático, autoinducido
Excreción	Biliar con circulación enterohepática Renal inalterado 15%
C _{max}	8-24 µg/mL
CMI in vitro para <i>S. aureus</i>	0,0003-0,012 µg/mL
CMI in vivo para <i>S. aureus</i>	0,06 µg/mL
Tabla 4: Características farmacocinéticas y farmacodinámicas de la rifampicina	

La rifampicina es un fármaco moderadamente bien tolerado siendo los efectos secundarios más frecuentes las molestias gastrointestinales, especialmente las náuseas, mialgias y artralgias. Sin embargo, existen dos efectos adversos cuya gravedad obliga a la suspensión inmediata del tratamiento: la hepatitis y el síndrome seudogripal. El desarrollo de hepatitis puede observarse en un 2,5% de pacientes, implicando un aumento de GPT sin aparente relación con la dosis administrada. Se produce con más

frecuencia en pacientes alcohólicos, niños, hepatópatas y aquellos en tratamiento concomitante con isoniazida. No debe confundirse con una ictericia asintomática de tipo colestásico que puede aparecer al inicio del tratamiento y desaparece de forma espontánea en pocos días. Esta última se debe a la competencia entre la captación de bilirrubina y la rifampicina en el hepatocito. El desarrollo de un síndrome pseudogripal alerta sobre la existencia de una reacción de hipersensibilidad contra la rifampicina que puede asociar la aparición de urticaria y púrpura con trombocitopenia, leucopenia, hemólisis y fracaso renal secundario a una glomerulonefritis o nefritis intersticial. Este cuadro suele relacionarse con tratamientos intermitentes con rifampicina en dosis superiores a 1200mg y los síntomas desaparecen con la suspensión del tratamiento. Otros efectos secundarios menos frecuentes son la insuficiencia suprarrenal por aumento del catabolismo de los esteroides suprarrenales, tinción anaranjada de las secreciones, síntomas neurológicos (somnolencia, fatiga, mareo, ataxia, desorientación, parestesias), neutropenia y uveítis anterior, estas dos últimas relacionadas con una Cmax sobre 1µg/mL. Por ultimo, recordar que la rifampicina es una conocida inductora del citocromo p450 (CYP3A) dando lugar a numerosas interacciones farmacológicas (28, 72, 191).

2. 2. CEMENTOS ÓSEOS

La incorporación del polimetilmetacrilato (PMMA) como biomaterial se ha visto precedida por amplias investigaciones en el campo de la química. El ácido acrílico se describe en 1843 pero no se consigue su polimerización hasta 1940, momento en el que se describen dos productos similares, el Plexiglas[®] alemán y el Perspex[®] británico, empleados para la creación de láminas de plástico transparente. La aplicación de PMMA en cirugía ortopédica no se popularizó hasta la segunda mitad de los años noventa, cuando en 1958 Charnley emplea este denominado “cemento acrílico” en el canal femoral para la fijación de una prótesis de cadera, pero el polimetilmetacrilato ya se empleaba desde 1930 para el relleno de defectos óseos de origen tumoral y fracturas vertebrales (101).

2. 2. 1. Polimetilmetacrilato: propiedades y polimerización

El PMMA es un derivado del ácido acrílico que se define como un polímero sintético termoestable que al exponerse a temperaturas elevadas produce una reacción exotérmica capaz de generar enlaces cruzados entre las cadenas lineales (simples) de PMMA dando lugar a un producto final con gran entrecruzamiento de cadenas. Esta reacción de polimerización es irreversible y genera un producto final termoestable, ligero, con alta resistencia al impacto y de fácil combustión. Este PMMA inicial tenía como inconveniente que para su polimerización requería temperaturas cercanas a los 100°C, pero las investigaciones de Kuzler y Degussa en 1943 permitieron diseñar el PMMA autopolimerizable del que disponemos hoy en día, con solidificación a temperatura ambiente y cuya reacción exotérmica in vivo no supera los 56°C (137, 310).

En la actualidad, los cementos óseos están formados por un componente sólido (polvo) y otro líquido con ratio 2:1. La fracción sólida está formada en su mayor parte por PMMA asociado a un catalizador de la reacción de polimerización (peróxido de benzoilo), al que se puede añadir sulfato de bario o dióxido de zirconio, colorante (clorofila) y un antibiótico en distintas concentraciones en función de la casa comercial. La fracción líquida está mayoritariamente compuesta por el monómero de metilmetacrilato (MMA) asociado a un acelerante de la reacción de polimerización (N,N-dimetil-p-toluidina (DmpT)), un estabilizador de esta reacción (hidroquinona) y un colorante en concentración variable dependiente de la casa comercial. Dado que la polimerización del cemento se realiza dentro del organismo, la reacción debe ser controlada. La DmpT disuelta en el MMA es una amina terciaria que actúa como activador de la reacción de polimerización iniciando el fraguado a temperatura corporal. Para su activación debe contactar con el peróxido de benzoilo presente en la fracción sólida que actúa como iniciador, generándose radicales libres que rompen los enlaces de carbono activando la DmpT. Por último, la hidroquinona presente en la fase líquida actúa como estabilizador de la reacción previniendo una polimerización prematura en condiciones de alta temperatura ambiente o exposición lumínica. La presencia de colorantes (clorofila) y de sulfato de bario o dióxido de zirconio obedece a una demanda meramente clínica: la clorofila permite distinguir entre los tejidos corporales y el cemento con facilidad ya que adquiere una tonalidad verdosa, y tanto el sulfato de bario como el dióxido de zirconio son elementos radiopacos que permiten monitorizar la integridad del cemento radiográficamente (101, 170).

2. 2. 2. Aplicación clínica de los cementos óseos

En nuestro medio, el cemento óseo se emplea para la fijación de componentes primarios en artoplastia en casi todas las localizaciones, relleno vertebral en vertebroplastias percutáneas, como medio de liberación de medicamentos (sobre todo antibióticos), para la construcción de espaciadores en el tratamiento de PJI y para la aumentación de fracturas osteoporóticas (170).

El PMMA es capaz de transferir las cargas desde el implante hasta el hueso, rellenando los espacios entre ambos, amortiguando la transmisión de fuerzas y dispersándolas a lo largo de toda la interfaz. Esto es posible gracias a que las propiedades termomecánicas del PMMA son similares a las del hueso. Así, los implantes cementados transmiten la carga sobre un área mayor que los no cementados, siendo esencial para su funcionamiento una adecuada técnica de cementación que genere una interfaz implante-cemento y cemento-hueso de calidad. El grado de interdigitación del cemento en el hueso está directamente relacionado con la resistencia de la interfaz y es por ello que una técnica de cementación subóptima ha demostrado aumentar la tasa de revisión secundaria a aflojamiento aséptico del implante (185, 239).

El papel del cemento óseo en el tratamiento de la PJI es dual ya que por un lado permite la liberación intra-articular de antibióticos y, por otro, su uso en forma de espaciador permite mantener el espacio articular tras el primer tiempo de recambio evitando la contractura de tejidos blandos periarticulares y manteniendo la longitud del miembro. En la actualidad, la mayoría de autores recomiendan el uso de cemento óseo con antibiótico para la fijación de componentes tras un recambio en un tiempo, y en forma de espaciador tras el primer tiempo de un recambio en dos tiempos, pero aun

existe controversia sobre cuál es la dosis óptima de antibiótico a añadir (119, 204, 212, 267). Se recomiendan espaciadores articulados tras el primer tiempo de recambio tanto en rodilla como en cadera, habiéndose demostrado mejor recuperación funcional y propiciar mayor facilidad para la realización del segundo tiempo de recambio que los no articulados al disminuir el tiempo quirúrgico y el sangrado perioperatorio (108, 212). Además, debemos tener en cuenta que en muchos casos las comorbilidades del paciente impiden la realización del segundo tiempo de la cirugía y el espaciador se convierte en el implante definitivo siendo primordial en esta situación la mayor funcionalidad posible de la extremidad (39, 58). Aún así, se describen dos situaciones en el recambio de una prótesis de rodilla en las que la implantación de un espaciador estático podría ofrecer ventajas frente a uno articulado al disminuir el riesgo de luxación perioperatoria de la articulación: cuando exista una pérdida masiva de hueso y ante la presencia de un aparato extensor incompetente (7).

El uso del espaciador como elemento de interposición en la articulación no esta exento de complicaciones. Se ha descrito una frecuencia de luxación del 0-20% en función de la serie consultada (61, 261, 283), una frecuencia de fractura periespaciador de 0,7% en la cadera, 6,8% en la tibia y 2,3% en la porción femoral de una sustitución de rodilla (316), una baja frecuencia de protrusión acetabular (0-0,7%) y una tasa de rotura del espaciador del 8,6% en aquellos localizados en la cadera y 1,7% en los localizados en la rodilla (67, 70, 280, 299).

Los espaciadores de cemento pueden clasificarse en preconformados o aquellos preparados por el cirujano. Los primeros han demostrado disminuir el tiempo quirúrgico y las propiedades farmacocinéticas del antibiótico que contienen son más reproducibles, pero son más caros, no permiten individualizar el régimen antibiótico y no han demostrado un perfil de liberación de antibiótico superior al de los “hechos a mano” por

el cirujano (212, 267). Por otro lado, los espaciadores hechos por el cirujano permiten mayor flexibilidad para la elección del antibiótico a añadir y la concentración del mismo, permitiendo un tratamiento individualizado de la PJI en función de los resultados del antibiograma. Como desventaja, estos espaciadores asocian mayor riesgo de luxación y rotura que los preconformados (7). En la figura 6 pueden observarse ejemplos de espaciadores hechos por cirujanos en distintas localizaciones.

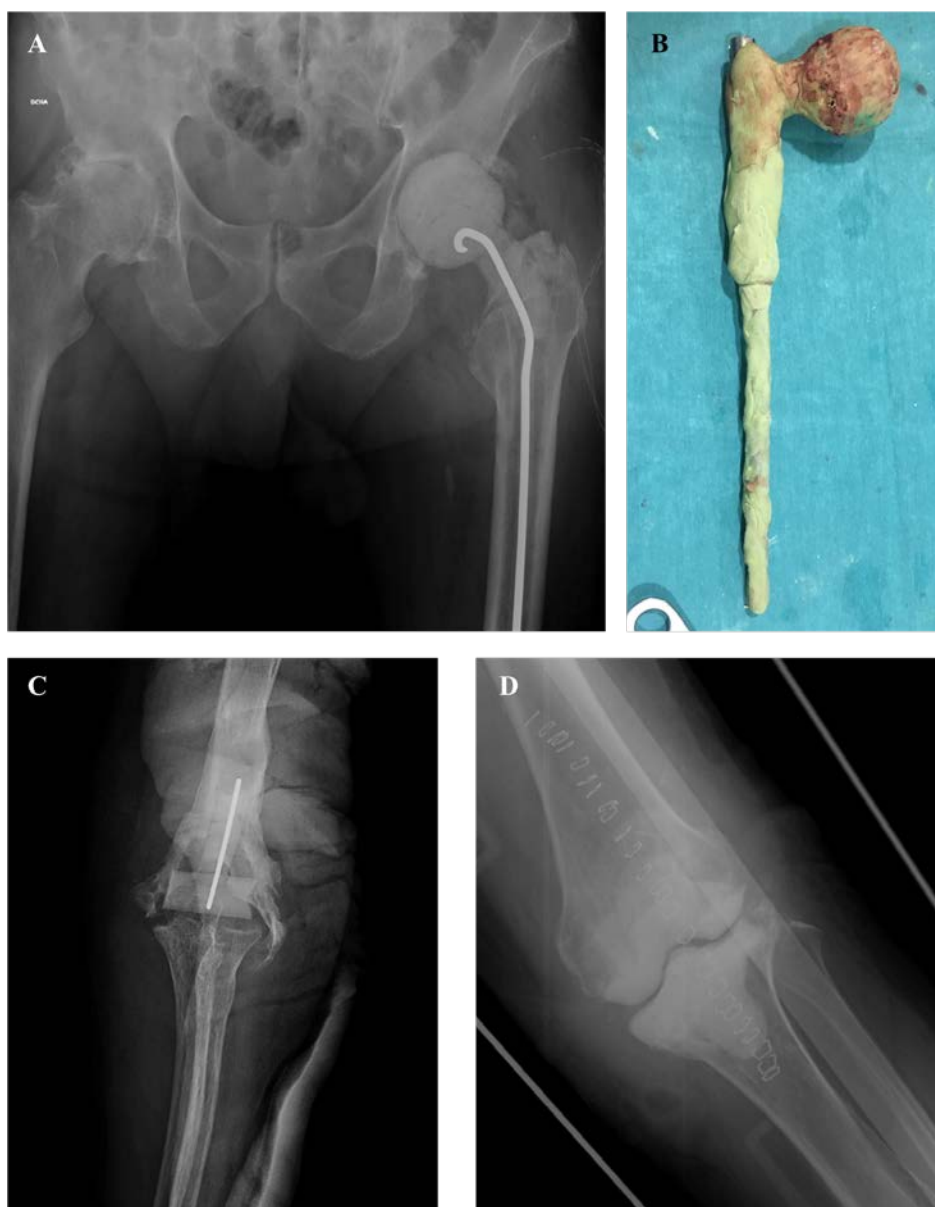


Figura 6: Espaciadores con antibiótico “hechos a mano”. A) cadera con alma de clavo rush, B) cadera tomando con alma de clavo Gamma, C) codo con una aguja de Kirschner para fijar el componentes vertical y horizontal y D) rodilla.

2. 2. 3. Cemento óseo como vehículo para la liberación de antibióticos

La idea del cemento óseo como vehículo para la liberación de intra-articular de antibióticos se remonta a 1970, cuando Buchholz y Engelbrecht consideran la gentamicina como el antibiótico de elección para su adición al cemento óseo por su actividad antimicrobiana de amplio espectro, su excelente solubilidad en agua, escasa alergenicidad y alta estabilidad térmica (25). Desde entonces, el cemento con antibiótico se establece como una estrategia eficaz en la profilaxis y tratamiento de las infecciones en cirugía ortopédica. A lo largo del tiempo se han intentado incluir diversos antibióticos en el cemento óseo con resultados dispares, llegando por ello a definirse las características que debe tener un antibiótico para considerarlo adecuado para su adición al cemento y que se encuentran resumidas en la tabla 5 (282, 303).

Hidrosoluble
Amplio espectro antibacteriano
Bactericida a bajas concentraciones
Baja tasa de desarrollo de resistencias
Baja incidencia de resistencias primarias
Liberación del PMMA a altas concentraciones durante largos periodos de tiempo
Termoestable
Estabilidad química al contacto con el monómero
Escasa influencia sobre las propiedades mecánicas del cemento
Bajo riesgo de alergenicidad e hipersensibilidad tardía
Baja unión a proteínas plasmáticas
No interacción con tejidos adyacentes (la tetraciclina se une al hueso)
Esterilizable y estable durante el almacenamiento
Tabla 5: Características del antibiótico recomendadas para considerarlo adecuado para su adición al cemento

Los aminoglicósidos (gentamicina y tobramicina) y glucopéptidos (vancomicina) han demostrado ser los dos grupos de antibióticos que mejor cumplen con estas características.

La **cinética de liberación del antibiótico** contenido en el cemento sigue una curva bifásica con una etapa inicial de liberación rápida de 24-72 horas de duración seguida por una fase de liberación continua más lenta que se mantiene durante días o meses (21, 267). La fase inicial depende de la liberación del antibiótico presente en la superficie del espaciador, habiéndose demostrado que a mayor superficie mayor es la liberación de antibiótico en esta fase (21). La segunda etapa de liberación continua depende del antibiótico presente en el núcleo del espaciador, por lo que el aumento de las concentraciones intra-articulares de antibiótico será directamente proporcional al aumento de porosidad del cemento una vez fraguado (183, 267, 297). Las características de las curvas de liberación de diferentes antibióticos a partir del cemento óseo se encuentran reflejadas en la figura 7.

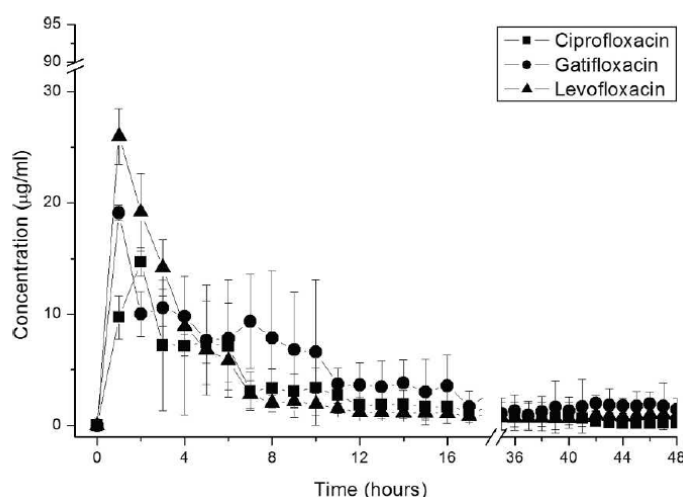


Figura 7: Curva bifásica de liberación in vitro de ciprofloxacino, gatifloxacino y levofloxacino. De Anguita-Alonso et al, 2006 (10).

Podemos incrementar la porosidad del cemento una vez fraguado mediante dos estrategias: aumentando la concentración de antibiótico en el cemento o mediante la

combinación de antibióticos. Debe tenerse especial cuidado al aumentar las concentraciones de antibiótico porque se ha demostrado que aquellas concentraciones que superan los 4,5g por cada 40g de PMMA alteran las propiedades mecánicas del espaciador aumentando el riesgo de rotura (119, 144). Además, una vez que se alcanza la CMI el incremento en la concentración intra-articular de antibiótico no se traduce en un aumento de su actividad. Respecto a la adición de un segundo antibiótico, es frecuente que el perfil de sensibilidad del microorganismo aislado en una PJI requiera la combinación de antibióticos para su tratamiento, obteniéndose así cementos enriquecidos con dos antibióticos que amplían el espectro de acción microbiológica y también modifican la cinética de liberación. Se han descrito combinaciones de antibióticos que no producen cambios en las concentraciones intra-articulares totales (amikacina-vancomicina) y combinaciones con acción sinérgica que aumentan la liberación desde el cemento. Este efecto sinérgico se denomina “oportunisto pasivo” y obedece a que el segundo antibiótico parece actuar como un aditivo soluble aumentando la porosidad del cemento y con ello la liberación del primer antibiótico o de ambos (8, 16, 180, 218, 222). Las combinaciones de antibióticos y su efecto en la concentración intra-articular de los mismos se encuentran reflejadas en la tabla 6.

Combinación	Efecto
Gentamicina-teicoplanina	Aumenta la concentración gentamicina
Gentamicina-clindamicina	Aumenta la concentración de gentamicina
Gentamicina-linezolid	Aumenta la concentración de linezolid
Gentamicina-vancomicina	Aumenta la concentración de gentamicina
Vancomicina-tobramicina	Aumenta la concentración de ambas
Vancomicina-meropenem	Aumenta la concentración de vancomicina
Vancomicina-cefazolina	Aumenta la concentración de vancomicina

Tabla 6: Combinaciones sinérgicas de antibióticos y su efecto.

Existen **cementos comercializados** que incluyen antibióticos en su formulación. Como ventajas frente a la preparación manual de la mezcla han demostrado ofrecer una distribución más uniforme del antibiótico en la fase polvo y cinéticas de liberación del antibiótico reproducibles con mayor liberación total manteniendo las propiedades mecánicas del cemento (196, 282). En el mercado encontramos presentaciones de cemento con gentamicina, gentamicina asociada a clindamicina, vancomicina, vancomicina asociada a gentamicina y eritromicina asociada a colistina. La adición de cualquier otro antibiótico debe hacerse de forma manual. Para ello, debemos contar con un antibiótico con presentación en polvo que se mezclará con la fase polvo del cemento. No deben emplearse presentaciones líquidas porque la presencia de agua interfiere con la reacción de polimerización y tampoco debe mezclarse el antibiótico con la fase líquida del cemento porque ha demostrado disminuir a la mitad la resistencia mecánica del producto fraguado (245, 251). El mezclado debe hacerse de forma manual intentando conseguir una mezcla homogénea y evitando el mezclado al vacío, porque al disminuir el número y cantidad de inclusiones aéreas disminuye la porosidad del cemento y la con ello la tasa de liberación de antibiótico en un 50% (8, 222).

Se acepta que cuando se emplean cementos con antibiótico con finalidad profiláctica pueden emplearse aquellos con dosis bajas de antibiótico, es decir, $\leq 1\text{g}$ de antibiótico por cada 40g de PMMA pero cuando la finalidad del cemento es el tratamiento de la PJI las dosis deben ser mayores (8). Actualmente, se considera que la combinación de un glicopéptido con un aminoglucósido es de elección para su adición al cemento óseo y el tratamiento de la PJI. Así, el cemento puede enriquecerse con vancomicina (1-4g por cada 40g de cemento) y gentamicina o tobramicina (2,4-4,8g por cada 40g de cemento). Otros antibióticos adecuados para ser incorporados al cemento óseo y sus dosis se encuentran detallados en la tabla 7.

ANTIBIÓTICO	GRUPO	ACTIVIDAD	DOSIS por 40g PMMA
Tobramicina	Aminoglucósido	Gram negativos (Pseudomona)	1-4,8g
Gentamicina	Aminoglucósido	Gram negativos (Pseudomona, E. coli, Klebsiella). Aerobios y anaerobios facultativos	0,25-4,8g
Cefazolina	Cefalosporina 1ª generación	Gram positivos	1-2g
Cefuroxima	Cefalosporina 2ª generación	Gram positivos y negativos	1,5-2g
Ceftazicima	Cefalosporina 3ª generación	Gram negativos (Pseudomona)	2g
Cefotaxima	Cefalosporina 4ª generación	Gram negativos, no Pseudomonas	2g
Ceftarolina	Cefalosporina 5ª generación		2-4g
Ciprofloxacino	Quinolona	Gram positivos y enterobacterias	0,2-3g
Vancomicina	Glicopéptido	Gram positivas y meticilin-resistentes	0,5-4g
Clindamicina	Lincosamina	Cocos Gram positivos, anaerobios	1-2g
Eritromicina	Macrólido	Cocos y bacilos Gram positivos aerobios	0,5-1g
Colistina	Polimixina	Gram negativos	0,24g
Piperacilina- sulbactam	β-lactámico	Gram negativos (enterobacterias y anaerobios)	4-8g
Aztreonan		Gram negativos	4g
Tazobactam	Inhibidor β-lactámase	Gram negativos (Pseudomona) Enterobacterias y anaerobios en combinación con piperacilina	0,5g
Linezolid	Oxazolidindiona	Gram positivos multi-resistentes (MRSA)	1,2g
Meropenem	Carbapenémico	Gram positivos, gram negativos, Pseudomona y anaerobios.	0,5-4g
Daptomicina	Lipopéptido	Gram positivos	2g

Tabla 7: Antibióticos disponibles para ser añadidos al cemento óseo.

La principal ventaja del uso del cemento óseo como sistema de liberación de antibióticos es que permite alcanzar concentraciones intra-articulares muy elevadas minimizando su toxicidad sistémica y, con ello, la aparición de efectos secundarios que podrían obligar a la interrupción del tratamiento. Aunque la absorción sistémica del antibiótico existe y en algunos casos persiste hasta 8 semanas desde la colocación del espaciador, la tasa de complicaciones sistémicas es muy baja, encontrándose casos aislados en la literatura (65). El fracaso renal agudo parece ser la complicación mejor relacionada con el uso de espaciadores con aminoglucósidos (116). Se ha descrito con dosis de gentamicina de 2g por 40g de PMMA, con rosarios de gentamicina (dosis total de 0,945g) y con la asociación de tobramicina y vancomicina (217, 298). En todos los casos se trató de pacientes mayores de 75 años y la extracción del espaciador supuso la recuperación de la función renal y el descenso de las concentraciones plasmáticas de antibiótico. Se han descrito otras complicaciones relacionadas con la liberación intra-articular de antibióticos pero la fuerza de la asociación es pobre, dado que muchos de los efectos secundarios remitían con la suspensión de la antibioterapia intravenosa o la antibioterapia intravenosa no se encontraba detallada en el estudio. Así, encontramos casos de fallo hepático y aplasia medular en relación al uso de espaciadores con gentamicina (1g) y vancomicina (1g) por 40g de PMMA, fracaso renal agudo asociado a espaciadores con 2-3g de vancomicina por 40g de PMMA y reacciones de hipersensibilidad asociadas a espaciadores con 1g tobramicina y 1g de vancomicina por 40g de PMMA (30, 113, 135).

2. 2. 4. Problemas de la adición de rifampicina al cemento óseo

Previamente se ha comentado la importancia de la rifampicina en el tratamiento de todas aquellas infecciones perioprotésicas de origen estafilocócico, considerándose la base de todo protocolo terapéutico por su actividad sobre las bacterias en fase estacionaria y su capacidad de difusión en el biofilm (134, 166, 234). Estas características hicieron que se investigase su comportamiento al incluirla en el cemento óseo con el objetivo de conseguir altas concentraciones intra-articulares de rifampicina para el tratamiento de la PJI. Los primeros estudios fiables datan de 2006, cuando Anguita-Alonso et al analizan las curvas de liberación de diferentes antibióticos in vitro. Estos autores definen una curva de liberación bifásica de la rifampicina con un pico de liberación in vitro a las 24 horas que superaba la CMI estafilocócica (figura 8). Durante sus ensayos describen una anomalía en el fraguado del PMMA cuando se añadía este antibiótico, dando lugar a un cemento de fraguado incompleto (10).

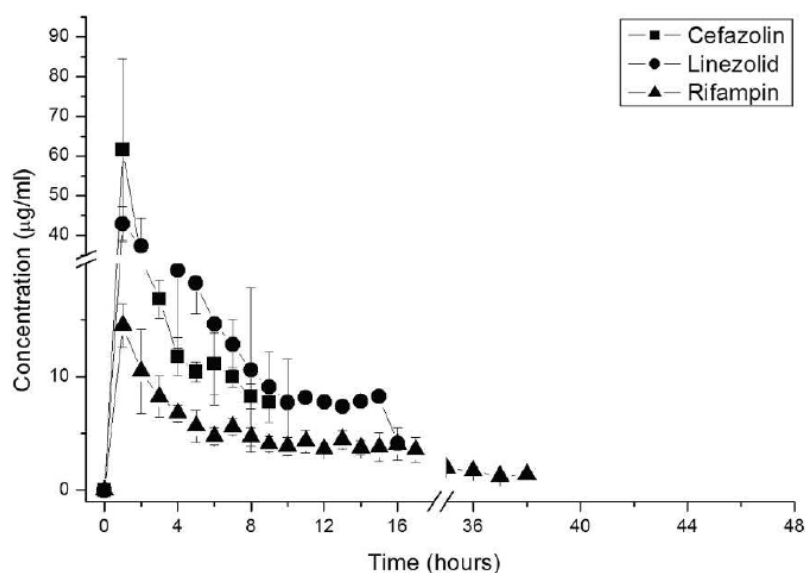


Figura 8: Perfil de liberación de rifampicina. Anguita-Alonso et al, 2006 (10).

Esta alteración de la polimerización del PMMA cuando se asocia a rifampicina parece deberse a que este antibiótico actúa “secuestrando” los radicales libres generados por el peróxido de benzoilo disminuyendo la activación del DmpT, pero el mecanismo exacto de la interferencia es aun desconocido. Esta interacción tiene dos efectos: modifica el proceso de fraguado y hace que la concentración máxima de rifampicina liberada en la fase pico sea menor que la de otros antibióticos, como se aprecia en la figura 8, pero sigue encontrándose por encima de la concentración mínima inhibitoria para los estafilococos (0,01-0,02 μ g/mL) (260). Distintos estudios in vitro han demostrado que la modificación del proceso de fraguado del PMMA depende de la concentración de rifampicina añadida al cemento óseo. Así, concentraciones del 10% dan lugar a un cemento de fraguado incompleto que sigue siendo dúctil tras 1 hora a temperatura ambiente y a un cemento fraguado pero elástico tras 2 horas en las mismas condiciones ambientales. La disminución de la concentración de rifamicina al 2% y 4% da como resultado un cemento fraguado pero elástico tras 1 hora a temperatura ambiente (241, 260).

La evaluación de las propiedades mecánicas de los cementos acrílicos debe realizarse siguiendo las normas ISO 5833:2002 y ASTM F451 que definen como requisitos mínimos una resistencia a la compresión ≥ 70 MPa, un módulo de flexión ≥ 1800 MPa y una resistencia a la flexión ≥ 50 MPa. Diversas publicaciones referentes a la adición de rifampicina al cemento óseo no han conseguido superar los 43MPa de resistencia a la compresión, por lo que no puede considerarse como óptimo para su aplicación en la práctica clínica en forma de espaciador (81).

Nuestro equipo de investigación diseñó en 2016 un cemento óseo con rifampicina microencapsulada, lo que permitió mantener las propiedades mecánicas del PMMA por encima de lo requerido por las normativas internacionales (ISO y ASTM) y

obtener un tiempo de fraguado cercano al PMMA sin antibiótico. Además, la liberación de rifampicina contenida en dicho cemento consiguió superar niveles bactericidas in vitro, del orden de 10-100 veces superior a la CMI para *Staphylococcus aureus*, sin afectarse dichas propiedades por la reacción exotérmica asociada a la polimerización (32, 33, 244).

2. 3. MICROCÁPSULAS PARA LA LIBERACIÓN PROLONGADA DE ANTIBIÓTICOS

La **microencapsulación** se puede definir como una tecnología mediante la cual se combinan sólidos, líquidos o gases con materiales transportadores con propiedades cohesivas y adhesivas dando lugar a pequeñas partículas de flujo libre con tamaños que varían de 1 a 1000 μ m y en las que el material transportador aísla al material que transportado del entorno. La microencapsulación de fármacos tiene como objetivos evitar su degradación por agentes medioambientales durante su conservación, separar fármacos incompatibles dentro de una misma formulación y controlar la velocidad de liberación del fármaco una vez administrado con el fin de mantener en el tiempo las concentraciones eficaces y prolongar la duración del efecto.

El producto de la microencapsulación recibe el nombre general de micropartícula, aunque según la disposición de material transportador y el fármaco transportado o encapsulado se diferencian dos tipos de estructuras (figura 9):

- Microcápsulas: el material transportador forma una cubierta que rodea al fármaco, que se localiza en la parte central o núcleo de la partícula.
- Microesferas: el fármaco queda disperso por todo el material transportador formando una matriz en la que no se diferencian núcleo y cubierta.



Figura 9: Estructuras tipo microcápsula (izquierda) y microesfera (derecha).

La **microencapsulación de antibióticos** tiene como objetivo principal evitar su liberación inmediata una vez administrados, permitiendo la liberación prolongada en el

tiempo. Así el mantenimiento de niveles plasmáticos eficaces durante periodos largos de tiempo permite aumentar los intervalos de dosificación. En una administración sistémica se sustituirán los perfiles plasmáticos en “diente de sierra”, característicos de las dosis múltiples, por perfiles con pocas fluctuaciones en el tiempo, reduciendo los efectos secundarios (figura 10). Ambas ventajas conducen a un mejor cumplimiento de los regímenes de dosificación por parte de los pacientes y a una mayor efectividad de los tratamientos.

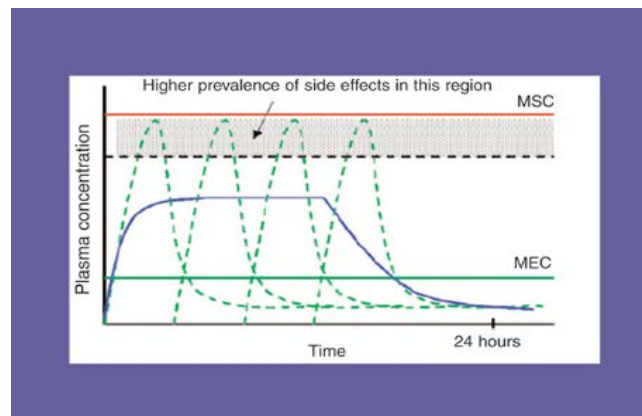


Figura 10: Representación de los niveles plasmáticos de un fármaco administrado en dosis múltiples (---) y en micropartículas de liberación prolongada (—). MEC: concentración mínima eficaz; MSC: concentración máxima segura.

Así, la administración de microcápsulas para la liberación local de antibióticos proporciona niveles del fármaco superiores a la CME en el lugar de la infección durante prolongados periodos de tiempo, con escaso o nulo acceso al torrente circulatorio evitándose su paso sistémico y, por ello, los efectos secundarios (249, 323).

Los materiales utilizados para elaborar micropartículas de liberación prolongada de antibióticos han de ser biocompatibles y biodegradables. Se trata habitualmente de materiales poliméricos que pueden ser de origen natural o de origen sintético. Dentro de los polímeros naturales se incluyen polisacáridos como el quitosano, alginato, dextrano

o el ácido hialurónico; polipéptidos como la albúmina o la gelatina, y algún poliéster de origen microbiano como el poli 3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato (PHBV). Dentro de los polímeros sintéticos, los más utilizados son los poli- α -hidroxiácidos, entre los que se encuentran el poliláctico (PLA), el poliglicólico (PGA), sus copolímeros (PLGA) y la policaprolactona (PCL) (71, 253, 323). Además de estos materiales poliméricos, micropartículas de metales como Ag, Cu, CuO, TiO₂, SiO₂, MgO y ZnO también se han investigado como transportadores de antibióticos, siendo de especial interés las micropartículas de plata dada su actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus* (41).

La liberación de los antibióticos microencapsulados utilizando estos materiales transportadores se produce bien por difusión a través de la estructura polimérica, por bioerosión del sistema o, más frecuentemente, por un mecanismo mixto difusión-bioerosión, siendo predominante la difusión en el caso de moléculas pequeñas e hidrófilas, y la bioerosión en el caso de moléculas grandes e hidrófobas.

Existen pocos ejemplos en la bibliografía de desarrollo de micropartículas de antibióticos buscando un efecto sistémico, encontrándose referencias a la microencapsulación de amoxicilina, cefalexina, eritromicina y ceftiofut (117, 151, 169, 247, 301). Las micropartículas con antibióticos se emplean, principalmente, buscando un efecto local, siendo administradas por vía inhalatoria para el tratamiento de infecciones pulmonares, tópica para el tratamiento de la candidiasis vaginal, vía oral para el tratamiento de infecciones gastrointestinales e inyectables para la profilaxis de la infección quirúrgica ocular. En la tabla 8 se encuentran reflejados algunos ejemplos antibióticos microencapsulados para el tratamiento local de infecciones.

Fuente	Antibiótico	Uso clínico	Vía
Dimer et al ⁽⁵⁹⁾	Claritromicina	Neumonía por <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	Inhalatoria
Wang et al ⁽³⁰⁷⁾	Azitromicina	Neumonía	Inhalatoria
Li et al ⁽¹⁵⁶⁾	Eritromicina	Neumonía	Inhalatoria
Patil et al ⁽²¹⁶⁾ Hickey et al ⁽¹⁰²⁾	Rifampicina Capreomicina Isoniacida Kanamicina Ofloxacino Rapamicina	Tuberculosis pulmonar	Inhalatoria
Johal et al ⁽¹²⁰⁾	Metronidazol Clotrimazol	Candidiasis vaginal	Tópica
Hachicha et al ⁽⁹⁶⁾	Vancomicina	Profilaxis infección herida quirúrgica	Intraocular
Hao et al ⁽⁹⁸⁾	Amoxicilina	<i>H. pylori</i>	Oral
Aguero et al ⁽⁴⁾	Cefotaxima	Colitis ulcerosa, Crohn	Oral
Tabla 8: Antibióticos microencapsulados para el tratamiento de infecciones locales			

Uno de los campos donde más interés y desarrollo está teniendo la microencapsulación de antibióticos es en la prevención y tratamiento de infecciones óseas.

2. 3. 1. Microcápsulas de antibióticos para profilaxis y tratamiento de infecciones en traumatología

Un sistema ideal de administración de antibióticos para la profilaxis y tratamiento de infecciones en cirugía ortopédica y traumatología debe proporcionar una concentración antimicrobiana bactericida a nivel local y una liberación lenta y constante

del antimicrobiano durante un período prolongado. Se considera importante que sea un sistema biodegradable, evitándose la extracción quirúrgica una vez que ha ejercido su acción. Como se ha comentado previamente, la administración sistémica de antibióticos para el tratamiento de infecciones óseas y articulares presenta tres importantes limitaciones:

- Bajas concentraciones en el lugar de la infección que obliga a utilizar altas dosis para alcanzar niveles locales eficaces. Como consecuencia aumenta la incidencia de efectos secundarios.
- Rápida caída de las concentraciones plasmáticas hasta niveles subterapéuticos lo que obliga a cortos intervalos de dosificación, incómodos para el paciente y asociados a altas tasas de incumplimiento.
- Desarrollo de resistencias microbianas asociadas a concentraciones por debajo de la CMI en el lugar de la infección.

Mediante la incorporación de antibióticos específicos en el cemento óseo se consigue una liberación local, reduciéndose significativamente la toxicidad sistémica, pero no se consiguen perfiles de liberación reproducibles y lo suficientemente prolongados en el tiempo como para no tener que seguir requiriendo la administración sistémica de antibióticos. Además, como se ha explicado previamente, existen limitaciones a la hora de incorporar determinados antibióticos al cemento óseo por el riesgo de interferir negativamente en las propiedades mecánicas o fraguado del mismo. La incorporación de antibióticos microencapsulados a estos productos sanitarios es una forma eficaz de modular las concentraciones de fármaco a nivel local manteniéndolas por encima de la CMI, reduciéndose el riesgo de aparición de resistencias, y durante un

periodo de tiempo lo suficientemente largo como para poder prescindir de la administración sistémica del antibiótico.

La **vancomicina** se ha utilizado con frecuencia como antibiótico modelo en aplicaciones relacionadas con nuestra especialidad ya que es un antibiótico de amplio espectro usado ampliamente en dispositivos óseos y protésicos principalmente como profilaxis de infecciones bacterianas Gram-positivas. Junto con la gentamicina, son los antibióticos que más se han microencapsulado con el objetivo de prevenir o tratar infecciones óseas. Los trabajos de Ueng et al (293-295) demuestran la eficacia in vivo de la vancomicina microencapsulada en el tratamiento de osteomielitis por *S. aureus* en conejos, encontrando niveles superiores a la CMI durante un mínimo de 21 días y sin detectarse efectos secundarios a nivel renal. Además, se han diseñado cementos óseos que incluyen antibióticos de última generación (daptomicina o linezolid) en combinación con vancomicina contenidos en micropartículas de ácido poli (D, L-láctico-co-glicólico), consiguiéndose una liberación prolongada de los antibióticos durante dos meses. Se ha verificado la eficacia de estos cementos frente a *S. aureus*, y la biocompatibilidad con osteoblastos humanos, de manera que las formulaciones desarrolladas se proponen como herramienta terapéutica en el recambio en dos tiempos (210).

Pueden encontrarse numerosos estudios in vitro en los que se verifica la liberación sostenida de **gentamicina** incorporada en microesferas diferentes polímeros biodegradables manteniéndose concentraciones superiores a la CMI de *S. aureus* durante al menos 12 semanas (60, 305).

2. 3. 2. Microcápsulas de rifampicina elaboradas con alginato para el tratamiento de la infección periprotésica

La introducción de las primeras microcápsulas enriquecidas con antibióticos en el PMMA data de 2010, cuando Shi et al introducen colistina en microesferas de PLGA y las añaden al cemento óseo para prevenir las infecciones por *Acinetobacter* tras traumatismos craneoencefálicos con pérdida de masa ósea (258). Pero no es hasta 2016, cuando nuestro equipo de investigación emplea esta estrategia de vehiculización de fármacos a la rifampicina, con la finalidad de mantenerla aislada del cemento óseo durante la fase de polimerización del mismo, permitiendo obtener un cemento con características mecánicas adecuadas para su uso clínico (244). Al utilizar el cemento cargado con microcápsulas de rifampicina se consigue que la reacción exotérmica secundaria a la polimerización altere las propiedades físicas de las microcápsulas, aumentando el tamaño de su poro y permitiendo la liberación de la rifampicina sobre el cemento ya fraguado.

2. 3. 2. 1. Síntesis y caracterización de microcápsulas con rifampicina

Para la fabricación de las microcápsulas de rifampicina se empleó la fracción en polvo de Rifaldin 600mg inyectable i.v. (Sanofi, Barcelona, España), que constituirá el núcleo, y como componente de la cubierta se empleó alginato sódico. La microencapsulación se realizó mediante la técnica de gelificación iónica (figura 11). Así, se suspendió la rifampicina a microencapsular en una solución acuosa de alginato sódico añadiendo esta suspensión mediante goteo sobre una solución acuosa de cloruro de calcio sometida a una velocidad de agitación adecuada. Al entrar en contacto el

alginato sódico con el calcio se produce un intercambio de iones que da lugar a alginato cálcico, que gelifica formando la cubierta rodeando las partículas de rifampicina, y cloruro sódico que permanece en disolución. Esta membrana de alginato cálcico es insoluble en agua pero permeable.

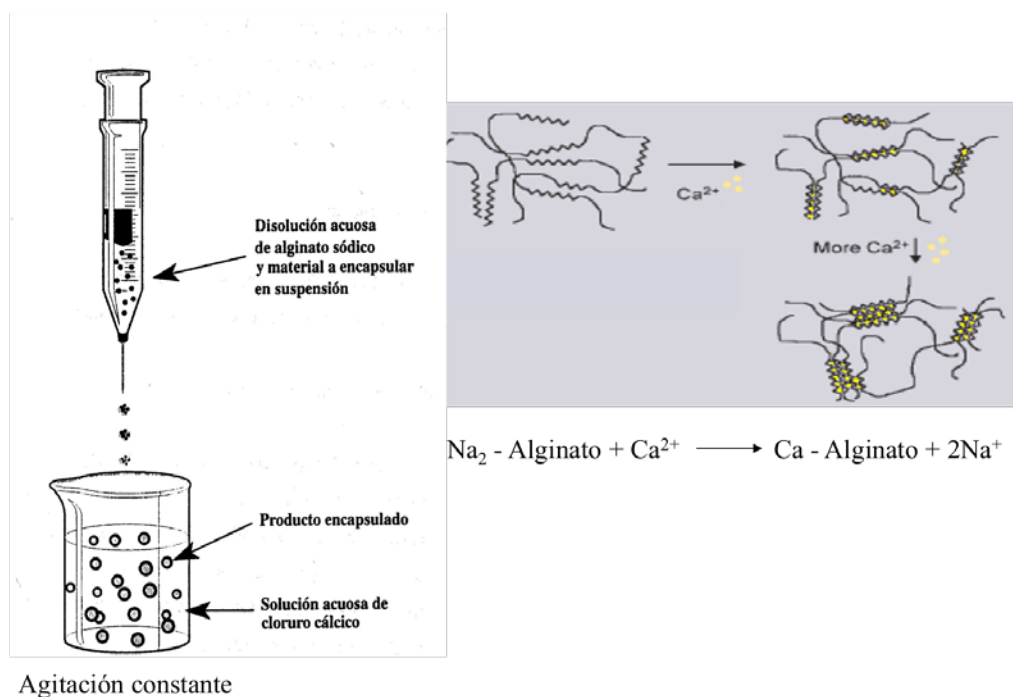


Figura 11: Microencapsulación por gelificación iónica de alginato

El análisis por espectrofotometría ultravioleta deermiñó una carga de 9,73µg de rifampicina/g de microcápsulas, lo que supuso una eficacia de microencapsulación (cociente entre la rifampicina total encapsulada y la rifampicina de partida) del 60,03% (168, 244). Las microcápsulas de rifampicina se añadieron al cemento óseo en una proporción del 5% (2g de microcápsulas por 40g de PMMA), siguiendo las indicaciones de Frommelt para el mezclado de los componentes y se crearon cilindros de cemento de 6mm de diámetro y 12mm de alto (79). Con estos cilindros se determinó la cinética de liberación de la rifampicina a partir del cemento, utilizando PBS como medio de cesión, y se obtuvieron los resultados de la tabla 9.

	6 horas	24 horas	48 horas	1 semana
CC (µg/mL)	1,96	2,45	1,25	3,43
DE	1,52	1,45	0,98	2,53

Tabla 9: Concentración de rifampicina liberada de las microcápsulas a las 6, 24 y 48 horas y a la semana. CC: concentración; DE: desviación estándar.

En todos los casos la concentración de rifampicina detectada se encontraba por encima de la CMI para estafilococos.

2. 3. 2. 2. Propiedades mecánicas y antimicrobianas

Tras definirse la capacidad de liberación de rifampicina por parte de las microcápsulas incluídas en el cemento se procedió a la demostración de las características mecánicas del mismo, según los requerimientos de la norma ISO5833:2002. El cumplimiento de estas características es imprescindible para considerar el cemento como útil para la conformación de espaciadores en la práctica clínica habitual. De esta forma se realizaron ensayos de flexión, compresión y dureza. Para los ensayos de flexión se fraguó el cemento con microcápsulas de rifampicina en moldes de 80mm x 10mm x 4mm y se sometió a una carga de 5kN a una velocidad de ensayo de 5mm/min. Para los ensayos de compresión se fraguó el cemento en forma de moldes cilíndricos de 6mm de diámetro y 12mm de alto y se sometieron a una carga de 20kN a una velocidad de 20mm/min. Para los ensayos de dureza se empleó una carga de 50N y se midió el tiempo de fraguado. Los resultados de estas muestras de cemento con rifampicina microencapsulada se compararon con muestras de cemento con rifampicina sin microencapsular en todos los ensayos previamente descritos y se encuentran resumidos en la tabla 10.

	ISO 5833:2002	PMMA + RIF	PMMA + RIF microencapsulada
Resistencia a la compresión (MPa)	≥ 70	74,04±3,57	91,35±6,29
Módulo de elasticidad (MPa)	≥ 1800	954±279	2158±195
Tiempo de fraguado (min)		45	15*

Tabla 10: Características mecánicas del cemento con microcápsulas de rifampicina comparado con los estándares ISO 5833:2002 y con cemento con rifampicina sin microencapsular. RIF: rifampicina. * Fraguado en el mismo tiempo que el cemento sin antibiótico.

Por último, se realizó la comprobación in vitro de la capacidad bactericida del cemento con microcápsulas de rifampicina para descartar que se produjese algún tipo de inactivación de la rifampicina contenida en las microcápsulas durante el proceso de gelificación iónica o durante la polimerización. Para ello se diseñaron discos de cemento con rifampicina microencapsulada de 12mm de diámetro y 2 milímetros de espesor que se colocaron en placas de Petri con Agar sangre previamente sembradas con 0,5 unidades MacFarland de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213TM. El halo de inhibición se midió con una regla calibrada y fue de 20,78±3,23mm (figura 12).

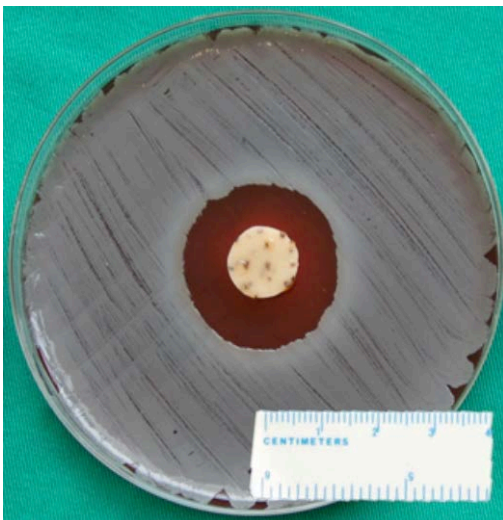


Figura 12: Halo de inhibición de un disco de cemento con rifampicina contenida en microcápsulas de alginato. De Carbó et al (32)

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. 1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los objetivos del presente estudio quedan determinados mediante las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis conceptuales (H₁)

El cemento con gentamicina al que se incorporan microcápsulas de rifampicina es más eficaz en el tratamiento de la infección periprotésica secundaria a *Staphylococcus aureus* in vivo que el cemento exclusivamente con gentamicina, presentando niveles intra-articulares eficaces y sin toxicidad sistémica relevante.

Hipótesis operativa (H₀)

El cemento con gentamicina al que se incorporan microcápsulas de rifampicina no es más eficaz que el cemento exclusivamente con gentamicina en el tratamiento de la infección periprotésica por *Staphylococcus aureus* in vivo.

El cemento con gentamicina al que se incorporan microcápsulas de rifampicina es más eficaz en el tratamiento de la infección periprotésica in vivo que el cemento exclusivamente con gentamicina pero asocia reacciones de toxicidad sistémica graves.

3. 2. OBJETIVOS

Objetivo principal

Evaluación in vivo de la eficacia antimicrobiana del cemento con microcápsulas de rifampicina en el tratamiento de la infección periprotésica por *Staphylococcus aureus*.

Objetivos secundarios

6. La definición de un modelo experimental de infección periprotésica
7. El diseño de implantes específicos de especie mediante impresión 3D
8. La consecución de la liberación de rifampicina intra-articular alcanzando niveles superiores a la CMI estafilocócica in vivo
9. La determinación mediante análisis microbiológicos de la superioridad del cemento con gentamicina y microcápsulas de rifampicina en el tratamiento de la infección periprotésica frente al cemento exclusivamente con gentamicina.
10. La demostración del adecuado perfil de seguridad in vivo de la rifampicina contenida en microcápsulas

4. MATERIAL Y MÉTODO

4. 1. DISEÑO DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL Y AUTORIZACIÓN DEL ESTUDIO POR LA AUTORIDAD COMPETENTE

El objetivo principal del presente apartado es realizar el diseño del protocolo experimental para conseguir su aprobación por la autoridad competente.

El material empleado para realizar este diseño fue el software Statgraphics Centurion XV® (Statgraphics Technologies, Inc. Warrenton, Virginia, USA)

El presente estudio corresponde a la fase preclínica del desarrollo del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina pretendiéndose definir, mediante el uso de un modelo animal, sus características farmacocinéticas, farmacodinámicas y toxicológicas.

Todo aquel proyecto que implique el empleo de animales debe estar autorizado por el Órgano Competente, en nuestro caso por el Área de Protección Animal de la Comunidad de Madrid. A continuación se encuentran detallados los puntos principales del protocolo experimental elaborado según las directrices del Artículo 33 del Real Decreto 53/2013.

➤ Determinación del número de animales, especie y etapa de la vida

Se consideraron necesarios 15 conejos New Zeland White adultos inmunocompetentes de al menos 3 kg de peso divididos en dos grupos de experimentación. En todos los animales se implantó una meseta tibial de acero

inoxidable diseñada mediante impresión 3D y fueron infectados con una cepa de *Staph. aureus* formadora de biofilm. Los dos grupos de experimentación se dividieron en:

- *Grupo R* (8 conejos): en el primer tiempo de recambio protésico se implantó un espaciador de cemento Palacos® R+G con microcápsulas de rifampicina.
- *Grupo C* (7 conejos): en el primer tiempo de recambio protésico se implantó un espaciador de cemento Palacos® R+G de uso habitual en la práctica clínica.

➤ **Condiciones de alojamiento, zootécnicas y de cuidado de los animales**

El centro de estabulación fue el Animalario de la Universidad Complutense de Madrid. Los animales se alojaron en jaulas individuales pero con contacto visual constante entre ellos. Se administró comida y agua ad libitum. La supervisión de los animales fue diaria durante las 7 semanas de duración del protocolo.

➤ **Procedimientos y definición de la severidad de los mismos**

En el artículo 33 del Real Decreto 53/2013 se define como procedimiento a la utilización invasiva o no invasiva de un animal para fines experimentales u otros fines científicos, cuyos resultados sean predecibles o impredecibles, o con fines educativos, siempre que dicha utilización pueda causarles un nivel de dolor, sufrimiento, angustia o daño prolongado, equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja conforme a la buena práctica veterinaria.

Procedimiento 1: Colocación de una meseta tibial cementada diseñada mediante impresión 3D e inoculación intra-articular de *Staphylococcus aureus*

Se realizó en todos los animales bajo anestesia general y en condiciones de asepsia. Implica la resección de la metafisis proximal de la tibia del conejo y preparación del canal medular para la colocación de un inserto de acero inoxidable diseñado por impresión 3D previa cementación del mismo con cemento Palacos® sin antibiótico. Tras el cierre de la artrotomía se inyectó 1mL con 10^5 CFU de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213® formador de biofilm. Este procedimiento se considera de severidad moderada.

Procedimiento 2: Extracción de sangre

Se realizó en todos los animales a través de la vena marginal de la oreja tras inmovilización en un cepo (figura 13 del anexo). La primera extracción se realizó a los 7-10 días de su llegada para permitir su correcta aclimatación. Se repitió a la semana de la inoculación del *Staph. aureus* para evaluar la alteración analítica secundaria a la infección. Posteriormente se repitieron las extracciones de sangre a los 4 días del primer tiempo de recambio protésico, y de forma semanal durante 4 semanas para monitorizar la evolución de los parámetros inflamatorios y valorar alteraciones analíticas hepáticas y renales secundarias a la toxicidad sistémica de la rifampicina. Este procedimiento se considera de severidad leve.

Procedimiento 3: Primer tiempo de recambio protésico

Se realizó en todos los animales bajo anestesia general y en condiciones de asepsia a la semana de la infección. Implicó la retirada del inserto metálico, toma de muestras intra-articulares (para su análisis microbiológico y definición de la infección) y colocación de un espaciador de cemento. En los animales del grupo C estaba compuesto por cemento Palacos® R+G de uso habitual en la práctica clínica. En los animales del grupo R el espaciador estaba compuesto por cemento Palacos® R+G con microcápsulas de rifampicina y se colocó, además, un drenaje intra-articular. Este procedimiento se considera de severidad moderada.

Procedimiento 4: Toma de muestras intra-articulares

Se realizó en los animales del grupo R a través del drenaje a las 6, 24 y 48 horas del primer tiempo de recambio. El objetivo fue la determinación de las concentraciones de rifampicina intra-articulares. A las 72 horas se retiró el drenaje intra-articular. Este procedimiento se considera de severidad leve.

Procedimiento 5: Eutanasia y toma de muestras

Se realizó en todos los animales a las 4 semanas del primer tiempo de recambio. Tras la eutanasia con pentobarbital sódico administrado por vía intravenosa se procedió a la toma de muestras intra-articulares para su análisis microbiológico y poder comparar las diferencias en el crecimiento bacteriano entre los dos grupos experimentales. Este procedimiento se clasifica como “sin recuperación”.

➤ **Criterios de punto final humanitario**

Se consideró la eutanasia anticipada del animal en el caso de que algún animal presente (190, 194):

- Enterotoxemia.
- Puntuación mayor de 9 en la escala de evaluación de la severidad del dolor (309). Para su definición se confeccionaron las siguientes tablas de valoración de la severidad del dolor específicas para nuestro protocolo experimental y las consiguientes hojas de recogida de datos individuales para cada animal (tabla 11 y tabla 12 en el Anexo). Se consideraron como valores de referencia aquellos determinados en el preoperatorio.

	Descripción	Puntuación
Peso corporal	Sin cambios	0
	<10% pérdida peso	1
	10-15% pérdida peso	2
	>20% pérdida peso	3
Consumo de agua y alimento	Normal	0
	<10-15% de alimento o agua	1
	Hasta 25% de alimento o agua	2
	≥25% de alimento o agua	3
Aspecto heces	Heces redondas en múltiples pilas. Volumen mayor a dos puñados	0
	Mezcla de heces redondas con heces blandas pobremente formadas. Volumen menor a 1 puñado	1
	Menos de 40 heces pobremente formadas	2
Respiración	Normal	0
	Respiración por la boca ocasional	1

	Respiración con la cabeza extendida, salivación	2
	Respiración con la cabeza extendida y por la boca, tiraje.	3
Postura	Normal (sentado/tumbado) con pelvis sobre el suelo	0
	Encorvado	1
	Encorvado con la cabeza en el suelo. Vocalizaciones	2
	Acostado de lado	3
Movimiento pata intervenida	Si	0
	No	1
Actividad	Normal, espontánea. Huida con proximidad humana.	0
	Disminuida, responden a estímulos umbrales	1
	Inactivo, menos alerta, responden a estímulos más intensos	2
	Automutilación, inmóvil, vocalizaciones	3
Acicalado	Piel y pelo limpio y ordenado	0
	Pelo erizado	1
	Pelo erizado, ralo y sucio	2
	Zonas de alopecia, piel y pelo sucios	3
Tabla 11: Escala de valoración de la severidad del dolor. La puntuación > 9 se considera indicación para la eutanasia anticipada del animal.		

Este protocolo experimental se presentó, en primer lugar, al Comité de Ética de la Universidad Complutense de Madrid, a la que pertenece el centro de cirugía experimental y estabulación y, una vez obtenido el informe favorable, al Área de Protección Animal de la Comunidad de Madrid

En el Anexo se incluyen las autorizaciones obtenidas (figuras 14 y 15).

4. 2. DISEÑO 3D DE MESETAS TIBIALES DE CONEJO Y ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA EXTREMIDAD

El objetivo principal del presente epígrafe es la obtención, mediante impresión 3D, de los insertos tibiales a implantar en la rodilla de los conejos que posteriormente serán infectados con *Staphylococcus aureus*.

Como objetivo secundario se plantea el estudio de la anatomía y biomecánica de la rodilla del conejo para definir el mejor abordaje quirúrgico a realizar para la colocación de los insertos tibiales.

Los materiales empleados para desarrollar este apartado se encuentran en la tabla 13:

- Acero inoxidable para impresión 3D (Shapeways HQ, NY, USA).
- Cámara de fotos Canon Power Shot SX240 HS® (Tokio, Japón)
- Impresora 3D BQ Witbox 2® (BQ, Madrid, España)
- Pata trasera derecha de conejo New Zeland White
- Pinzas de disección y bisturí
- Poliláctico para impresión 3D, SMARTFIL®PLA (Smart Materials 3D Printing S.L.U, Jaén, España)
- Software Autodesk® Meshmixer™ versión 3.1.373 para Mac ©2017 (Autodesk, Inc. San Rafael, CA, USA) de modelado en 3D.
- Software Horos® versión 2.3.0 para Mac ©2015 (Annapolis, MD, USA) de procesamiento de imagen DICOM.
- SuperArgus® PET/TC (SEDECAL-Sociedad Española de Electromedicina y Calidad S.A, Algete, Madrid, España)

Tabla 13: Materiales empleados para el diseño de mesetas tibiales de conejo y estudio morfológico de la extremidad

Para el diseño en 3D de las mesetas tibiales se empleó la pata derecha de un conejo macho New Zeland White (NZW) sin alteraciones musculoesqueléticas procedente de otro estudio ya finalizado. Para ello se procedió, tras la eutanasia del animal, a la desarticulación de la extremidad posterior a nivel de la cadera. Con la extremidad se realizó, en primer lugar, una Tomografía Axial Computerizada (TC) (figura 16), que se utilizó como modelo en el diseño 3D de las mesetas tibiales; y, posteriormente, se realizó un estudio anatómico y biomecánico de la rodilla con el fin de definir el abordaje quirúrgico del estudio in vivo descrito en el capítulo de resultados.

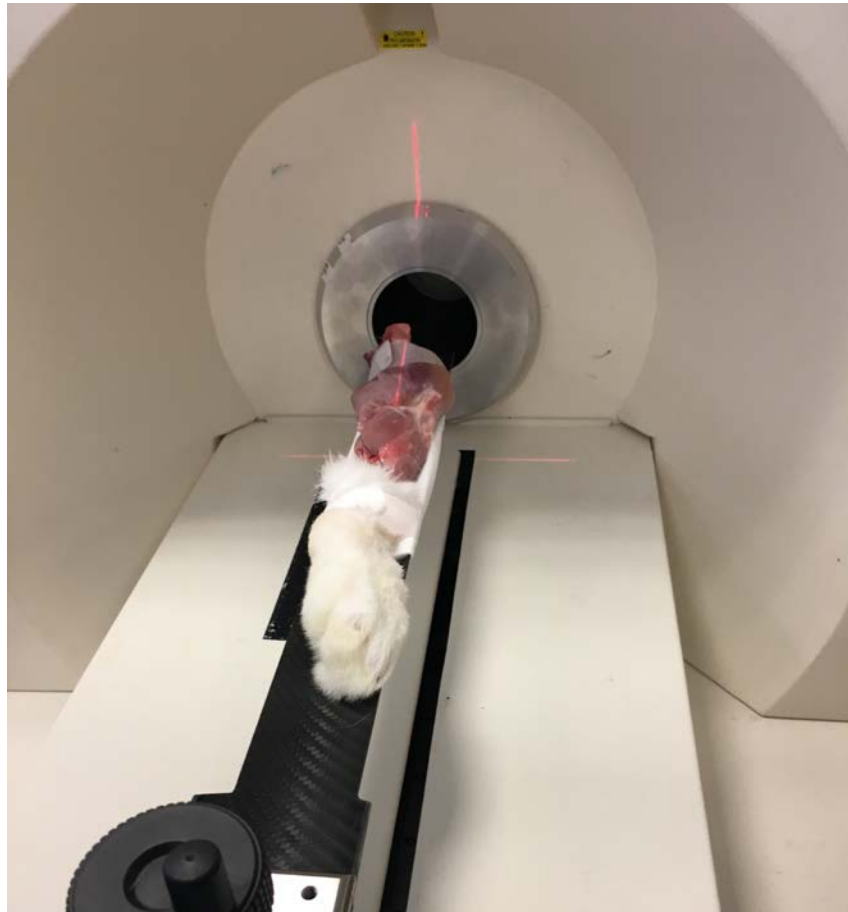


Figura 16: Realización de la TC de la pata de conejo

4. 2. 1. Diseño e impresión 3D de las mesetas tibiales de conejo.

Para la realización de la Tomografía Axial Computerizada (TC) que permitiese la reconstrucción de la anatomía de la rodilla del conejo se empleó el escáner SuperArgus PET/CT. Los parámetros de programación de la TC se encuentran reflejados en la tabla 14.

Rayos X:	
- Intensidad de corriente (μA)	340
- Voltaje (KV)	40
Número de proyecciones	360
Número de disparos por proyección	8
Tamaño de píxel en proyección (mm)	0,2 (Binning:4)
Factor magnificación	1,642
Tamaño del vóxel en reconstrucción (mm)	0,1218
Método de reconstrucción	FDK
Camas	2
Superposición (mm)	20
Tamaño del volumen reconstruido cama 1	512x512x574
Tamaño del volumen reconstruido cama 2	512x512x984
Número de imágenes	60
Tabla 14: Parámetros de programación TC. FDK: algoritmo de reconstrucción Feldkamp-Davis-Kress.	

Una vez obtenidas las imágenes DICOM de la TC, éstas se analizaron con el programa de procesamiento de imágenes Horos® con el fin de confeccionar la superficie tridimensional de la rodilla del conejo (69). Se realizó una segmentación inicial definiéndose como “Región de interés” (ROI) la superficie cortical de la metafisis tibial proximal. Para optimizar el aislamiento de las áreas de interés se estableció un valor de píxel cero para las regiones no incluidas en las ROI y un valor de

pixel 1000 para las ROI seleccionadas en todo el rango de dinámico de la imagen. Posteriormente se realizó un renderizado volumétrico 3D de las áreas seleccionadas con la mayor calidad, resolución 0,9 y un valor de pixel de 1000, mismo valor dado a las ROI. Posteriormente se empleó el programa Autodesk® Meshmixer™ para la generación del inserto tibial. Inicialmente se aisló la metáfisis tibial proximal del sesamoideo lateral y del peroné (12, 223). Tomando como plantilla el contorno de la superficie articular se diseñó un platillo tibial de 4mm de espesor y posteriormente el sistema de anclaje metafisario del inserto. Se decidió mantener el contorno de la superficie articular sin modificaciones para proporcionar una superficie rugosa que favoreciese la adhesión bacteriana (36). Se diseñaron diferentes prototipos de inserto tibial que se imprimieron en ácido poliláctico en las impresoras 3D de nuestro centro para descartar complicaciones en el proceso de impresión relacionadas con el diseño del implante. La impresión del inserto definitivo se realizó en acero inoxidable, dada la mayor afinidad bacteriana por este material en comparación con otros metales (11, 38, 48). La impresión en acero inoxidable se llevó a cabo por la empresa Shapeways HQ (NY, USA). En la figura 17 puede apreciarse todo el proceso de reconstrucción de la tibia del conejo.

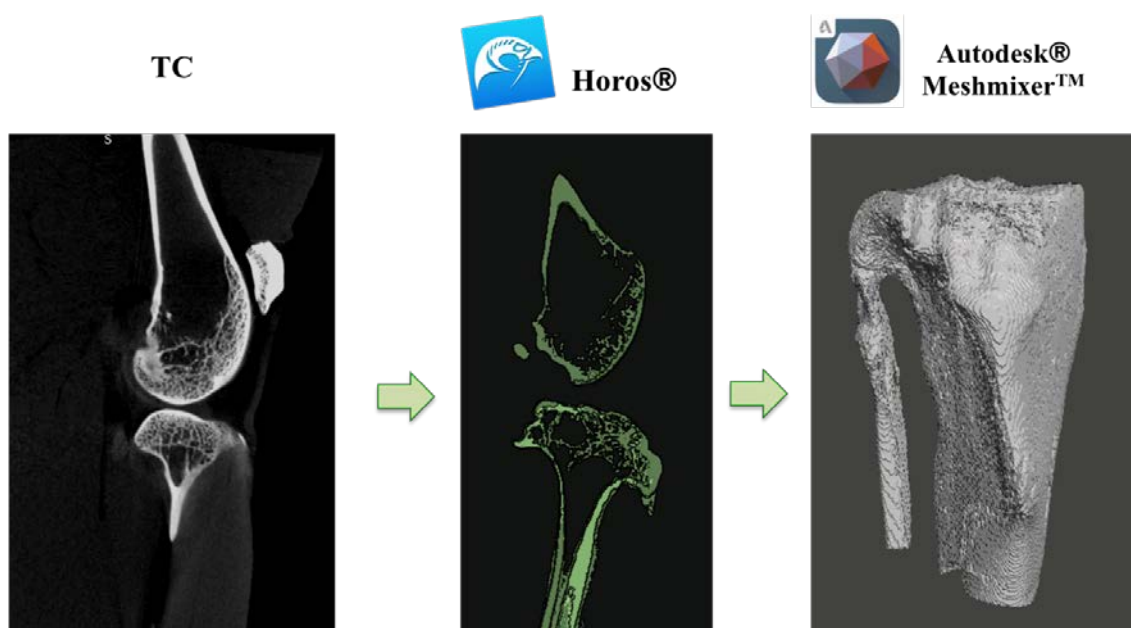


Figura 17: Proceso de reconstrucción de la meseta tibial del conejo a partir de la imagen DICOM de la TC (izquierda), definición de las ROIs (centro) en Horos® y generación de la estructura 3D (derecha) en Autodesk® Meshmixer™.

4. 2. 2. Estudio anatómico y biomecánico de la rodilla del conejo

Tras la realización de la TC se procedió a la disección de la pata del conejo siendo ésta la primera de toma de contacto con la anatomía de la rodilla del animal y facilitando así la posterior cirugía in vivo. La disección por planos permitió, a su vez, el análisis biomecánico de la articulación y determinar el abordaje quirúrgico a realizar.

La disección de la rodilla del conejo se realizó mediante un abordaje parapatelar medial, mostrando una articulación formada por fémur, tibia, patela, un sesamoideo tibial posterolateral (sesamoideo poplíteo) y dos sesamoideos femorales inmediatamente posteriores a cada uno de los cóndilos. La cara femoral, compuesta por dos cóndilos, presentaba una tróclea bien marcada y con amplia extensión proximal, llegando a suponer $\frac{1}{4}$ de la longitud total de dicho hueso. En el epicóndilo lateral se identificaron,

de posterior a anterior, la inserción del ligamento colateral peroneo, tendón poplíteo y el tendón del extensor largo de los dedos, este último con trayecto intra-articular (53). En el epicóndilo medial se identificó el origen del ligamento colateral medial, con inserción en la metáfisis tibial.

La metáfisis tibial proximal se encontró dividida en dos secciones: una posterior recubierta de cartílago y otra anterior en la que se encontró una tuberosidad tibial anterior (TTA) prominente y con amplia extensión distal (226). La porción articular estaba compuesta por dos platillos recubiertos por sendos meniscos en forma de “C” y presentaba una importante caída posterior. Entre ambos platillos se encontraron dos espinas tibiales y la inserción distal del ligamento cruzado anterior.

Como peculiaridades del aparato extensor cabe destacar la presencia de dos tendones bien diferenciados procedentes de los vastos lateral y medial con confluencia en el cuádriceps e inserción distal en la patela. El tendón rotuliano, con origen en el polo inferior de la rótula e inserción en toda la longitud de la prominente TTA presentó una longitud de 2cm y un Hoffa prominente fácilmente disecable.

Las estructuras anatómicas identificadas mediante un abordaje parapatelar medial pueden verse detalladas en las figuras 18 y 19.

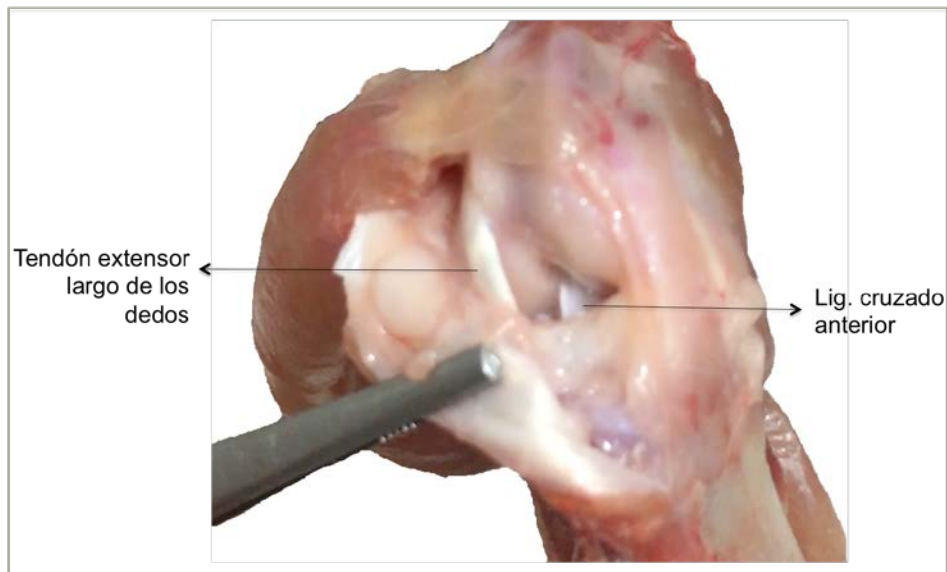


Figura 18: Rodilla derecha de conejo New Zeland White en flexión. Artrotomía parapatelar medial.

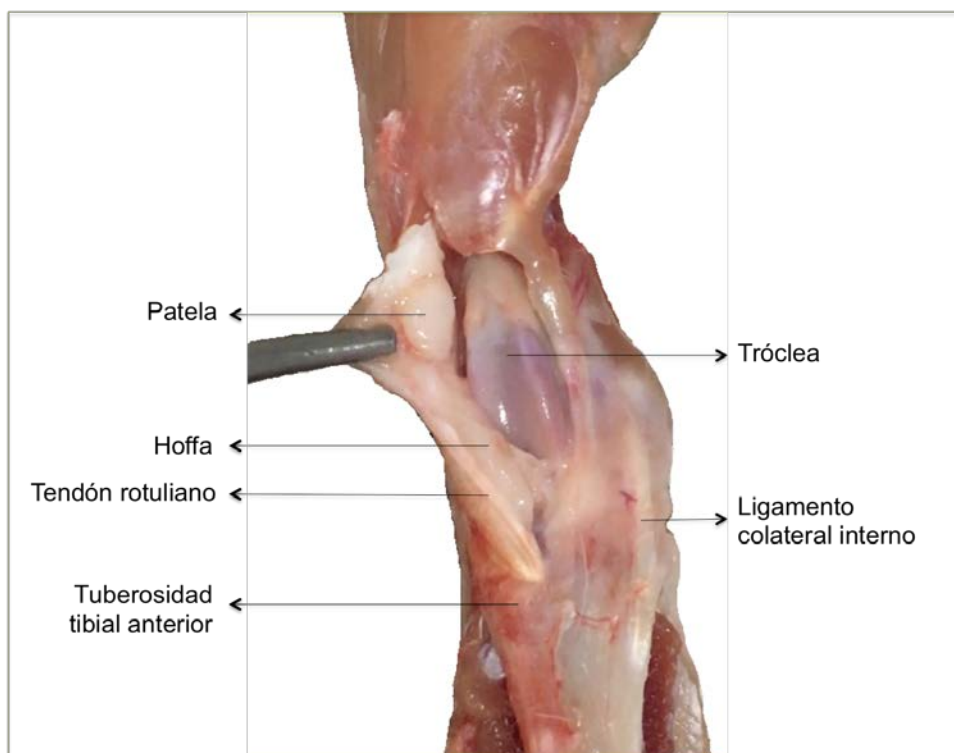


Figura 19: Rodilla derecha de conejo New Zeland White en extensión. Artrotomía parapatelar medial.

Dadas las características descritas se optó por un abordaje parapatelar medial para la sustitución tibial proximal en los animales.

4. 3. PREPARACIÓN DE MICROCÁPSULAS DE RIFAMPICINA

En este apartado se describen los procedimientos seguidos hasta obtener las microcápsulas de alginato cargadas con rifampicina que se van a utilizar en el estudio in vivo, así como la caracterización realizada de las mismas.

Los materiales empleados para la caracterización de las microcápsulas se encuentran detallados en la tabla 15.

- Acetonitrilo para HPLC de Lab-Scan (Dublín, Irlanda).
- Ácido cítrico Panreac química SAU (Barcelona, España).
- Ácido etilen diamino tetraacético (EDTA), Panreac (España).
- Ácido fosfórico 85 %, Panreac química SAU (Barcelona, España).
- Agitador / Calentador IKA® Labor Technik (Alemania).
- Agua destilada desionizada Milli - Q, Millipore®, Merck Milipore, (España).
- Autoclave J.P. Selecta S.A. (Barcelona, España)
- Balanza de precisión Mettler AT200 (Suiza).
- Bomba de vacío Büchi Vac-V-500 (Suiza).
- Campana de flujo laminar horizontal Telstar miniV/PCR (Tarrasa, España)
- Cemento Palacos® R+G con gentamicina, Heraeus (Hanau, Germany)
- Columna de HPLC Tracer Excel 120 C8, 5µm, 15 X 0.46cm, Tecknokroma (España)
- Cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies, Serie 1200, con inyector automático con un bucle de 20µl, y detector ultravioleta/visible. Control del equipo y procesamiento de los datos mediante el programa ChemStation Agilent Technologies.
- Dihidrogeno fosfato de potasio, Panreac Química SAU (Barcelona, España).
- Filtros de membrana Durapore® (PVDF) de 0,45 µm; Millipore®, Merk Millipore (España).

- Metalizador de oro Emitech K550K, Emitech Ltd (Reino Unido).
- Microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 6400 (Tokyo, Japón).
- Perclorato de sodio 98 %, Acros Organics (Nueva Jersey, USA)
- pH-metro GLP22, Crison, Barcelona (España).
- Rifampicina Ph. Eur., Fagron Iberica S.A.U. (Barcelona, España).
- Sonicador Selecta Ultrasons 3000513 (Madrid, España).
- Viales de vidrio tipo III con cierre elastomérico, Nessler (Madrid, España).

Tabla 15: Materiales empleados para la preparación y caracterización de las microcápsulas de rifampicina.

Las microcápsulas de rifampicina fueron elaboradas por el equipo de la Dra. Dña. Francisca Aran en INESCOP.

La esterilización de las microcápsulas de rifampicina la realizó la empresa Aragamma S.A. (Barcelona, España)

Las fotografías por SEM fueron realizadas en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica.

La cuantificación de la rifampicina en las microcápsulas se realizó en las instalaciones del Departamento de Farmacia, Tecnología Farmacéutica y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Las microcápsulas de rifampicina fueron elaboradas mediante la técnica de gelificación iónica siguiendo el procedimiento previamente patentado por nuestro grupo de investigación (32, 34).

Según este procedimiento, se parte de una disolución de rifampicina sódica en alginato sódico que se deja gotear sobre una solución de carbonato cálcico y quitosano. Al producirse el intercambio iónico entre el sodio y el calcio se forma alginato cálcico

que gelifica formando una cubierta alrededor de la rifampicina dando lugar a las microcápsulas.

Las microcápsulas, elaboradas por el grupo de la Dra. Aran, se envasaron en viales de vidrio con cierre elastomérico y enviaron a la empresa Aragamma para su esterilización por radiación gamma en condiciones de sobreesterilidad (80, 110, 238, 246), es decir, recibiendo una dosis total de 25KGrays. No se consideró la esterilización en autoclave por la aglutinación de las microcápsulas ni la esterilización con óxido de etileno por la dificultad técnica asociada.

4. 3. 1. Determinación del contenido de rifampicina en las microcápsulas

Para la determinación del contenido de rifampicina en las microcápsulas se puso a punto un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). Para ello se pesaron 10mg de microcápsulas y se añadieron sobre 7 mL de una solución de EDTA 0,25M. Se mantuvo en ultrasonidos durante 15min con el fin de disolver la cubierta de las microcápsulas. Pasado este tiempo se enrasó a 10mL y se añadieron 10 ml de metanol para precipitar el alginato. Se centrifugó a 2500 rpm y 20°C durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante que se filtró por un filtro de 0,45 micras y se analizó por HPLC.

De los diferentes métodos descritos en la bibliografía para la cuantificación de rifampicina en formas farmacéuticas (14, 77, 88, 162, 254), se seleccionó el método por HPLC descrito en la Real Farmacopea Española (243) que se modificó ligeramente para reducir los tiempos de retención. Las condiciones analíticas están recogidas en la tabla 16.

Columna	Tracer Excel [®] 120 C8 5µm 15x0.46mm
Fase móvil	Mezclar 40 volúmenes de acetonitrilo y 60 volúmenes de una disolución que contiene 0,1 % v/v de ácido fosfórico, 1,9 g/L de perclorato de sodio, 5,9 g/L de ácido cítrico y 20,9 g/L de dihidrogenofosfato de potasio.
Flujo	1,8mL/min
Detección (λ)	254nm
Volumen de inyección	20µL
Nº pinchazos/muestra	2
Tabla 16: Condiciones del análisis por HPLC	

Para la preparación de la fase móvil, una vez mezclados todos sus componentes, se procede a su filtración a vacío con filtros de membrana Durapore[®] de 0,45 µm y a su posterior desgasificación durante 15 minutos en un baño de ultrasonidos.

Antes del análisis de las microcápsulas se elaboró una curva de calibrado con rifampicina patrón. Se partió de una solución madre de rifampicina con una concentración de 5mg/mL y a partir de ella, por dilución en fase móvil se prepararon 5 soluciones patrón con un intervalo de concentraciones de 5 a 100µg/mL que se analizaron en las mismas condiciones. La figura 20 representa los resultados obtenidos al analizar por HPLC las soluciones patrón de rifampicina. Se observa que existe una relación lineal entre la concentración de rifampicina y el área del pico de los cromatogramas, con un coeficiente de correlación superior a 0,999.

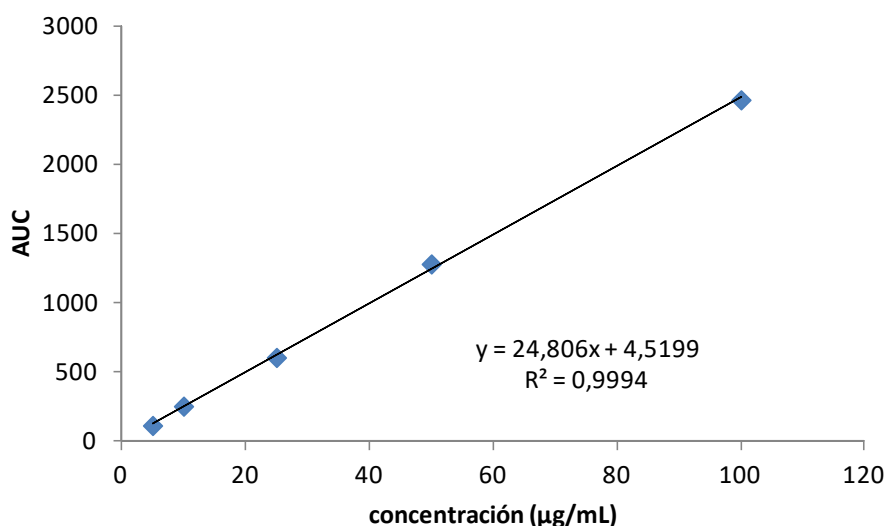


Figura 20: Curva de calibrado de la Rifampicina en fase móvil obtenida con las condiciones analíticas recogidas en la tabla 16.

Utilizando esta recta se determinó el contenido en rifampicina de tres muestras de microcápsulas obteniéndose los resultados recogidos en la tabla 17. Según los mismos, las microcápsulas tienen un contenido medio de 2,48mg de rifampicina/100mg de microcápsulas.

Muestra	AUC	CC (µg/mL)	% Rifampicina
M1	306,26	12,16	2,43
M2	302,34	12,01	2,40
M3	326,50	12,98	2,60
Media			2,48
σ			1,05
Tabla 17: Cuantificación de la rifampicina contenida en las microcápsulas			

Una vez conocida la cantidad de rifampicina contenida en las microcápsulas se procedió a preparar las mezclas de microcápsulas con Cemento Palacos® R+G con gentamicina que se utilizarán en el modelo animal. Para ello se trabajó en campana de

flujo laminar, con el fin de mantener las condiciones asépticas, a una temperatura de 21°C y una humedad relativa del 51%. Para calcular la cantidad de microcápsulas a añadir sobre el cemento en polvo se tuvo en cuenta la información recogida en la patente sobre la concentración de microcápsulas y de rifampicina en las mezclas con cemento que garantizan el efecto antimicrobiano a la vez que adecuados tiempos de fraguado y resistencia mecánica (32):

- Sección 7: la concentración de microcápsulas en el cemento puede variar del 0,1% al 20% en peso, con respecto al peso total del cemento óseo.
- Sección 8: la concentración de antimicrobiano en el cemento óseo puede variar entre el 0,01 y el 10% en peso, con respecto al peso total del cemento óseo.
- La concentración de rifampicina en el cemento óseo que demostró actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* fue del 0,3%.

Este dato se utilizó para determinar la cantidad de microcápsulas a incorporar al cemento óseo, de manera que para conseguir una concentración de rifampicina en la mezcla del 0,3%, las microcápsulas de rifampicina han de mezclarse con el cemento en una relación 1:8,3. Con esta relación, la concentración de microcápsulas en el cemento es del 12%p/p. Las mezclas en polvo se envasaron en recipientes de vidrio de boca ancha previamente esterilizados por calor húmedo en el autoclave.

4. 3. 2. Visualización microscópica de las microcápsulas.

Para la observación de las microcápsulas por SEM se colocaron en portamuestras metálicos y se recubrieron con oro coloidal en la metalizadora durante 5 minutos con el fin de hacerlas conductoras.

Las microcápsulas de rifampicina se presentan como un sólido granular, de flujo libre y de color rojo muy oscuro. Al microscopio electrónico, a 100 aumentos, se presentan como estructuras de diferente tamaño e irregulares debido a la presencia de cristales de rifampicina en su interior (figura 21A). A mayor aumento (figura 21B) se aprecia la superficie rugosa de las microcápsulas debido a la cubierta de alginato. En algunas de ellas se observa la presencia en la superficie de dos tipos de cristales: cúbicos y prismáticos (figura 22). Mediante análisis elemental se ha determinado que los cristales cúbicos están compuestos por cloro y sodio. Este cloruro sódico se habría producido como consecuencia del intercambio iónico entre el alginato sódico y el cloruro cálcico durante la formación de las microcápsulas. Los cristales prismáticos están compuestos por cloro y calcio y, por ello, corresponden a restos de cloruro cálcico del medio de formación de las microcápsulas.

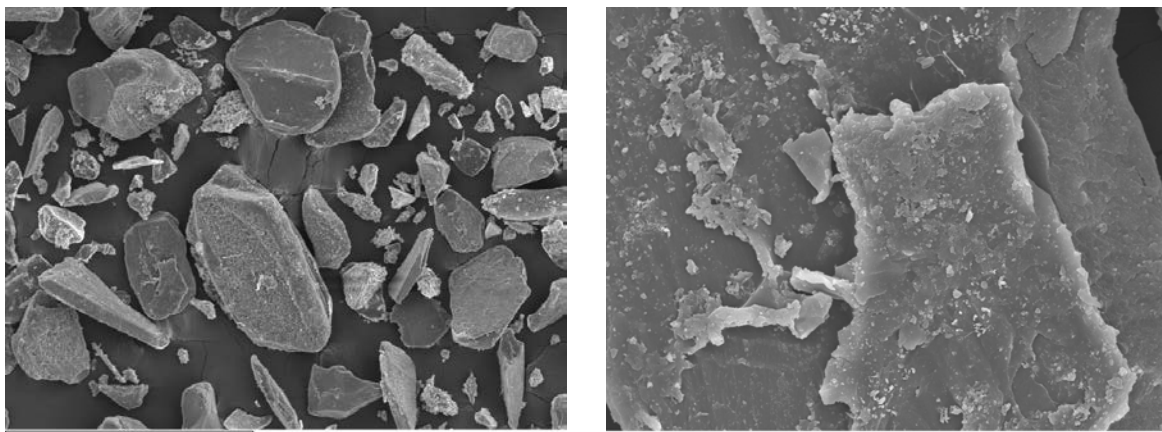


Figura 21: A) Aspecto de las microcápsulas de rifampicina al microscopio electrónico (x100). B) Aspecto de superficie de las microcápsulas de rifampicina al microscopio electrónico (x1000).

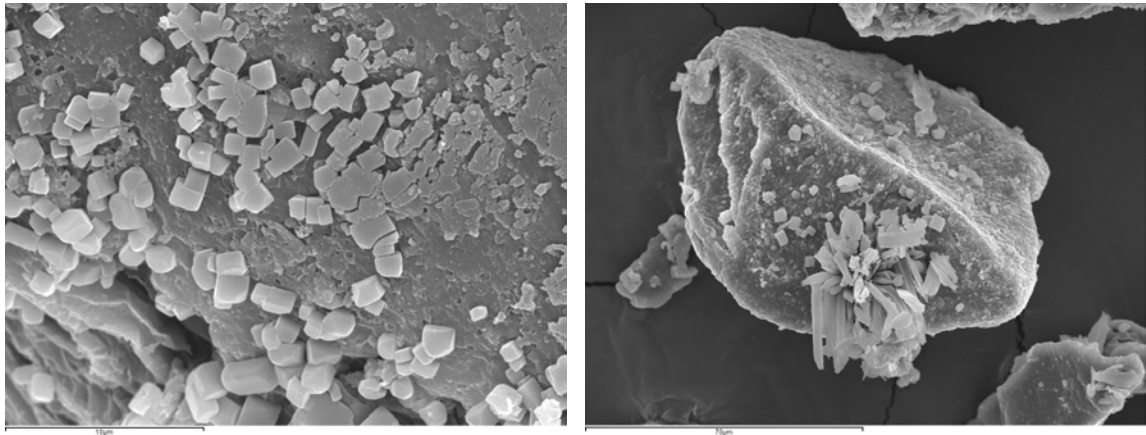


Figura 22: Presencia de cristales de cloruro sódico y de cloruro cálcico en la superficie de las microcápsulas de rifampicina (A: x4000; B: x800).

En la figura 23 se puede apreciar el aspecto de las partículas de PMMA al microscopio electrónico de barrido. Estas partículas son esféricas y de un tamaño sensiblemente inferior al de las microcápsulas (figura 21) lo que dificulta la homogenización y la estabilidad de la mezcla (274). En la figura 24 del anexo se presenta una fotografía de las mezclas ya preparadas y envasadas. La homogenización de las mezclas se realizó por agitación del envase.

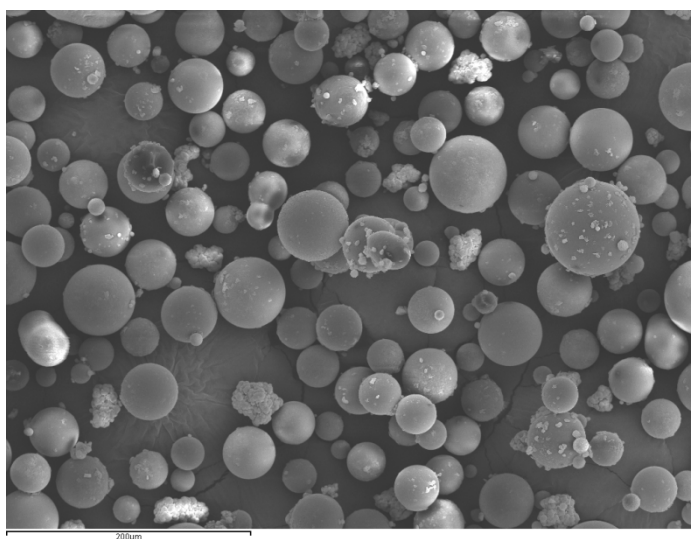


Figura 23: Aspecto de las partículas de PMMA al microscopio electrónico (x200)

En la figura 25 puede apreciarse la heterogeneidad del cemento con microcápsulas de rifampicina una vez fraguado al visualizarlo con una lupa .

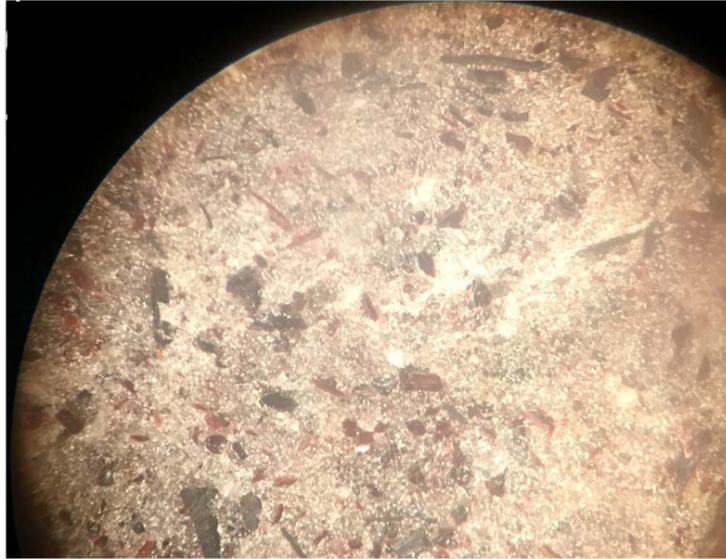


Figura 25: Imagen de la superficie del cemento con microcápsulas de rifampicina ya fraguado. Las inclusiones rojizas corresponden a la rifampicina.

4. 4. EVALUACIÓN IN VIVO DE LA EFICACIA DEL CEMENTO ÓSEO CON MICROCÁPSULAS DE RIFAMPICINA

El objetivo principal del presente epígrafe es la determinación en el modelo animal de la eficacia del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina en el tratamiento de la infección periprotésica.

Como objetivos secundarios se establecieron la definición de la infección a nivel microbiológico, clínico y analítico y el control evolutivo de estos parámetros tras el primer tiempo de recambio protésico.

Los materiales empleados para esta evaluación de la eficacia in vivo del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina se encuentran detallados en la tabla 18.

- Agujas intramusculares de 21G, de carga de 18G y subcutáneas de 25G SurGuard®2, Terumo (Laguna, Philippines)
- Autoclave J.P. Selecta S.A. (Barcelona, España)
- Balanza analítica Mettler Toledo AT200 (Madrid, España)
- Balanza Jadever JWE-15K (Duran, Ecuador)
- Bisturís estériles nº11 KRAPE (Madrid, España)
- Catéteres 24GA BD Insyte™ (NJ, USA)
- Cemento Palacos® R sin antibiótico, Heraeus (Hanau, Germany)
- Cemento Palacos® R+G con gentamicina, Heraeus (Hanau, Germany)
- Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213
- Clorhexidina alcohólica tintada 2% Bohmclorh®, BOHM (Madrid, España)
- Drenaje nº 8 de silicona, Fortune Medical (Taipei, Taiwan)
- Fijador de caudal para sets de infusión Dosi-Flow, Leventon (Barcelona, España).
- Gasas estériles
- Guantes estériles

- Jeringas Emerald™ de 2, 5 y 10mL, BD (NJ, USA)
- Ketamina Anesketin® 100mg/mL, Dechra Pharmaceuticals (Northwich, UK).
- Llave de tres pasos Connecta™, BD (NJ, USA).
- Meloxicam Infracam® 5mg/mL, Virbac (Niza, France).
- Meseta tibial de acero inoxidable
- Microcápsulas de rifampicina
- Motor y sierra Aesculap, Braun (Aschaffenburg, Alemania)
- Paños estériles
- Pentobarbital sódico Dolethal®, Vetoquinol (Madrid, España)
- Rasuradora Philips Multigroom (Ámsterdam, Países Bajos)
- Seda Aragón 0 (Barcelona, España)
- Separadores, gubia, pinzas, tijeras
- Sistema de infusión CareFusion™, BD (NJ, USA).
- Software SPSS Statistics®, 22.0 para Mac (IBM, NY, USA)
- Suero fisiológico 0,9%, Braun (Aschaffenburg, Alemania).
- Termómetro rectal
- Venda cohesiva flexible de 5cm de ancho Co-Plus® LF, BSN Medical (Hamburg, Germany)
- Venda elástica de Crepe de 5cm de ancho, Apositex (Badajoz, España)
- Vycryl™ 2/0, Ethicon (NJ, USA)
- Xilacina Xilagesic® 20mg/mL, Calier (Barcelona, España).

Tabla 18: Materiales empleados para la evaluación in vivo de la eficacia del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina.

Para la evaluación in vivo de la eficacia del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina se siguió el protocolo previamente diseñado (apartado 4.1. “Diseño del protocolo experimental”) según el cual se realizó una primera cirugía de sustitución de la metáfisis tibial proximal por el inserto metálico diseñado en el apartado 4.2 (“Diseño 3D de mesetas tibiales de conejo y estudio morfológico de la extremidad”) e infección con *S. aureus* ATCC 29213 formador de biofilm. Una semana después se comprobó la presencia de infección a nivel analítico, clínico y microbiológico.

Tras comprobar la presencia de infección, se realizó el primer tiempo de recambio protésico dividiéndose los animales en dos grupos de experimentación: Grupo R en el que se empleó para la construcción del espaciador cemento Palacos® R+G con microcápsulas de rifampicina y un Grupo C en el que se empleó cemento Palacos® R+G de uso clínico habitual. Tras 4 semanas durante las que se llevaron a cabo controles analíticos para monitorizar la evolución de la infección y la toxicidad sistémica de la rifampicina se procedió a la eutanasia de los animales y toma final de muestras intra-articulares para establecer las diferencias entre ambos grupos de experimentación en lo que a curación de la infección se refiere. Para evitar artefactos a la hora de interpretar los resultados no se administró antibioterapia intravenosa a ninguno de los grupos de estudio.

4. 4. 1. Estabulación y aclimatación

Para la evaluación in vivo de la eficacia del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina se emplearon una total de 15 conejos hembra de más de 3kg de peso, estabulados en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid en jaulas según la normativa establecida en el Real Decreto 53/2013 del 1 de Febrero. Antes de iniciar cualquier manipulación de los animales se esperó un periodo de aclimatación de 10 días (197).

4. 4. 2. Determinación de los valores basales

Tras el periodo de aclimatación de los conejos se registraron el peso, la temperatura rectal, y el consumo de agua y comida en 24 horas. También se realizó una primera determinación analítica para establecer los valores hematológicos y

bioquímicos basales mediante la técnica detallada en el apartado 4. 5. “Metodología analítica”.

4. 4. 3. Esterilización del material

Se llevó a cabo la esterilización en autoclave de todo el material quirúrgico, de los contenedores de cristal para la división del cemento, de los botes y tubos Eppendorf para la toma de muestras y de las mesetas tibiales de acero inoxidable. Se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 134°, a 2 atmósferas durante 10 minutos.

4. 4. 4. Preparación del inóculo

La cepa de *Staphylococcus aureus* meticilin-sensible ATCC 29213 fue cultivada a 37° durante una noche en agar tripticasa soya. Posteriormente se diluyó en suero salino y se prepararon soluciones de 1mL con una concentración de 10⁵CFU en tubos Eppendorf para su inoculación (6, 197).

4. 4. 5. Protocolo anestésico y analgésico

Para la inducción anestésica se procedió a la administración intramuscular en el glúteo derecho de 50mg/kg de ketamina y 10mg/kg de xilacina. Una vez sedado el animal se cateterizó la vena marginal de la oreja con un catéter de 24G al que se conectó una llave de tres pasos para la perfusión de suero salino fisiológico 0,9% a una velocidad de 10mL/h y administración de anestesia de mantenimiento de ser necesaria. El mantenimiento anestésico se realizó mediante la administración de 1mL de una

disolución de 10mg/mL de ketamina. Se consideraron signos de despertar la presencia de reflejo corneal, parpadeo u hociqueo espontáneos, movimiento de miembros inferiores o la masticación. Para la mejor identificación del reflejo de masticación y ayudar a mantener la permeabilidad de la vía aérea durante la cirugía se fabricaron unos tubos de Guedel recortando el protector de los catéteres de 24G. En la figura 26A se puede observar la cateterización de la vena marginal de la oreja y colocación de la llave de tres pasos para la perfusión de suero salino fisiológico y administración de anestesia de mantenimiento, que se mantuvo durante toda la cirugía. En la figura 26B se aprecia el tubo de Guedel colocado al animal anestesiado con el fin de identificar de forma rápida el reflejo de masticación (uno de los indicadores de despertar anestésico) y ayudar a mantener la permeabilidad de la vía aérea durante la cirugía.

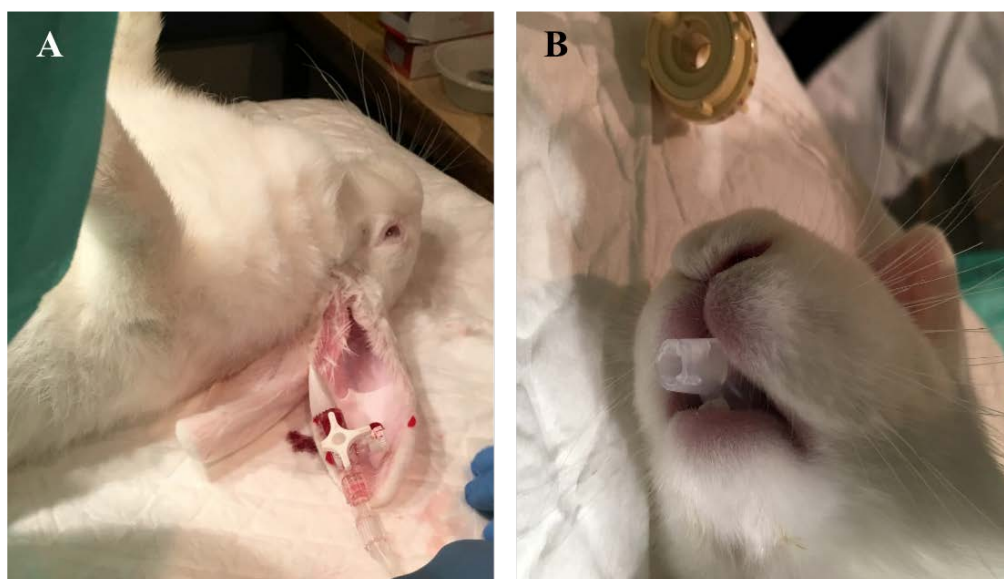


Figura 26: A) Sistema de infusión de suero en vena marginal de la oreja. B) Tubo de Guedel fabricado con protector de catéter.

La analgesia se realizó con meloxicam a dosis de 1mg/kg mediante inyección subcutánea interescapular. La primera dosis se administró una vez terminada la cirugía y se repitió cada 24 horas durante los primeros cuatro días postoperatorios (51, 205,

228, 281). La medicación empleada para la anestesia y analgesia con sus respectivas dosis se encuentra reflejada en la tabla 19.

Fármaco	Vía	Dosis
Ketamina		
- Inducción	Intramuscular	50mg/kg
- Mantenimiento	Intravenosa	10mg/kg
Xilacina	Intramuscular	10mg/kg
Meloxicam	Subcutánea	1mg/kg

Tabla 19: Anestésicos y analgésicos utilizados

Las vías de administración empleadas para la administración de analgésicos y anestésicos en los conejos NZW se encuentran ilustradas en la figura 27.



Figura 27: A) Cateterización de vena marginal de la oreja para mantenimiento anestésico en conejo NZW, B) Inducción anestésica por vía intramuscular, C) Administración de analgesia por vía subcutánea interescapular.

4. 4. 6. Sustitución de la meseta tibial e inoculación

Una vez anestesiado el animal se procedió al rasurado de la rodilla derecha y lavado del campo quirúrgico con clorhexidina alcohólica. Se preparó el campo con un paño fenestrado adhesivo y se realizó una vía anterior a la articulación de la rodilla tomando como referencias la rótula y la tuberosidad tibial anterior. Tras abrir la piel y el tejido celular subcutáneo se realizó la artrotomía por vía parapatelar medial. Se resecó la grasa de Hoffa y ambos meniscos. Se localizó el tendón del extensor largo de los dedos, el ligamento colateral medial y se seccionó el ligamento cruzado anterior para poder luxar la articulación femorotibial. Tras colocar dos separadores para proteger el tendón extensor de los dedos y el ligamento colateral medial se realizó el corte de la meseta tibial de 4mm de espesor utilizando una sierra con motor. Posteriormente se preparó el canal medular tibial para alojar el tetón del inserto con una gubia y se comprobó la estabilidad del implante. En la figura 28 puede visualizarse la exposición de la articulación de la rodilla mediante una abordaje parapatelar medial. La flecha marca el tendón del extensor de los dedos y el asterisco el ligamento cruzado anterior

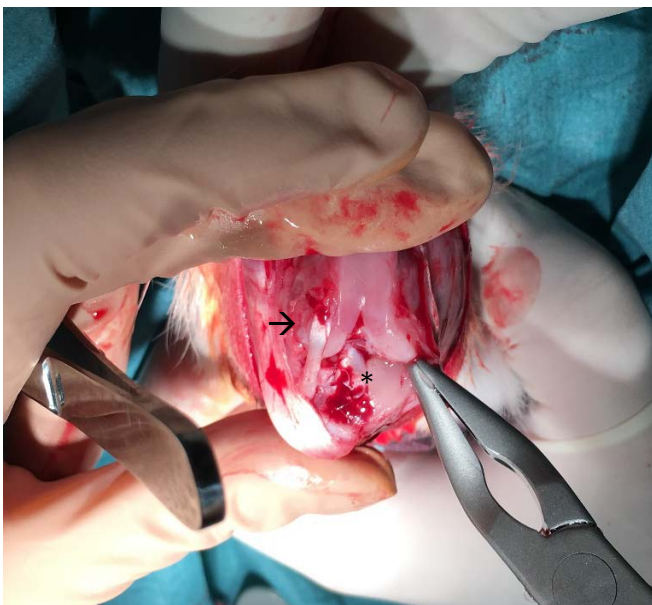


Figura 28: Exposición de la articulación de la rodilla.

En la figura 29 puede apreciarse la realización del corte tibial y el aspecto del canal medular tras su preparación para albergar el inserto metálico.

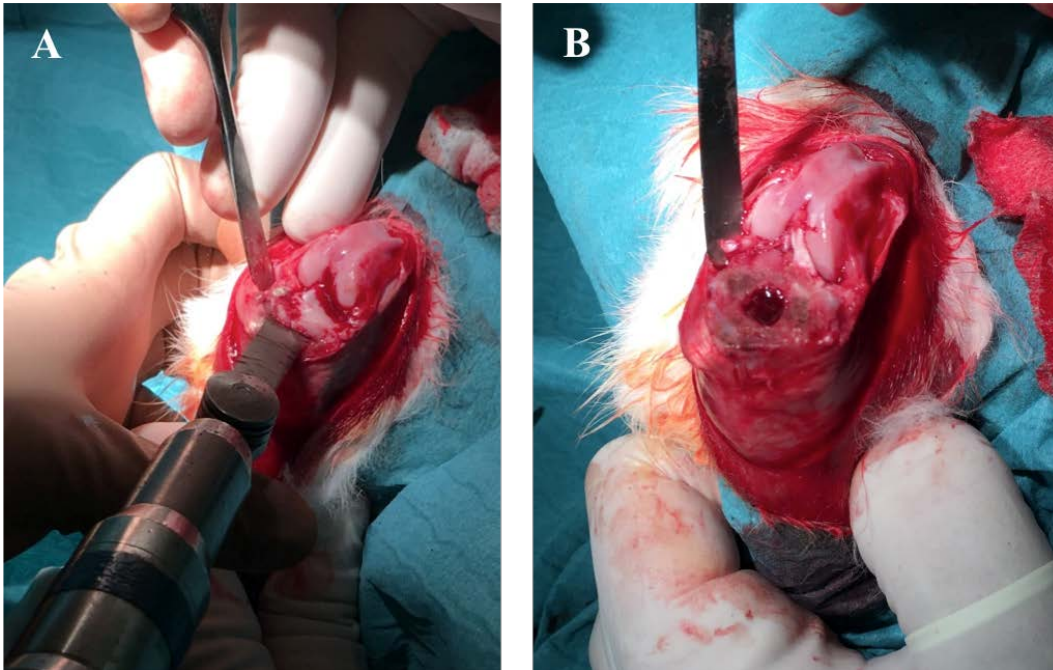


Figura 29: A) Resección de metáfisis tibial proximal; B) Preparación de canal tibial para albergar el tetón del inserto.

Una vez comprobado el adecuado posicionamiento del implante se realizó un lavado con suero salino fisiológico y se procedió a la cementación del componente tibial con cemento Palacos® R sin antibiótico. Para cada animal se mezclaron 8g de fracción polvo de cemento con 4mL de fracción líquida hasta conseguir una mezcla homogénea, se colocó en la metáfisis tibial seca y sobre el cemento se implantó la meseta tibial de acero inoxidable diseñada mediante impresión 3D (figuras 30 y 31).

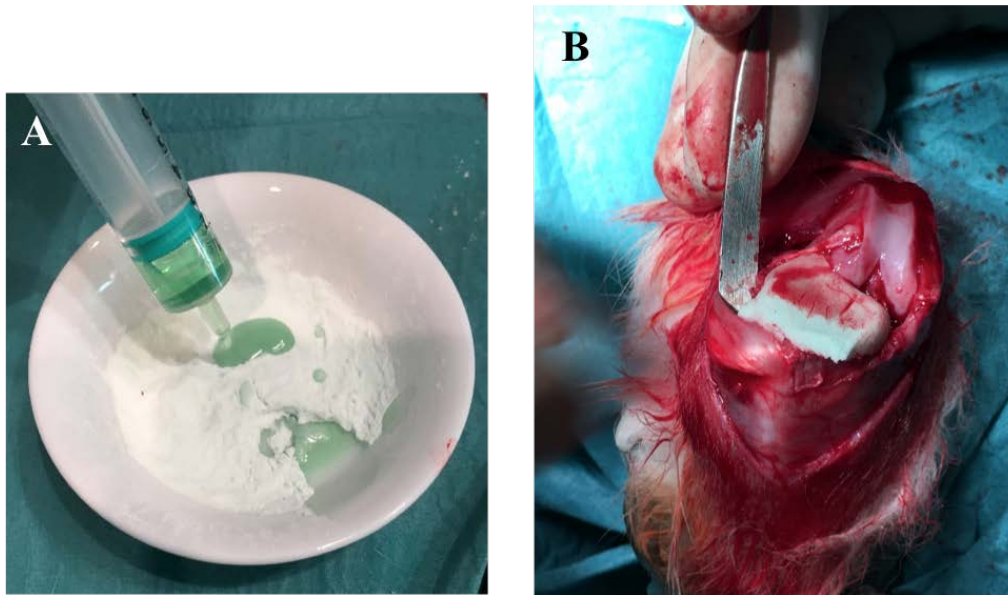


Figura 30: A) Mezclado de fracción líquida y polvo de Palacos® R sin antibiótico. B) Cementación de metáfisis tibial proximal.

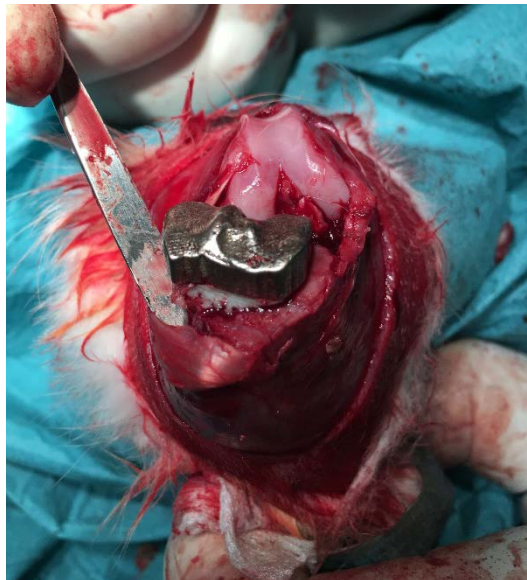


Figura 31: Implante definitivo: visión anterior de la meseta tibial de acero inoxidable cementada.

Tras el fraguado del cemento se redujo la articulación y se cerró la artrotomía con una sutura continua de Vicryl de 2/0, como se puede ver en la figura 32.

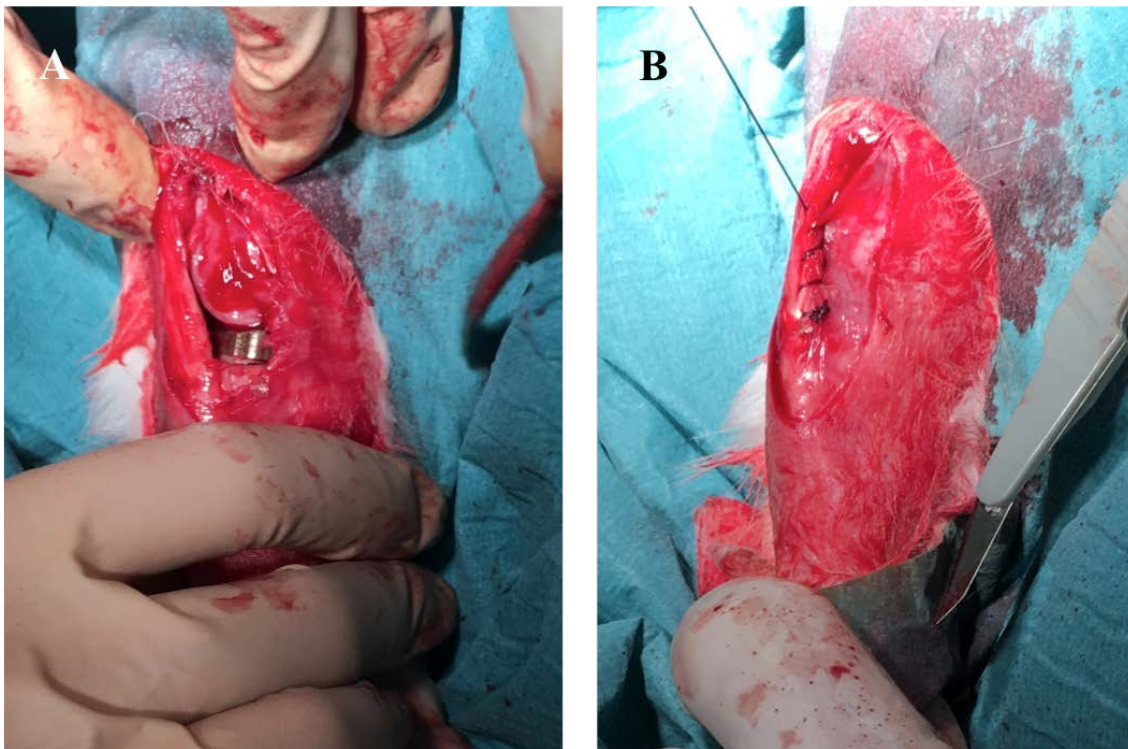


Figura 32: A) Visión lateral con articulación reducida. B) Cierre de la artrotomía con sutura continua de Vicryl.

Tras el cierre de la artrotomía se realizó la inoculación intra-articular, con una aguja de 25G, de 1mL de solución salina con 10^5 CFU/mL de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 previa homogenización de la suspensión con un agitador tipo vórtex con el fin de evitar la sedimentación. El cierre cutáneo se llevó a cabo con una sutura continua de seda. En la figura 33 se muestra cómo se homogenizó el inóculo, el momento de la inoculación y el posterior cierre cutáneo con seda.

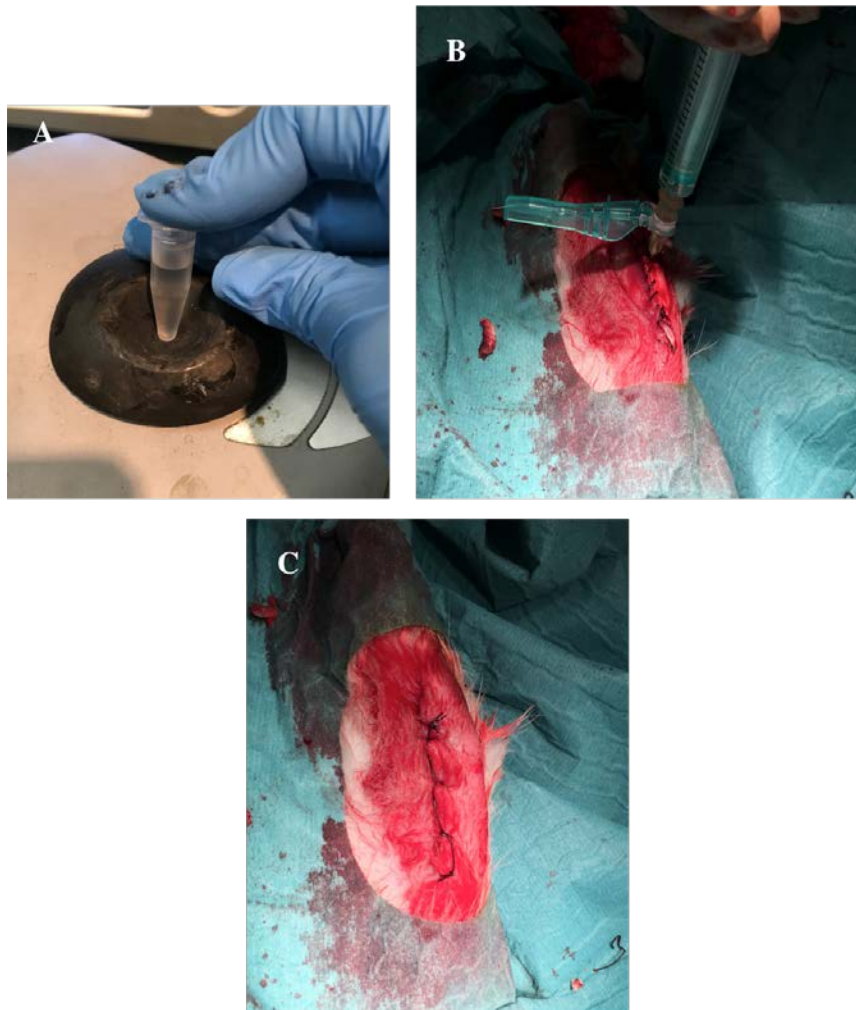


Figura 33: A) Homogenización de 1mL de la solución de *S. aureus*. B) Inoculación intra-articular y C) Cierre cutáneo con seda.

Tras el cierre se procedió al vendaje de la pata del animal con venda elástica de crepe que se cubrió con una venda adhesiva para evitar la manipulación de la herida y del vendaje por parte del animal (figura 34).



Figura 34: Vendaje

4. 4. 7. Primer tiempo de recambio

Una semana después de la infección se registraron el peso y temperatura de los animales, se obtuvieron muestras sanguíneas para el análisis bioquímico y hematológico de la vena marginal de la oreja y se realizó el primer tiempo de recambio. Tras anestesiar el animal y el lavado del campo con clorhexidina alcohólica se empleó la misma vía parapatelar medial para el abordaje de la articulación de la rodilla. Tras la limpieza con abundante suero salino fisiológico, retirada de esfacelos y de la sinovial hipertrófica se retiró el inserto tibial y el cemento remanente en la metáfisis tibial. En la figura 35 puede verse el aspecto de la rodilla tras la retirada del inserto tibial, apreciándose abundante sinovitis y el cemento en la metáfisis tibial.



Figura 35: Aspecto de la rodilla tras una semana de la inoculación intra-articular de *S. aureus*.

Se enviaron como muestras para cultivo microbiológico el inserto tibial, una muestra de partes blandas (cápsula o remanente de cruzado anterior de estar presente) y una muestra de hueso procedente de la meseta tibial. Cada inserto, junto con restos de

cemento fueron recogidos en un vial estéril, y en dos tubos Eppendorf, también estériles, se recogieron muestras de partes blandas y de hueso metafisario de cada animal (figura 36).



Figura 36: Muestras para análisis microbiológico. De izquierda a derecha: tubo Eppendorf con muestra de partes blandas, tubo Eppendorf con muestra de hueso metafisario y vial con inserto metálico y restos de cemento.

Todas estas muestras se transportaron en hielo para su análisis según la técnica descrita en el apartado 4. 5. “Metodología analítica”.

Se lavó con abundante suero la articulación y se procedió a la preparación del espaciador de cemento. En este momento se realiza la división de los animales en los dos grupos de estudio. En los animales del grupo R (R1 a R8) se preparó el cemento Palacos® R+G con microcápsulas de rifampicina añadiéndose en condiciones estériles 1g de microcápsulas a 8g de la fracción polvo del cemento hasta conseguirse una mezcla homogénea. El cemento de este grupo contenía un 12,5% de microcápsulas de rifampicina. Intraoperatoriamente se añadieron los 4mL de fracción líquida hasta conseguirse una mezcla homogénea (figura 37).

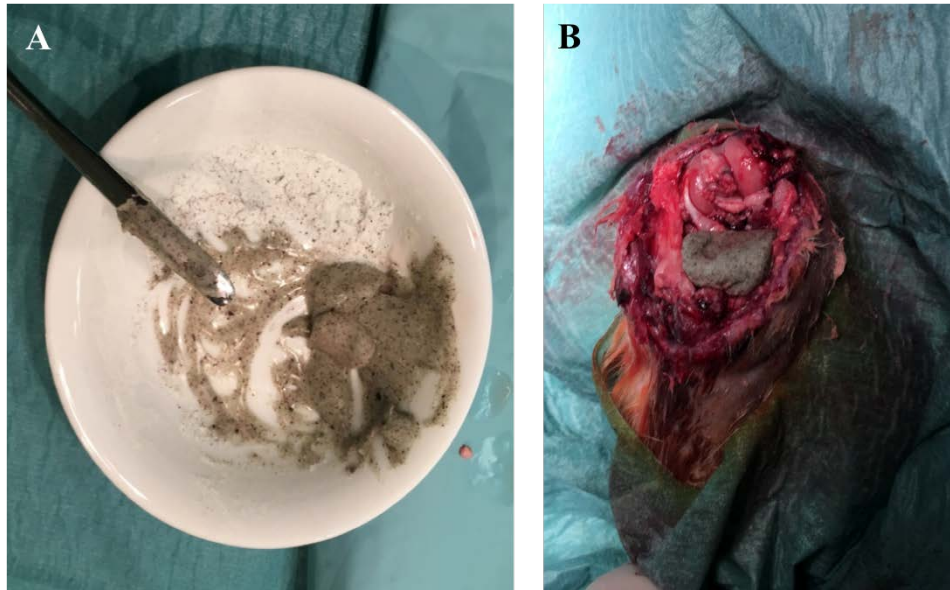


Figura 37: A) Mezcla de cemento con microcápsulas de rifampicina. B) Espaciador de cemento con microcápsulas de rifampicina.

En los animales del grupo C (C1-C7) se empleó cemento Palacos® R+G solamente con gentamicina como antibiótico, el cemento de uso clínico habitual. En este caso también se emplearon 8g de fracción polvo y 4mL de fracción líquida. Tras la aplicación del cemento se comprobó la estabilidad del espaciador. En los animales del grupo C se procedió al cierre directo de la artrotomía con Vicryl y de la piel con seda. En los animales del grupo R se dejó un drenaje intra-articular de silicona para a toma de muestras de líquido articular y determinación de la rifampicina liberada a partir del cemento, se dejó bloqueada la salida con un tapón (figura 38). La técnica de vendaje fue similar a la empleada tras la primera cirugía.

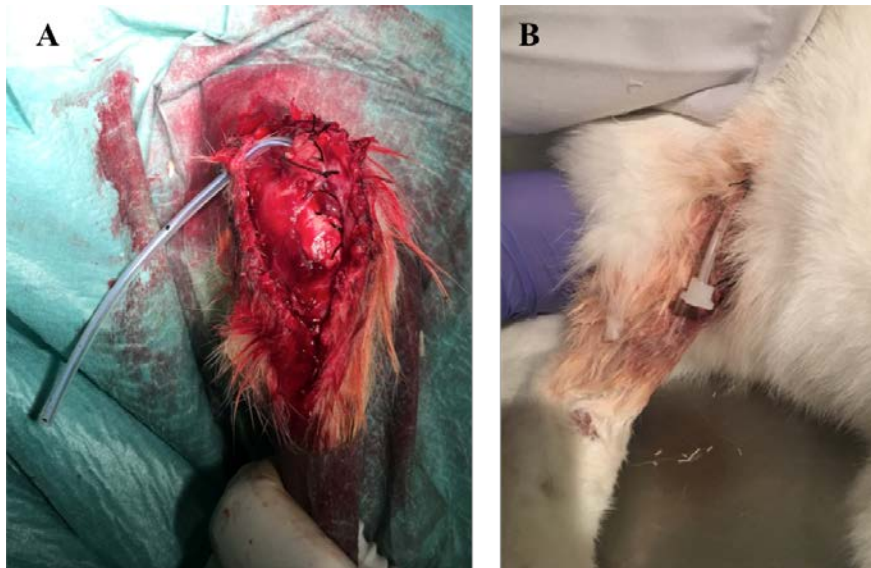


Figura 38: Drenaje intra-articular. A) Implantación intraoperatoria; B) Aspecto tras 24 horas de la cirugía.

4. 4. 8. Criterios diagnósticos de infección

Para el diagnóstico de la infección presente una semana después de la inoculación se determinó la temperatura rectal, el peso y se tomaron muestras sanguíneas el mismo día del primer tiempo de recambio protésico para definir la fórmula leucocitaria, número de plaquetas y VSG. Intentando reproducir los criterios diagnósticos de infección empleados en humanos (215) se definió la presencia de infección como se detalla en la tabla 20. Debido al escaso volumen de líquido articular de los animales se decidió emplear como criterios diagnósticos de infección la modificación del recuento linfocitario y plaquetario en sangre en lugar de la leucocitosis y neutrofilia en líquido articular que se emplea como diagnóstico en la práctica clínica habitual.

Al menos un criterio mayor (211):

- Presencia de fístula que comunique con la articulación
- Al menos dos cultivos intra-articulares positivos para *S. aureus*

Al menos tres criterios menores (124, 174):

- Recuento leucocitario superior a $9,7 \cdot 10^3/\mu\text{L}$
- Linfopenia $\leq 30\%$
- Trombocitosis $> 650 \cdot 10^3/\mu\text{L}$
- VSG $> 5\text{mm}$
- Un cultivo positivo

Tabla 20: Criterios diagnósticos de infección en el modelo animal

4. 4. 9. Control evolutivo: determinación de la toxicidad sistémica de la rifampicina y definición de la curva de liberación intra-articular

Se controlaron de forma diaria el consumo de agua y comida y los signos de sufrimiento animal según la tabla 12 diseñada en el apartado 4.1 “Diseño del protocolo experimental”.

Para determinar la evolución de la infección y la toxicidad sistémica de la rifampicina tras la colocación del espaciador, se pesó a los animales, se tomó la temperatura rectal y se tomaron muestras sanguíneas a los 4 días del primer tiempo de recambio y posteriormente de forma semanal hasta la cuarta semana, en la que se llevó a cabo la eutanasia del animal. Se considerará toxicidad renal secundaria a la rifampicina o gentamicina con valores de creatinina superiores a 2,5mg/dL y toxicidad hepática secundaria a la rifampicina con valores de bilirrubina total superiores a 0,5mg/dL, AST $> 113\text{UI/L}$ o ALT $> 80\text{UI/L}$ (228). Al igual que en la práctica clínica habitual se considerará como hepatotoxicidad grave aquella elevación de ALT

consideradas de grado 3 o superior según las directrices de la International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use que se encuentran resumidas en la Tabla 21 (160).

	Valor ALT	Valones conejo NZW
Grado 0	Parámetros dentro de los límites normales	<80 UI/L
Grado 1	LN x 1,25-3	100-240
Grado 2	LN x 3-5	240-400
Grado 3	LN x 5-10	400-800
Grado 4	LN x >10	>800
Tabla 21: Monitorización de la hepatotoxicidad secundaria a rifampicina. LN: límites normales (118)		

También tras el primer tiempo de recambio se recogieron muestras de líquido articular a través del drenaje en los animales del grupo R a las 6, 24, 48 y 72 horas de la colocación del espaciador para determinar la liberación intra-articular de la rifampicina contenida en el cemento. La toma de muestras se realizó mediante aspiración con una jeringa de 10mL y una aguja de 18G.

4. 4. 10. Eutanasia y toma de muestras finales

A las 4 semanas de la realización del primer tiempo de recambio se procedió a la toma de muestras sanguíneas y registro de peso y temperatura. Posteriormente se llevó a cabo la eutanasia de los animales con Pentobarbital sódico a una dosis de 200mg/kg. Se administró por vía intravenosa a través del mismo catéter de 24G empleado para la toma de muestras sanguíneas.

Tras la eutanasia del animal se procedió en condiciones de asepsia a la toma de muestras intra-articulares para cultivo microbiológico. Para ello se lavó el campo con clorhexidina alcohólica, se aisló con un paño fenestrado estéril y empleó la misma vía parapatelar medial para el acceso a la articulación de la rodilla. Se tomaron muestras de partes blandas (cápsula, tendón rotuliano o tendón del extensor de los dedos), hueso (tibia) y se recogió el espaciador de cemento para su análisis microbiológico, transportándose las muestras en hielo. En la figura 39 puede observarse el aspecto de la articulación de uno de los conejos del grupo R (con microcápsulas de rifampicina) y los viales empleados para la toma de muestras microbiológicas de cemento, partes blandas y hueso.

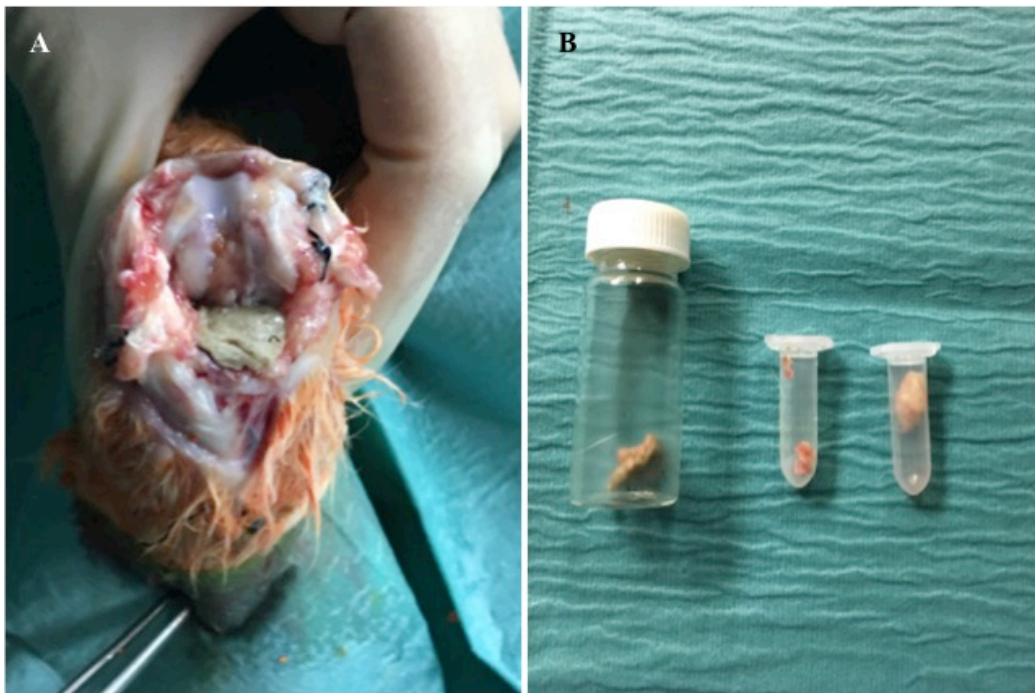


Figura 39: A) Aspecto de la rodilla con el espaciador de cemento con rifampicina tras 4 semanas de su implantación (R1). B) Muestras para análisis microbiológico, de izquierda a derecha: espaciador de cemento, hueso y partes blandas.

El cronograma de los procedimientos realizados durante el estudio se encuentra recogido en la figura 40.

D0 AS Peso y T ^a basales	D1 Infección AS Peso y T ^a	D2	D3	D4	D5	D6
D7	D8 1er tiempo AS Peso y T ^a	D9	D10	D11 AS Peso y T ^a	D12	D13
D14	D15 AS Peso y T ^a	D16	D17	D18	D19	D20
D21	D22 AS Peso y T ^a	D23	D24	D25	D26	D27
D28	D29 AS Peso y T ^a	D30	D31	D32	D33	D34
D35	D36 Eutanasia AS Peso y T ^a					

Figura 40: Cronograma de los procedimientos realizados durante el estudio. El sombreado naranja representa los días en los que se administró analgesia subcutánea. La flecha representa los días de toma de muestras intra-articulares. AS: toma de muestras sanguíneas.

4. 5. METODOLOGÍA ANALÍTICA

El objetivo principal del presente epígrafe es la determinación de los parámetros necesarios para identificar la presencia de infección protésica, evaluar la evolución de la misma y detectar la toxicidad sistémica de la rifampicina en los animales usados en el estudio; así como poner a punto y describir la metodología analítica utilizada para su determinación bioquímica, hematológica y microbiológica.

Además, como objetivo secundario se definió y puso a punto la metodología analítica que permitió determinar el perfil de liberación de rifampicina intra-articular a partir del espaciador de cemento implantado en el primer tiempo de recambio.

Los materiales empleados se encuentran detallados en la tabla 22.

- Acetonitrilo para HPLC de Lab-Scan (Dublín, Irlanda).
- Ácido cítrico Panreac química SAU (Barcelona, España).
- Ácido fosfórico 85 % Panreac química SAU (Barcelona, España).
- Ácido hialurónico, Fagron Iberica S.A.U. (Barcelona, España)
- Agar Trypticase soya
- Agitador / Calentador IKA® Labor Technik (Alemania).
- Agitador tipo vórtex mixer VELT scientifica ZX classic (Usmate, Italia).
- Agua destilada desionizada Milli - Q, Millipore® Merck Milipore, (España).
- Autoanalizador KX-21 N, Sysmex (Hyogo, Japón)
- Autoclave J.P. Selecta S.A. (Barcelona, España)
- Balanza analítica Mettler Toledo AT200 (Madrid, España)
- Catéteres 24G BD Insyte™ (Nueva Jersey, USA)
- Centrífuga Universal 32R Hettich zentrifugen (Tuttlingen, Alemania)
- Cepa *S. aureus* ATCC 29213
- Cepo para conejos
- Cloruro de potasio, Panreac Química SAU (Barcelona, España).
- Cloruro de sodio, Panreac Química SAU (Barcelona, España).

- Columna de HPLC Tracer Excel 120 C8, 5µm, 15 X 0.46cm (Tecknokroma, España)
- Cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies, Serie 1200, con inyector automático con un bucle de 20µl, y detector ultravioleta/visible. control del equipo y procesamiento de los datos mediante el programa ChemStation Agilent Technologies.
- Dihidrogeno fosfato de potasio, Panreac Química SAU (Barcelona, España).
- Estufa de cultivo RAY I50, Biogen, España. Programada a 37°C±0,2°C
- Filtros de membrana Durapore® (PVDF) de 0,45 µm; Millipore®, Merk Milipore (España).
- Fosfato monopotásico, Panreac Química S.A. (Barcelona, España).
- Fosfato disódico dihidratado, Merck-chemicals (Darmstadt, Alemania).
- Gasas
- Gentamicina sulfato Ph.Eur., Fagron Iberica S.A.U. (Barcelona, España).
- Medio RPMI
- Perclorato de sodio 98 % Acros Organics (Nueva Jersey, USA)
- pH-metro GLP22, Crison (Barcelona, España).
- Pipetas Pasteur
- Rifampicina Ph. Eur., Fagron Iberica S.A.U. (Barcelona, España).
- Sonicador Selecta Ultrasons 3000513 (Madrid, España).
- Suero salino estéril
- Tubos de Eppendorf
- Tubos para análisis bioquímico Vacuette® Z Serum Sep Clot Activator de 9mL (Madrid, España)
- Tubos para análisis hematológico Vacuette® K3E K3EDTA de 3mL (Madrid, España)
- Viales de vidrio

Tabla 22: Materiales empleados para la determinación hematológica, bioquímica y microbiológica.

La preparación del inóculo de *S. aureus* y los análisis microbiológicos se realizaron en colaboración con el Dr. D. Federico Navarro del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

La hematimetría y el recuento plaquetario se realizaron en colaboración con la Dra. Dña. Rafaela Raposo de la Escuela de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Las determinaciones bioquímicas se realizaron en el Centro de Análisis Sanitarios CAS, Madrid.

La cuantificación de rifampicina en muestras biológicas se realizaron en las instalaciones del Departamento de Farmacia, Tecnología Farmacéutica y Tecnología Alimentaria de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Los métodos descritos en este capítulo se utilizaron para la obtención de muestras biológicas y para el procesamiento de las mismas con el fin de obtener valores de diferentes parámetros bioquímicos y hematológicos, así como recuentos microbiológicos y concentraciones de rifampicina en fluidos corporales. De esta forma respecto a las determinaciones hematológicas y bioquímicas se realizó una determinación basal de los parámetros hematológicos, VSG, AST, ALT, bilirrubina y creatinina antes del inicio del estudio. A la semana de la inoculación de *S. aureus*, coincidiendo con el primer tiempo de recambio protésico (día 8), se analizaron los parámetros hematológicos y VSG. 3 días tras el primer tiempo de recambio y posteriormente de forma semanal hasta la eutanasia de los animales se realizaron nuevas determinaciones hematológicas para monitorizar la evolución de los parámetros

inflamatorios. Los días 15, 22 y 36 se realizó también la determinación bioquímica necesaria para valorar la toxicidad sistémica de la rifampicina.

Las determinaciones microbiológicas se llevaron a cabo en el primer tiempo de recambio protésico para diagnosticar la presencia de infección y tras la eutanasia de los animales para terminar la eficacia antimicrobiana de la rifampicina contenida en las microcápsulas. Para la determinación del perfil de liberación intra-articular de la rifampicina se tomaron muestras de drenaje el día del primer tiempo de recambio y los 3 días posteriores. El cronograma seguido para la obtención de las muestras conforme a estos métodos se encuentra reflejado en la figura 41.

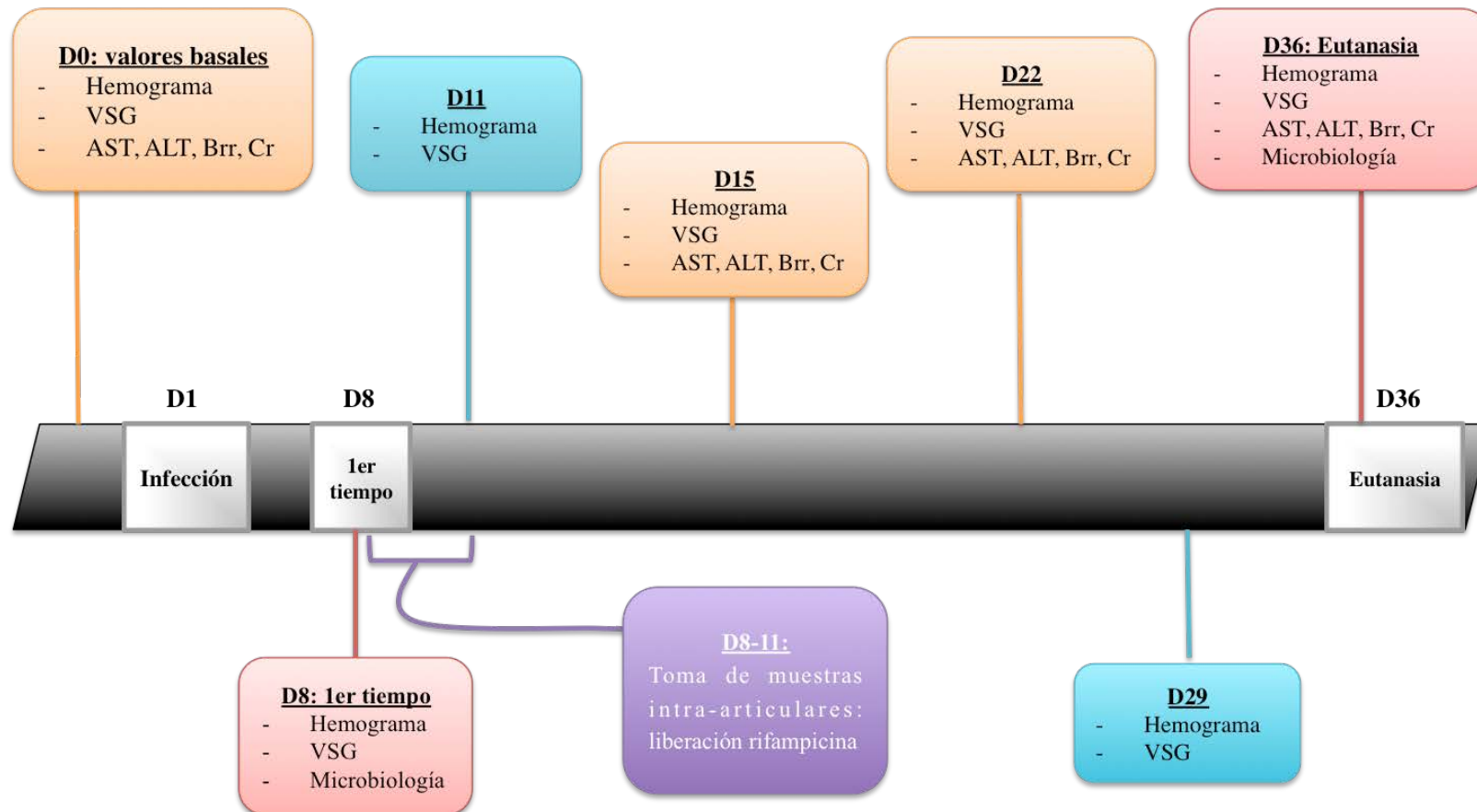


Figura 41: Cronograma seguido para la toma de muestras. VSG: velocidad de sedimentación globular en la primera hora; Cr: creatinina; Brr: bilirrubina; AST: aspartato-aminotransferasa; ALT: alanina-aminotransferasa.

4. 5. 1. Análisis bioquímico y hematológico

Se definieron como marcadores de infección la velocidad de sedimentación globular en la primera hora (VSG), el recuento plaquetario y el recuento leucocitario. Para la evaluación de la toxicidad sistémica de la rifampicina se empleó la creatinina como marcador de función renal y, como marcadores de metabolismo hepático, la bilirrubina total, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST).

Para la obtención de muestras sanguíneas se procedió a la inmovilización de los animales en un cepo y canalización de la vena marginal de la oreja con un catéter de 24 Gauge.

Análisis hematológico

Para la determinación del recuento leucocitario y plaquetario se recogió 1mL de sangre en los tubos Vacuette® con EDTA para evitar la coagulación de la muestra. Las muestras de sangre fueron procesadas, previa homogenización por agitación, en un autoanalizador hematológico de tres poblaciones.

Para la determinación de la VSG en la primera hora se recogió otro mililitro de sangre en el mismo tipo de tubo.

Análisis bioquímico

Se recogió 1mL de sangre en los tubos Vacuette® con gel separador en la base para realizar la determinación de bilirrubina total, creatinina, ALT y AST. Dichos tubos se centrifugaron a 2500rpm, a 20° durante 10 minutos obteniéndose las células sanguíneas en el fondo del tubo separadas del suero por el gel (figura 42A). Dicho suero se extrajo del tubo con una pipeta Pasteur y se guardó en un tubo Eppendorf que fue

congelado hasta su análisis por parte del Centro de Análisis Sanitarios CAS (figura 42B).

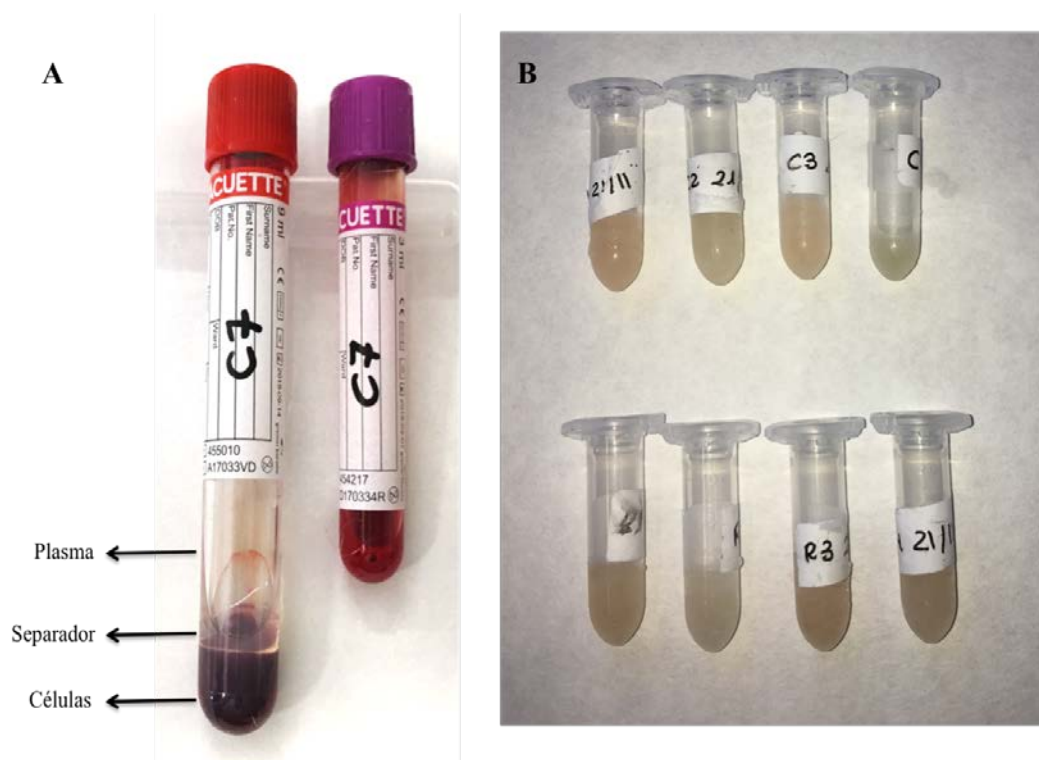


Figura 42: Muestras sanguíneas de conejo control. A) El tubo de la izquierda corresponde al análisis bioquímico tras la centrifugación y el de la derecha al análisis hematológico. B) Muestras para análisis bioquímico tras centrifugado.

4. 5. 2. Análisis microbiológico

Análisis microbiológico de muestras intra-articulares

Siguiendo la metodología descrita a continuación se analizaron, tras el primer tiempo de recambio protésico, muestras de hueso, partes blandas y el inserto metálico y, tras la eutanasia del animal, muestras de partes blandas, hueso y el espaciador de cemento.

Las muestras extraídas de las rodillas de los animales se introdujeron en contenedores previamente esterilizados en autoclave y se conservaron en hielo durante su transporte al laboratorio de microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid donde fueron pesadas y analizadas. Los implantes fueron lavados tres veces de forma profusa con suero salino estéril para eliminar las bacterias en forma plactónica. Tras ello se suspendieron en 2mL de solución salina, se agitaron con un agitador tipo vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos y se sonicaron durante 5 minutos en el sonicador a 40kHz. Tras la sonicación volvieron a agitarse en el vórtex otros 30 segundos. Se realizaron disoluciones 1:10 de las suspensiones y se sembraron en placas de agar tripticasa de soya que se incubaron a 37° durante 18-24 horas (52, 264).

Las muestras de partes blandas y hueso se homogenizaron con ayuda de pinzas y bisturí en solución salina. Tras ello se agitaron con el vórtex a máxima velocidad durante 5 minutos. También en este caso se realizaron disoluciones 1:10 y se sembraron en placas de agar tripticasa de soya siguiendo el mismo protocolo de incubación (319).

Las muestras obtenidas tras la eutanasia del animal, al haber estado en contacto con antibióticos procedentes del cemento óseo, fueron lavadas de forma profusa con salino y centrifugadas dos veces para eliminar los restos de antibiótico presentes en ellas. Posteriormente fueron suspendidas en 1mL de salino y analizadas según el esquema explicado previamente.

Demostración de la formación de biofilm por la cepa elegida

Para la demostración de la capacidad de formación de biofilm en 7 días del *S. aureus* ATCC 29213 se realizó el cultivo en medio líquido (RPMI enriquecido con 0,2% de glucosa) de 5×10^6 CFU de dicho *Staphylococcus aureus* que se incubó a 37°

con 5% de CO₂ durante 72 horas. Se comprobó el cambio de color del medio de rosa a amarillo secundario al cambio del pH producido por el crecimiento de microorganismos. Se introdujeron dos insertos tibiales de acero inoxidable para demostrar el crecimiento bacteriano en su superficie. Se incubaron durante 7 días, que es el tiempo que se esperó in vivo antes de realizar el primer tiempo de recambio, y se realizó la tinción con cristal violeta de los insertos (200). En las figura 43 puede apreciarse la tinción violeta en aquellas zonas de crecimiento de microorganismos de ambos insertos tibiales.



Figura 43: Demostración de la formación de biofilm mediante tinción de cristal violeta tras 1 semana de la inoculación con *S. aureus*.

4. 5. 3. Cuantificación de rifampicina en muestras biológicas

Para la cuantificación de rifampicina en sangre y líquido sinovial se utilizó el mismo método analítico utilizado para la cuantificación de la rifampicina contenida en las microcápsulas detallado en el apartado 4. 3.

El día 11 del ensayo (a las 72 h de la implantación del espaciador de cemento con gentamicina y microcápsulas de rifampicina) se recogieron muestras de sangre en tubos Vacuette® con gel separador en la base y se procesaron siguiendo el mismo procedimiento que para el análisis bioquímico. El suero obtenido se recogió en tubos Eppendorf y se mantuvo congelado hasta el momento del análisis.

En cuanto al líquido intra-articular, se recogieron muestras a través del drenaje a las 6, 24, 48 y 72 horas del primer tiempo de recambio. Dicho líquido se almacenó en tubos Eppendorf y se mantuvo congelado hasta el momento del análisis.

Antes del análisis de estas muestras se comprobó que el método de cuantificación de rifampicina era válido para muestras biológicas, de sangre y de líquido sinovial, y que permitía cuantificar la rifampicina a bajas concentraciones y en presencia de gentamicina, sin que se produjeran interferencias (31, 75, 93, 145, 167, 276). Con este fin se prepararon muestras artificiales con los siguientes medios:

- Suero de los animales en ausencia de tratamiento antibiótico, que se obtuvo a partir de sangre extraída el día 0. Se recogieron 2mL de sangre que se procesaron según la técnica previamente descrita para la separación del suero.
- Líquido sinovial simulado: se preparó tampón fosfato a pH 7,4 (PBS) al que se incorporó ácido hialurónico en una concentración de 300mg/100mL, de acuerdo a la fórmula de la tabla 23 (177):

Reactivo	Cantidad (g/L)
Cloruro sódico	8
Cloruro potásico	0,2
Fosfato sódico dibásico	1,44
Fosfato monopotásico monobásico	0,24
Ácido hialurónico	3
pH	7,4
Tabla 23: Composición del líquido sinovial simulado	

Para determinar la capacidad del método de cuantificar rifampicina en presencia de gentamicina se prepararon, con cada uno de estos medios, las siguientes muestras artificiales, que se analizaron por HPLC:

- R: se añadió rifampicina a una concentración de 100µg/mL
- G: se añadió gentamicina sulfato a una concentración de 100 µg/mL
- R+G: se añadió rifampicina (100µg/mL) y gentamicina sulfato (100µg/mL).

La figura 44 recoge, a modo de ejemplo, los cromatogramas obtenidos con las muestras de líquido sinovial simulado. En las muestras que únicamente contenían rifampicina (A) se observa el pico característico del fármaco, a un tiempo de retención de 11,48 minutos y otro pico más pequeño y a un tiempo de retención menor (4,36minutos) que se corresponde con el principal producto de degradación de la rifampicina: la rifampicina quinona (162, 187). En las muestras que únicamente contenían gentamicina no se observó ningún pico (B), ni aun cuando se prolongó el análisis durante 60 min, lo que demuestra que la gentamicina no presenta lectura de absorbancia a 254nm. Con las muestras que contenían rifampicina+gentamicina (C) se obtuvo un cromatograma similar al de la rifampicina sola, donde aparece el pico correspondiente a la rifampicina y no se observa ningún pico correspondiente a la gentamicina.

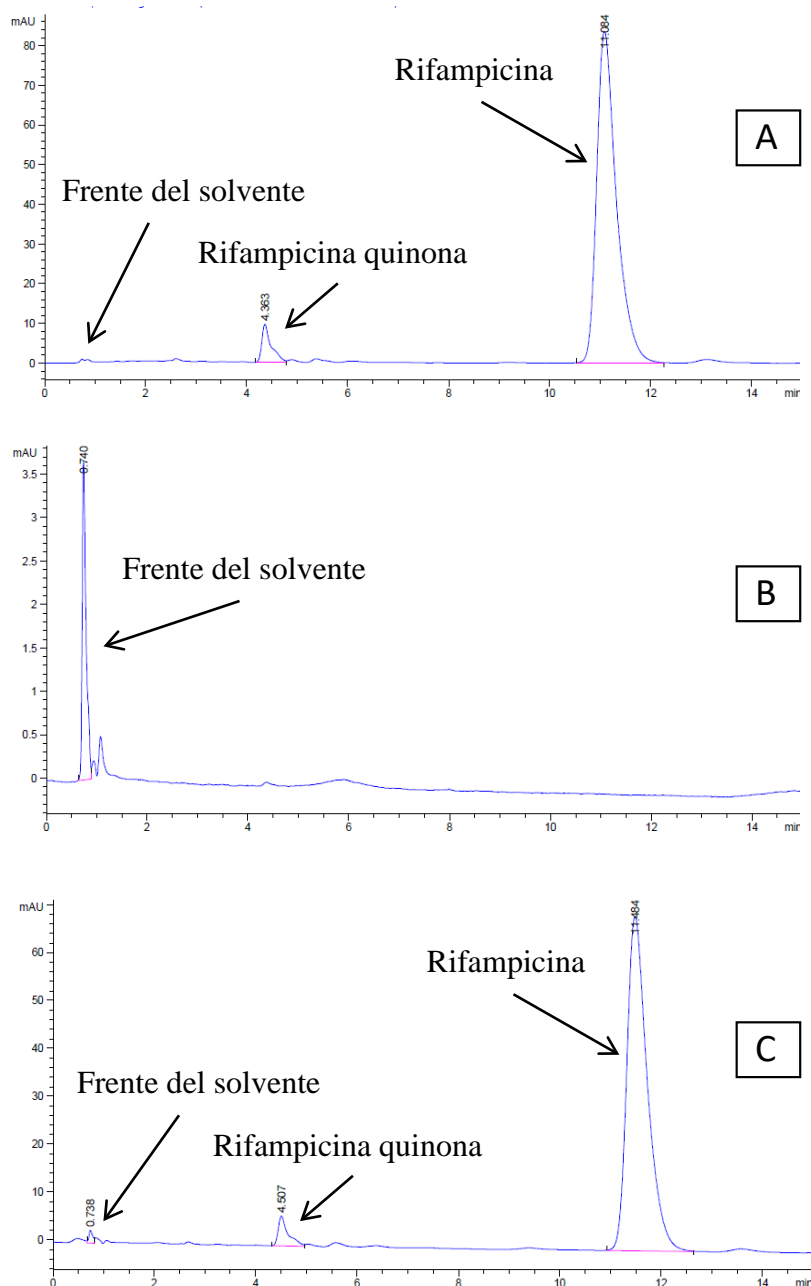


Figura 44: Cromatogramas obtenidos al analizar por HPLC muestras de rifampicina (A), gentamicina (B) y rifampicina+gentamicina (C) en líquido sinovial simulado.

Para determinar la capacidad del método de detectar y cuantificar pequeñas cantidades de rifampicina se determinaron el límite de detección y el límite de cuantificación siguiendo las directrices de la guía “Validación de métodos analíticos” elaborada por el Comité Internacional de Armonización de Requisitos Técnicos para el

Registro de Medicamentos de Uso Humano (111). Para ello se preparan 5 disoluciones con concentraciones decrecientes de rifampicina, próximas al límite de cuantificación y se analizan por HPLC. El límite de detección, o concentración mínima de rifampicina que el método analítico es capaz de detectar se calcula mediante la expresión:

$$L.D = 3,3 * \frac{\sigma}{b}$$

donde “ σ ” es la desviación estándar de la ordenada en el origen de la recta concentraciones/respuesta y “ b ” es la pendiente de esta recta.

El límite de cuantificación, o concentración mínima de rifampicina que el método analítico es capaz de cuantificar de manera exacta y precisa se calcula mediante la expresión:

$$L.D = 10 * \frac{\sigma}{b}$$

En la figura 45 se encuentran representados los resultados obtenidos al analizar las disoluciones de rifampicina. Como se puede observar existe una relación lineal entre los valores de concentración y el área del pico del cromatograma, que se mantienen incluso para la concentración de 0,5 μ g/mL, con un coeficiente de correlación entre ambas variables superior a 0,999. Con los valores de la pendiente de esta recta y de desviación estándar de la ordenada en el origen se obtiene un límite de detección de al menos 0,35 μ g/mL y un límite de cuantificación de al menos 1,05 μ g/mL.

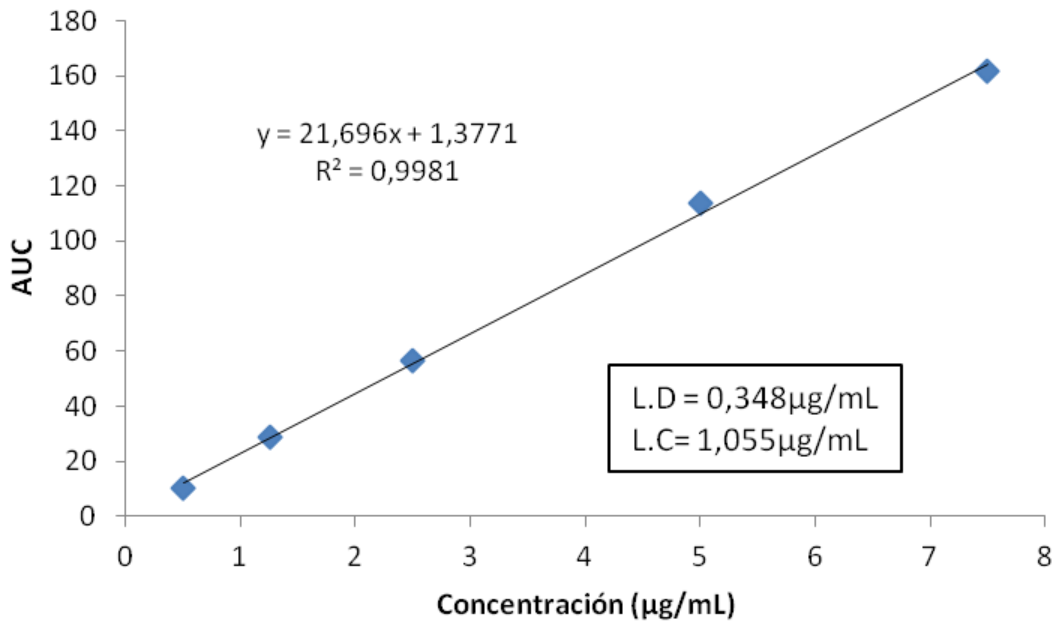


Figura 45: Relación entre la concentración de rifampicina y el área del pico del cromatograma utilizada para la determinación del límite de detección (L.D) y el límite de cuantificación (L.C).

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.6.1. Determinación del tamaño muestral

Para la determinación del tamaño muestral necesario para demostrar diferencias estadísticamente significativas entre grupos se ha empleado el módulo específico del programa Statgraphics Centurion XV® “Módulo de estadística descriptiva” para reducir al mínimo el número de animales empleados. Así, para un nivel de significación del 0,05 y con una potencia del 90%, se determina que un número de 6 animales por grupo permite plantear las pruebas con un elevado poder estadístico aunque se tuviese que descartar un animal como consecuencia del desarrollo experimental del ensayo.

4.6.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software SPSS Statistics®, versión 22.0 para Mac (IBM, NY, USA) considerándose estadísticamente significativos valores de p menores a 0,05. La normalidad de las variables cuantitativas se determinó con el test de Kolmogorov-Smirnov. La comparación entre variables cualitativas se realizó con el test χ^2 y los estudios comparativos antes-después con la prueba de la T para muestras apareadas. La comparación de variables cuantitativas normales con cualitativas dicotómicas se realizó con el test t de Student mientras que la comparación de variables cuantitativas no normales con cualitativas dicotómicas se llevó a cabo con el test U de Mann-Whitney.

5. RESULTADOS

5. 1. DISEÑO 3D DE LAS MESETAS TIBIALES DE CONEJO Y ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA EXTREMIDAD

En la figura 46 se muestran dos cortes, coronal (A) y axial (B), de la TC realizada a la rodilla del conejo. En el corte coronal pueden observarse las superficies tibial y femoral que conforman la articulación y la relación que mantiene la superficie articular tibial con el canal diafisario. En el corte axial puede observarse la morfología triangular de la metáfisis tibial proximal. Sobre ambos cortes pueden verse anotadas las medidas realizadas del diámetro anteroposterior y mediolateral de la metáfisis tibial proximal.

El principal problema encontrado a la hora de diseñar el sistema de anclaje metafisario del inserto tibial fue el pequeño tamaño de la cavidad medular. El diámetro anteroposterior máximo medido en la TC fue de 0,7cm y el diámetro mediolateral máximo de 0,7cm. Además, el canal diafisario de la tibia en estos animales se encuentra medializado respecto a la superficie articular proximal por lo que el “vástago” tibial a diseñar debía ser estrecho y excéntrico.

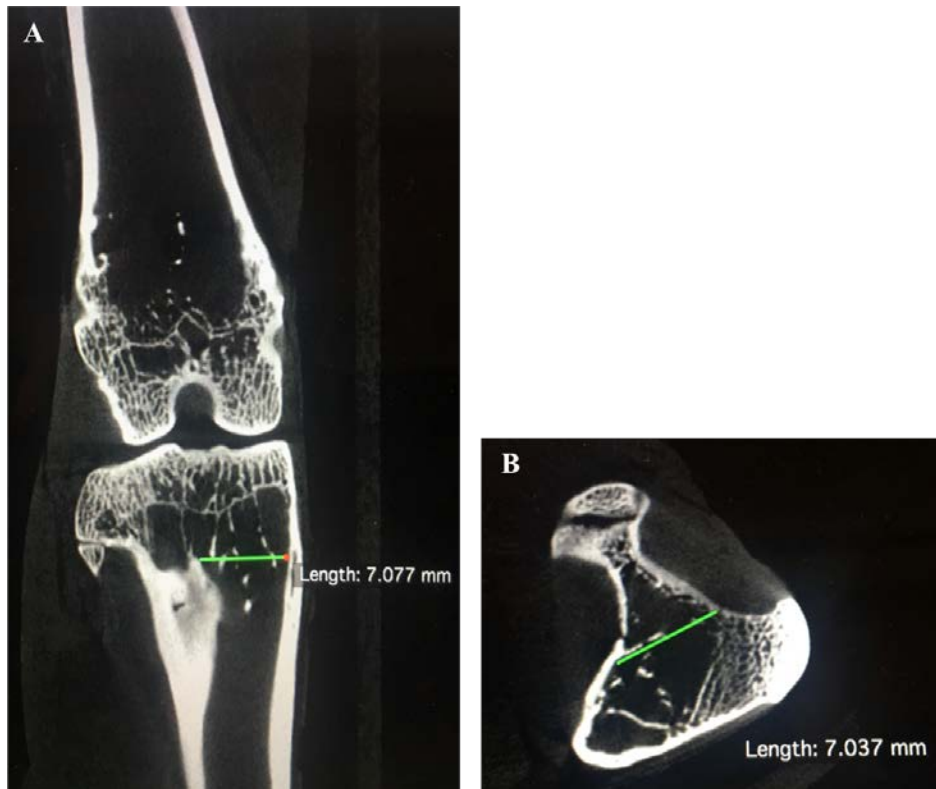


Figura 46: Imágenes de la TC realizada a la rodilla de conejo. A) Corte coronal, B) corte axial.

Se generaron e imprimieron en poliláctico tres diseños diferentes del inserto tibial.

El primer diseño se componía de un único tetón cilíndrico de anclaje diafisario de 2mm de diámetro y 2cm de largo de localización excéntrica. El principal inconveniente de este diseño inicial era que su excesiva longitud hacía imposible su impresión sin rotura del mismo. Otro problema relacionado con la longitud del vástago era que implicaba preparar una gran longitud del canal medular tibial, aumentando el riesgo de fractura perioperatoria (128). Por último, al tratarse de un diseño totalmente cilíndrico no permitía controlar la rotación del componente durante su colocación, dificultando la cementación y aumentando el riesgo de luxación del implante. Las características del primer diseño se encuentran reflejadas en la figura 47.

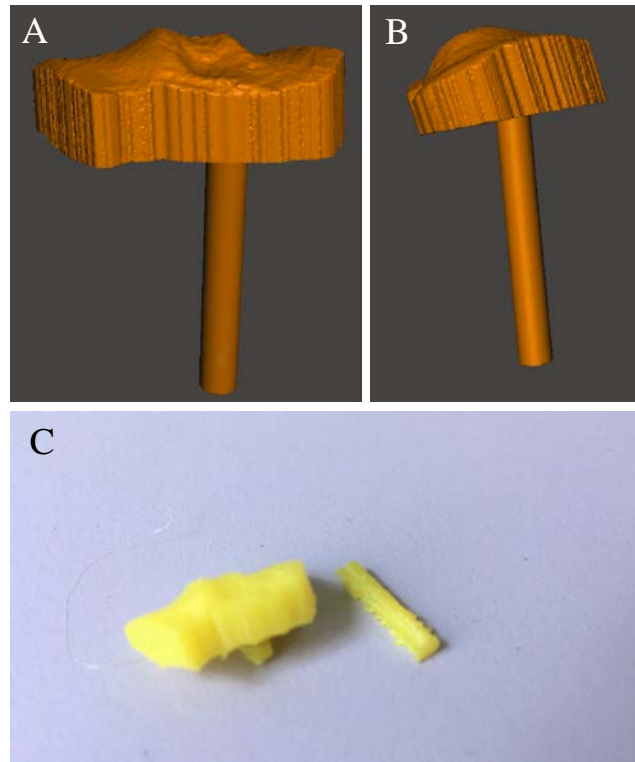


Figura 47: Primer diseño del inserto tibial A) Visión anteroposterior; B) Visión lateral; C) Rotura del material tras impresión 3D con poliláctico.

El segundo diseño constaba de un tetón circular en la misma posición y mismo diámetro que el anterior pero de menor longitud (0,6cm). Además, asociaba dos aletas, medial y lateral que eliminaba el problema inicial de control de la rotación y permitía un anclaje metafisario. Este diseño se desechó por la sospecha de que el borde romo distal dificultaría la inserción en la medular durante la cirugía. Las características de este segundo diseño se encuentran reflejadas en la figura 48.

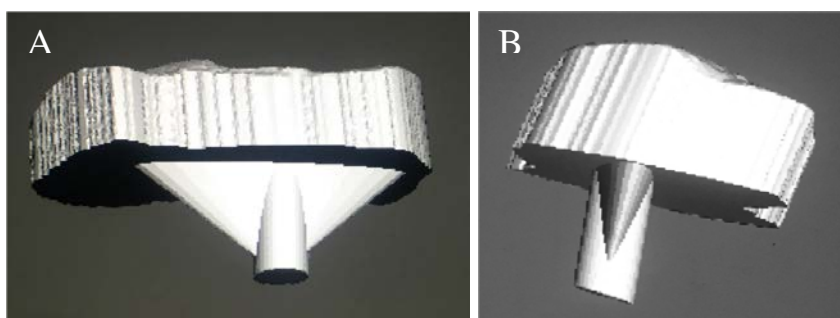


Figura 48: Segundo diseño de inserto tibial. A) Visión anteroposterior; B) visión lateral.

El tercer y último diseño desarrollado estaba compuesto por una única pieza distal en forma de campana de Gauss invertida, eliminándose así la dificultad para la implantación durante la cirugía. Las dimensiones finales del implante definitivo fueron 1,81cm de ancho, 1cm de alto y 1,24cm de profundidad. Se realizó la prueba de impresión en poliláctico sin producirse ninguna incidencia. El implante definitivo puede observarse en la figura 49.

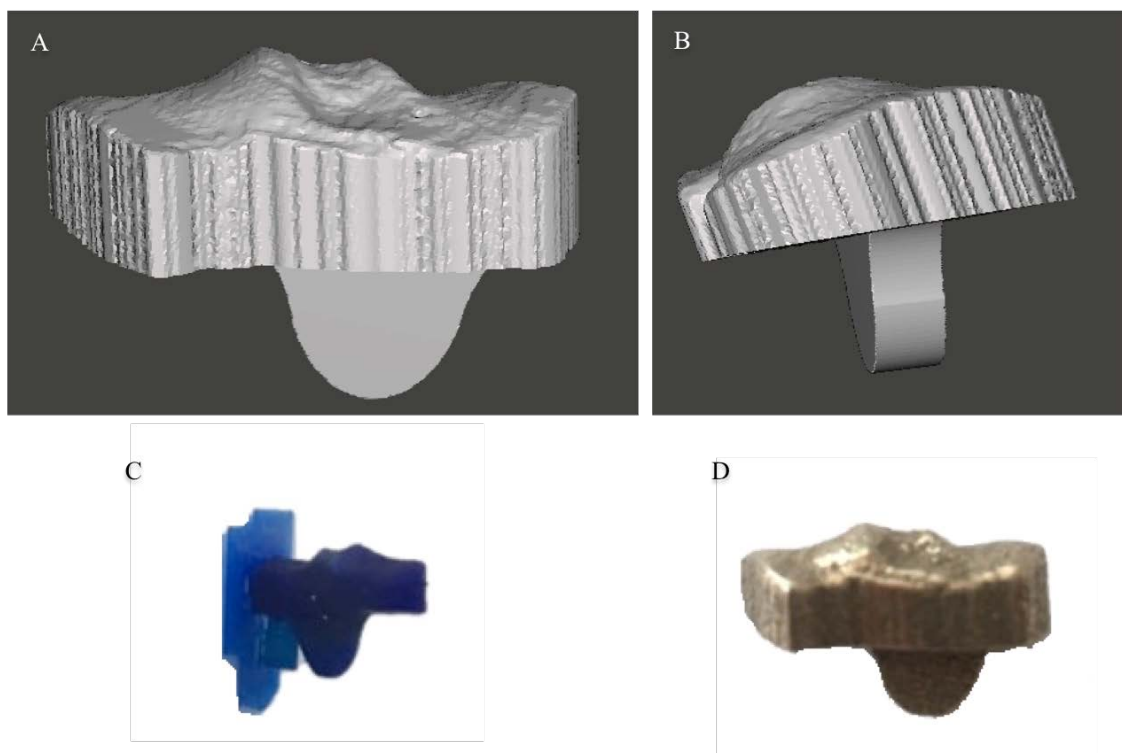


Figura 49: Diseño del inserto definitivo A) Visión anteroposterior; B) Visión lateral; C) Impresión en poliláctico; D) Impresión en acero inoxidable

5. 2. EVALUACIÓN EN EL MODELO ANIMAL DE LA EFICACIA DEL CEMENTO ÓSEO CON MICROCÁPSULAS DE RIFAMPICINA

5. 2. 1. Determinación de la homogeneidad de los grupos de estudio

La determinación analítica, peso y temperatura recogidos el Día 0 del estudio no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. Los valores de significación para cada uno de los parámetros analizados pueden observarse en la tabla 24.

Parámetro basal	\bar{X} (SD)		p
	Controles	Rifampicina	
Peso (kg)	3,42 (0,1)	3,48 (0,1)	0,3
Temperatura (°C)	39,2 (0,5)	38,9 (0,7)	0,4
Hemoglobina (g/dL)	12,3 (0,29)	12,65 (0,51)	0,1
Leucocitos ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	7,2 (1,2)	6,7 (0,67)	0,3
Linfocitos ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	4,7 (1,1)	4,6 (0,72)	0,7
Plaquetas ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	267,2 (81,11)	294,37 (64)	0,4
VSG (mm)	2,5 (0,7)	3,4 (1,5)	0,4
AST (UI/L)	24,6 (20,99)	14,5 (4)	0,3
ALT (UI/L)	46,2 (16,6)	51,8 (14,8)	0,5
Bilirrubina (mg/dL)	0,11 (0,04)	0,11 (0,04)	0,9
Creatinina (mg/dL)	0,84 (0,07)	0,84 (0,08)	0,9

Tabla 24: Valores basales y nivel de significación. VSG: velocidad de sedimentación globular en la primera hora; AST: aspartatoaminotransferasa; ALT: alaninaminotransferasa.

5. 2. 2. Evolución clínica

No se registraron incidencias durante ninguna de las dos intervenciones realizadas ni complicaciones relacionadas con el protocolo anestésico ni analgésico detallado previamente, siendo la recuperación postoperatoria normal en todos los animales.

Tras la primera cirugía, en la que se realizó la inoculación de *S. aureus*, no se identificaron modificaciones en el consumo de agua y comida respecto al consumo basal en ninguno de los animales. Tampoco se identificó ningún signo de sufrimiento animal. En cinco de los animales (C1, C4, C5, R3 y R6) fue necesario reforzar el vendaje por manipulaciones por parte del animal. R4 desarrolló un edema de ventana por excesiva tensión del vendaje que requirió cambio del mismo.

Dos días tras el primer tiempo de recambio se registró una disminución de la ingesta de agua y comida mayor del 25% por parte de C4, perteneciente al grupo de controles. Durante el segundo día postoperatorio se detectó la parálisis de los miembros inferiores de dicho animal y el desarrollo de enterotoxemia por lo que se decidió realizar la eutanasia anticipada del animal. El resto de los animales no presentaron modificaciones en la ingesta de agua y comida respecto a sus valores basales en ningún momento del estudio, no se detectó ningún signo de sufrimiento animal y todos realizaron movilización activa de la extremidad intervenida con carga sobre la misma.

La monitorización de peso solo mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos en el momento del primer tiempo de recambio protésico, siendo superior el peso en el grupo de rifampicina con $p=0,02$. La temperatura media registrada no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de experimentación en ninguno de los momentos de estudio. En las figuras 50 y 51 pueden

observarse la representaciones gráficas de la evolución de ambos parámetros a lo largo del estudio, los valores medios se encuentran resumidos en las tablas 25 y 26. Los valores registrados de ambas variables en cada uno de los animales a lo largo del estudio pueden encontrarse en las tablas 27 y 28 en el Anexo.

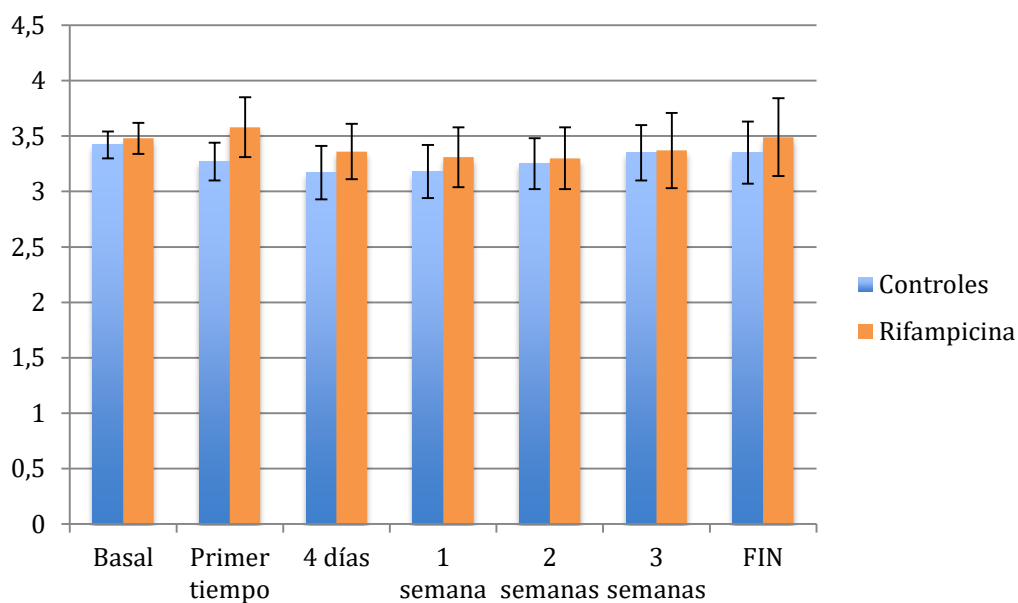


Figura 50: Evolución de la media del peso (kg) en los dos grupos de estudio

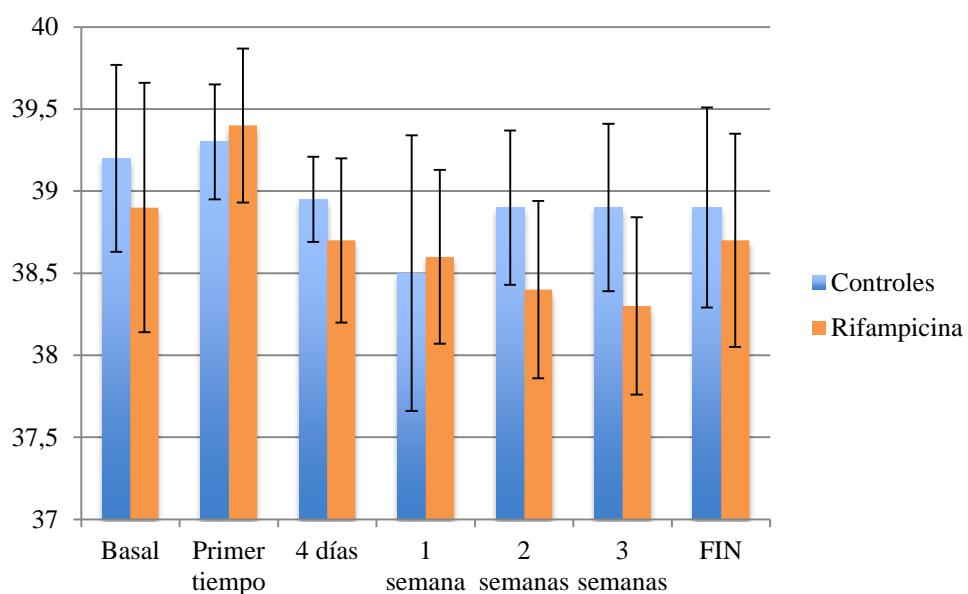


Figura 51: Evolución de la media de temperatura (°C) en ambos grupos de estudio

Parámetro basal	\bar{X} (SD)		p
	Controles	Rifampicina	
Peso basal	3,42 (0,1)	3,48 (0,1)	0,3
Peso primer tiempo	3,27 (0,1)	3,58 (0,2)	0,02
Peso 4 días	3,17 (0,2)	3,36 (0,2)	0,1
Peso 1 semana	3,18 (0,2)	3,31 (0,2)	0,3
Peso 2 semanas	3,25 (0,2)	3,3 (0,2)	0,7
Peso 3 semanas	3,35 (0,2)	3,37 (0,3)	0,9
Peso fin	3,35 (0,2)	3,49 (0,3)	0,4

Tabla 25: Valores medios y nivel de significación del peso (kg) a lo largo del ensayo en ambos grupos de estudio.

Parámetro basal	\bar{X} (SD)		p
	Controles	Rifampicina	
Temperatura basal	39,2 (0,5)	38,9 (0,7)	0,4
Temperatura primer tiempo	39,3 (0,3)	39,4 (0,4)	0,5
Temperatura 4 días	38,9 (0,2)	38,7 (0,5)	0,2
Temperatura 1 semana	38,5 (0,8)	38,6 (0,5)	0,6
Temperatura 2 semanas	38,9 (0,4)	38,4 (0,5)	0,057
Temperatura 3 semanas	38,9 (0,5)	38,3 (0,5)	0,06
Temperatura fin	38,9 (0,6)	38,7 (0,6)	0,5

Tabla 26: Valores medios y nivel de significación de la temperatura (°C) a lo largo del ensayo en ambos grupos de estudio.

5. 2. 3. Diagnóstico de infección

I. Parámetros hematológicos

Para el diagnóstico de infección peri-implante se analizaron, una semana después de la inoculación intra-articular de 10^5 CFU/mL de *S. aureus*, el recuento

leucocitario y linfocitario, recuento plaquetario y la VSG en la primera hora tal como se ha descrito previamente. La comparación con los valores basales mostró diferencias estadísticamente significativas en el recuento leucocitario, linfocitario y plaquetario con $p=0,0001$ en todos los casos. Los valores medios de dichas variables en cada grupo de estudio, así como su significación estadística, se encuentran reflejados en la tabla 29.

Parámetro	\bar{X} (rango)		p
	Valor basal	1 semana tras inoculación	
Leucocitos ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	7,02 (6-9,2)	11,39 (8,5-19,3)	0,0001
Linfocitos (%)	65,8 (51,9-75,2)	32,1 (21,2-44,9)	0,0001
Plaquetas ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	281,73 (191-439)	694 (412-882)	0,0001
VGS (mm)	3,14 (2-5)	5 (2-16)	0,37

Tabla 29: Modificación de parámetros hematológicos y bioquímicos 1 semana tras la inoculación de *S. aureus*.

Para comprobar la homogeneidad de los dos grupos de experimentación después de la infección del implante se compararon los valores tras 1 semana de la infección, encontrándose exclusivamente diferencias estadísticamente significativas entre grupos en el recuento plaquetario, siendo mayor en el grupo de rifampicina con $p=0,02$. Los resultados de dicho análisis y su grado de significación estadística se encuentran reflejados en la tabla 30.

Parámetro	\bar{X} (rango)		p
	Control	Rifampicina	
Leucocitos ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	11,1 (8,6-19,3)	11,6 (8,5-13,7)	0,8
Linfocitos (%)	33,4 (27,6-44,9)	31,1 (21,2-41)	0,5
Plaquetas ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	612,1 (412-769)	776 (660-882)	0,025
VGS (mm)	9 (2-16)	3,4 (2-5)	0,2

Tabla 30: Análisis de la homogeneidad de los grupos de experimentación tras la infección.

II. Parámetros microbiológicos

Durante el primer tiempo de recambio protésico se analizaron 3 muestras por cada uno de los animales procedentes de hueso, el inserto y partes blandas. No se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en el número de colonias aisladas tras la inoculación de 10^5 CFU de *S. aureus* en ninguna de las muestras analizadas (tabla 31).

Muestra	\bar{X} (SD)		p
	Control	Rifampicina	
Meseta	$4,3 \cdot 10^5$ ($1,03 \cdot 10^6$)	$9,8 \cdot 10^5$ ($1,8 \cdot 10^6$)	0,1
Hueso	$1,5 \cdot 10^7$ ($3,9 \cdot 10^7$)	$5,5 \cdot 10^6$ ($5,5 \cdot 10^6$)	0,52
Partes blandas	$3,3 \cdot 10^7$ ($7,7 \cdot 10^7$)	$2,6 \cdot 10^6$ ($5 \cdot 10^6$)	0,29

Tabla 31: Resultados microbiológicos (CFU) una semana después de la infección.

La representación gráfica de los resultados puede observarse en la figura 52 y los resultados individuales de cada uno de los animales se encuentran resumidos en la tabla 32 en el Anexo.

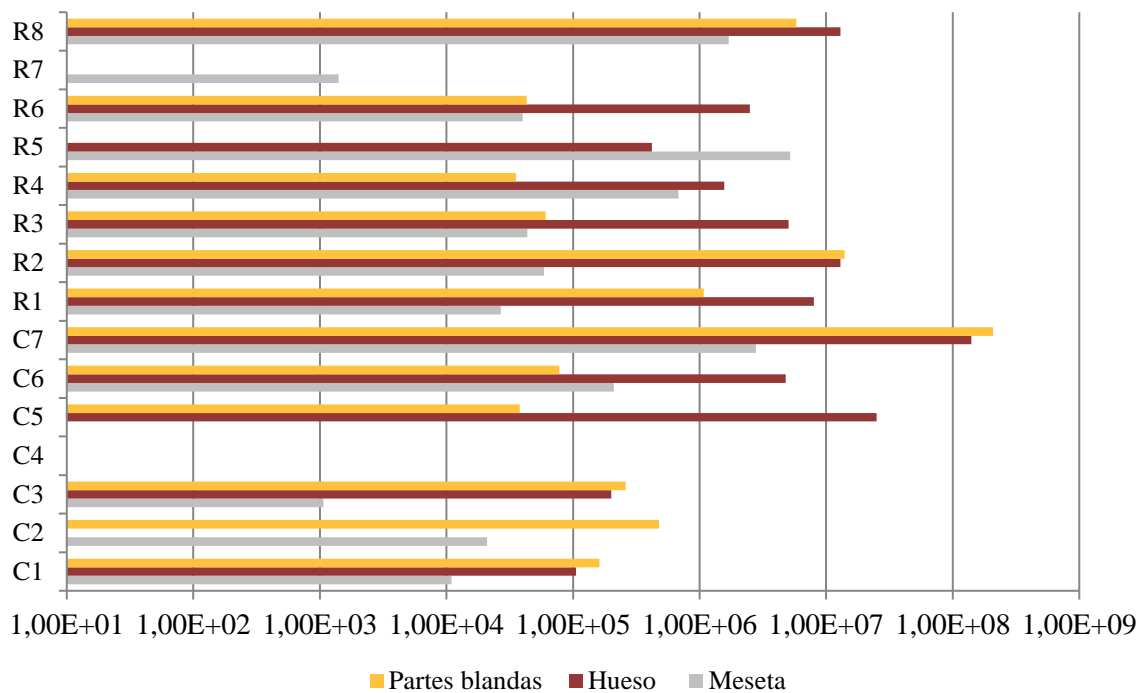


Figura 52: CFUs aisladas en cada uno de los animales tras el primer tiempo de recambio protésico en partes blandas, hueso y meseta tibial.

III. Parámetros clínicos

En el primer tiempo de recambio se registró el aspecto macroscópico de la rodilla infectada de cada uno de los animales. Se encontró una fístula cutánea en 4 animales, sinovitis en 5 animales y pus franco en la articulación sin fístula asociada en otros 5 animales. Sólo uno de ellos (Control 4) presentó escasa reacción tisular a la inoculación de *S. aureus*.

En la figura 53 pueden apreciarse uno de los casos de fístula cutánea y otro con pus intra-articular.

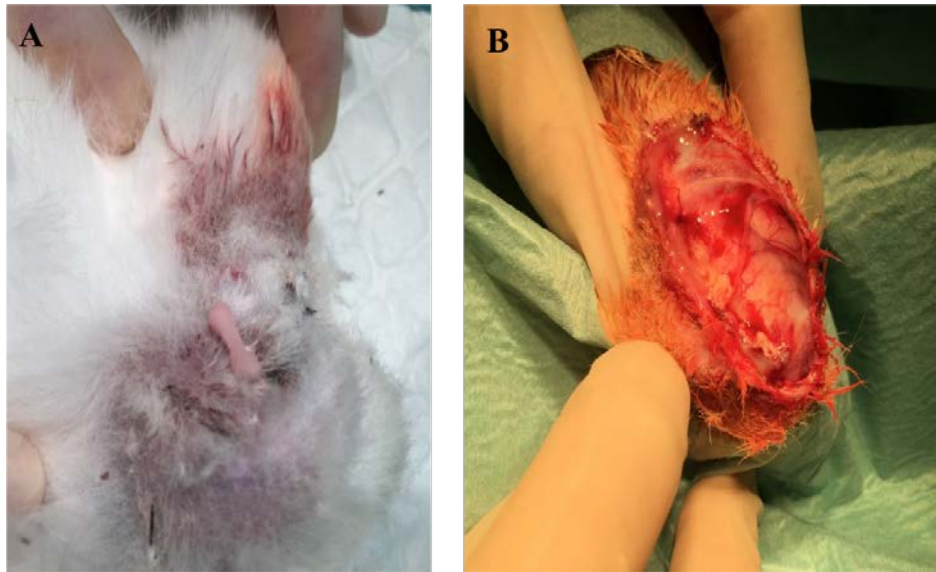


Figura 53: A) Fístula cutánea en rodilla infectada con salida de pus (R7). B) Ocupación articular por pus, exposición tras apertura cutánea antes de hacer la artrotomía (C2).

Las características macroscópicas intra-articulares de cada uno de los animales se encuentran reflejadas en la tabla 33. Se identificó pus intra-articular en el 14% de los animales del grupo control frente al 50% del grupo de rifampicina. Se identificó una fístula cutánea en el 28,5% de los animales del grupo control y en el 25% del grupo de rifampicina.

Animal	Aspecto macroscópico
C1	Sinovitis
C2	Fístula
C3	Fístula
C4	Escasa reacción tisular
C5	Esfacelos y sinovitis
C6	Pus intra-articular
C7	Sinovitis
R1	Pus intra-articular
R2	Pus intra-articular y sinovitis
R3	Pus intra-articular
R4	Fístula
R5	Sinovitis
R6	Sinovitis
R7	Fístula
R8	Pus intra-articular
Tabla 33: Aspecto macroscópico de la articulación tras 1 semana de la inoculación de <i>S. aureus</i> .	

Dados los resultados clínicos y hematológicos expuestos previamente y los resultados microbiológicos detallados en este apartado se estableció el diagnóstico de infección en 14 de los 15 animales de experimentación (93,3%), a excepción de C4 perteneciente al grupo de controles. Los valores de los parámetros definatorios de infección de cada uno de los animales de experimentación se encuentran reflejados en la tabla 34.

Animal	Leucocitos (10 ³ /mm ³)	Linfocitos (%)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	VSG (mm)	Nº cultivos positivos	Fístula	Estado
C1	9,1	34,6	412		+ 3	NO	Infectado
C2	9,8 *	44,9	769 *		+ 2	SI	Infectado
C3	8,9	27,5 *	568		+ 3	SI	Infectado
C4					0	NO	No infectado
C5	8,6	37,3	564	2	+ 2	NO	Infectado
C6	11,3 *	28,8 *	749 *	16 *	+ 3	NO	Infectado
C7	19,3 *	27,6 *	611		+ 3	NO	Infectado
R1	13,7 *	25,2 *	775 *		+ 3	NO	Infectado
R2	13,3 *	21,2 *	732 *	3	+ 3	NO	Infectado
R3		28,9 *			+ 3	NO	Infectado
R4		28,2 *			+ 3	SI	Infectado
R5	11 *	40,4	824 *	5	+ 2	NO	Infectado
R6	12,2 *	28,4 *	783 *	2	+ 3	NO	Infectado
R7	11 *	41	660 *	3	+ 1	SI	Infectado
R8	8,5	36	882 *	4	+ 3	NO	Infectado

Tabla 34: Parámetros hematológicos, microbiológicos y clínicos definitorios de infección en cada uno de los animales 1 semana tras la inoculación. * Valores sobre el punto de corte definitorio de infección

5. 2. 4. Evaluación de la eficacia y toxicidad del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina

5. 2. 4. 1. Determinación de la liberación intra-articular de rifampicina

Tras la colocación del espaciador se realizó la toma de muestras intra-articulares a través del redon en los animales del grupo R. A las 6 horas de la cirugía se obtuvo líquido intra-articular de R1, R2, R4, R5, R6 y R7. A las 24 horas se consiguió líquido a través del drenaje de R1, R3, R4 y mediante punción intra-articular de R8 y R2. En este momento se encontró el vendaje de R2 suelto, mordisqueado y el drenaje en el suelo de la jaula. A las 48 horas se obtuvo líquido articular de R1 y R3, a igual que a las 72 horas.

Las muestras de líquido intraarticular se analizaron por HPLC y se obtuvieron los valores de concentración de rifampicina recogidos en la tabla 35, la representación gráfica de los resultados se encuentra en la figura 54.

Animal	Concentración de rifampicina ($\mu\text{g/mL}$)			
	6h	24h	48h	72h
R1	102,63	167,07	72,39	45,13
R2	193,15	145,2	--	--
R3	--	101,68	53,41	67,82
R4	403,13	251,1	--	--
R5	144,91	--	--	--
R6	453,95	--	--	--
R7	211,86	--	--	--
R8	594,79	92,83	--	--
X	300,63	151,57	62,9	56,47

Tabla 35: Resultados de la cuantificación de rifampicina en líquido intraarticular.

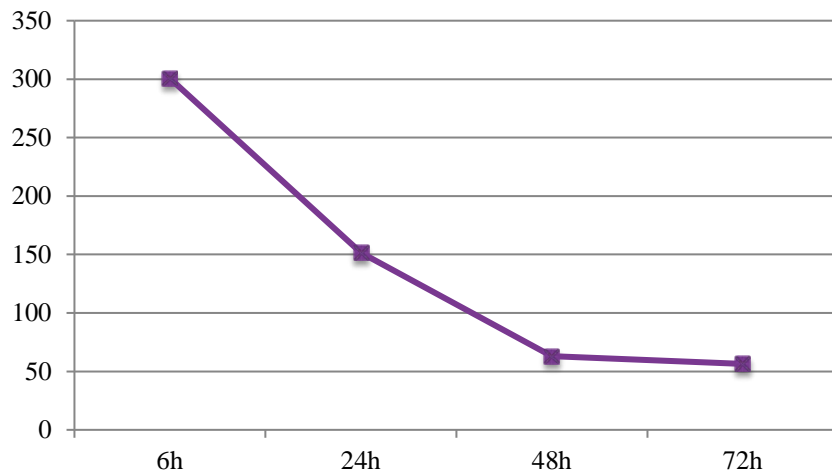
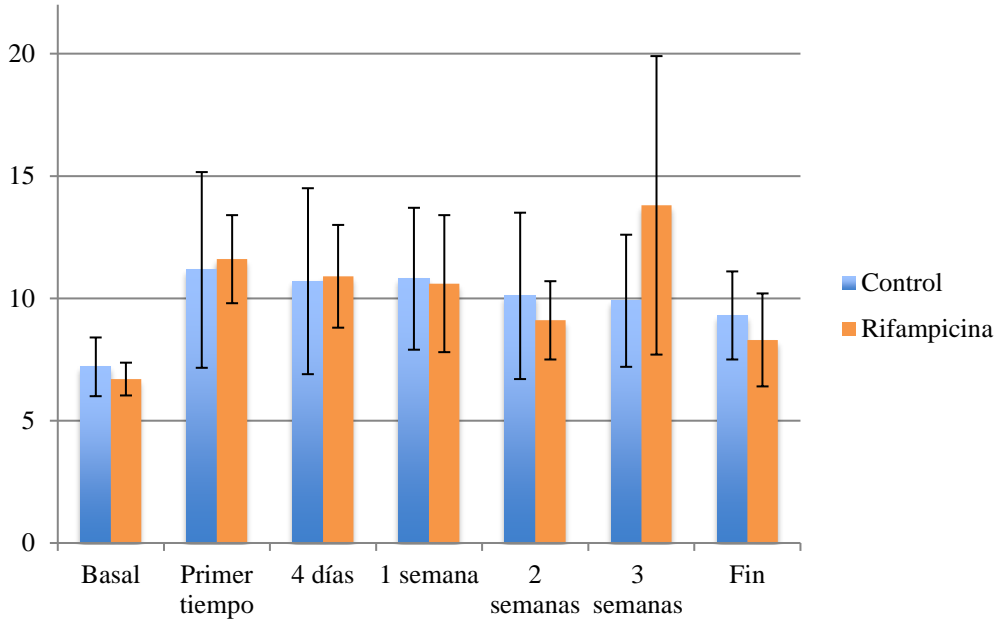


Figura 54: Representación gráfica de la concentración de rifampicina ($\mu\text{g/mL}$) intra-articular

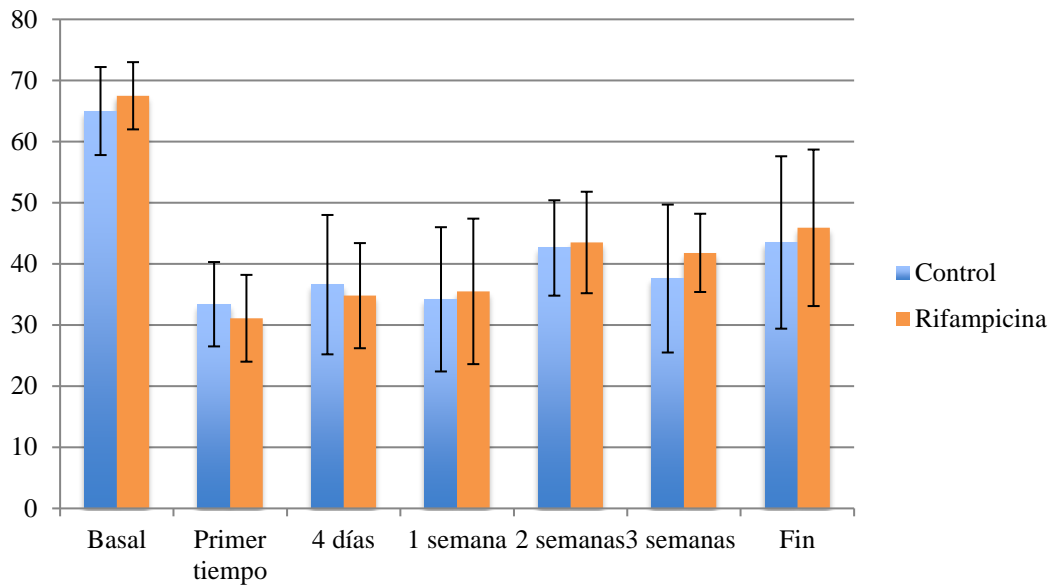
5. 2. 4. 2. Curso evolutivo de los parámetros hematológicos definitorios de infección

En la figura 55 puede observarse la evolución de los parámetros inflamatorios a lo largo del estudio. Los datos correspondientes a cada grupo de estudio y su nivel de significación se encuentran reflejados en la tabla 36. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en ningún momento del estudio. En las tablas 37-40, en el anexo, se encuentran reflejados los valores registrados de cada uno de los animales.

Leucocitos ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)



Linfocitos (%)



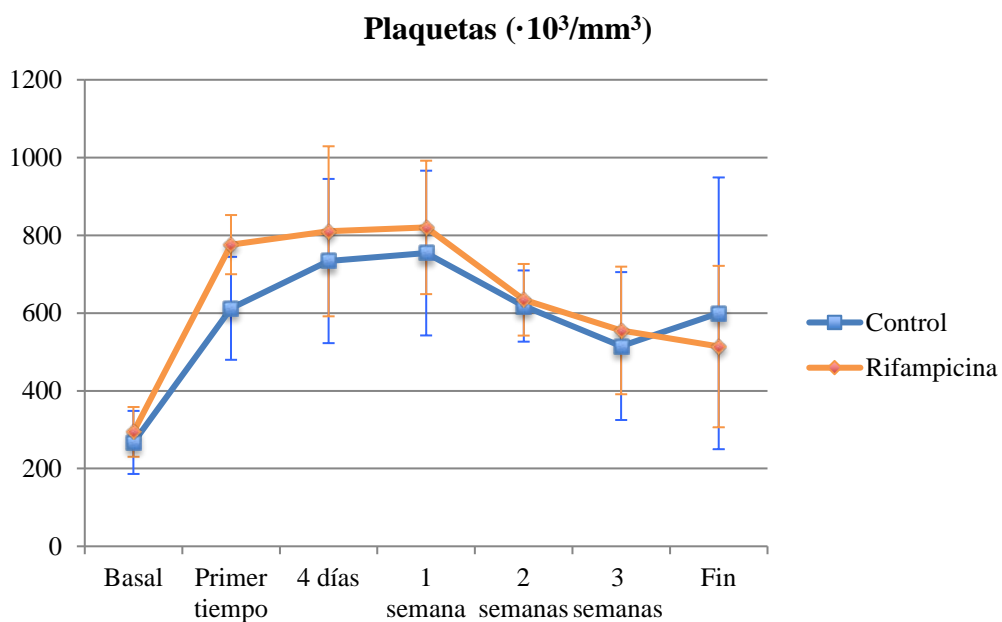
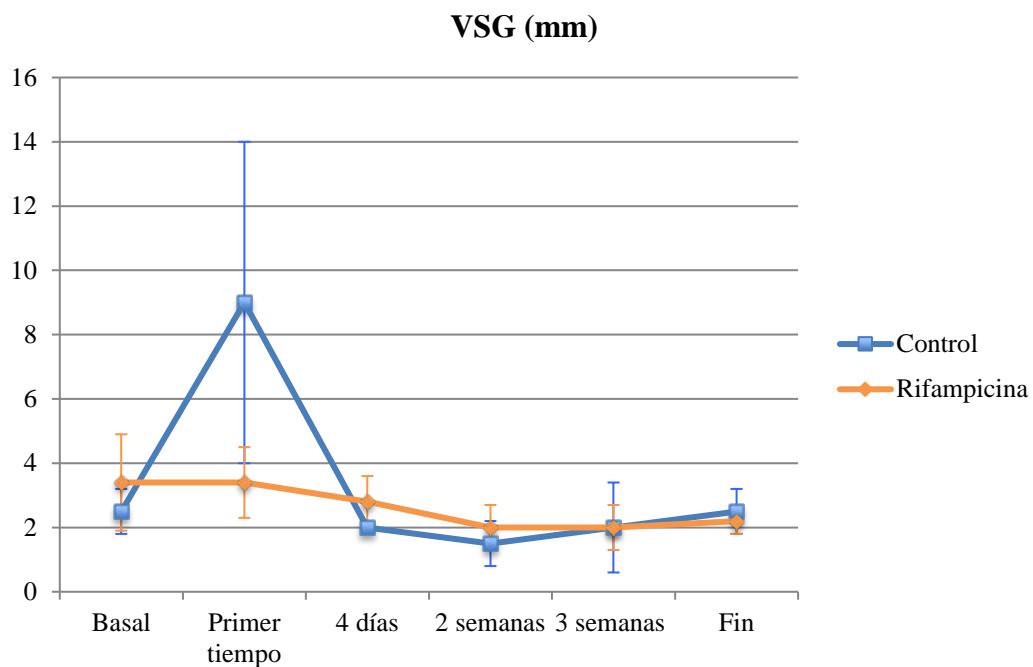


Figura 55: Evolución de la VSG en la primera hora (mm), leucocitos ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$), linfocitos (%) y número de plaquetas ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$) a lo largo del estudio.

Parámetro		\bar{X} (rango)		p
		Control	Rifampicina	
4 días	Leucocitos ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	10,71 (8,2-18,5)	10,96 (7,4-14,2)	0,8
	Linfocitos (%)	36,6 (21,7-45,6)	34,8 (24,4-46,7)	0,7
	Plaquetas ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	733,8 (331-930)	810, 3 (392-1167)	0,5
	VGS (mm)	2 (2-2)	2,8 (2-4)	0,2
1 semana	Leucocitos ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	10,8 (7,7-14,8)	10,6 (7,3-15,5)	0,9
	Linfocitos (%)	34,2 (19,9-51,6)	35,5 (13,3-52,9)	0,8
	Plaquetas ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	754,3 (507-1104)	820, 3 (515-1092)	0,5
2 semanas	Leucocitos ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	10,1 (7,3-16,7)	9,1 (6,7-11,3)	0,4
	Linfocitos (%)	42,6 (34,3-54,6)	43,5 (30,4-52,5)	0,8
	Plaquetas ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	618 (497-773)	634,1 (476-749)	0,7
	VGS (mm)	1,5 (1-2)	2 (1-3)	0,4
3 semanas	Leucocitos ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	9,9 (6-13,1)	13,8 (7,6-25)	0,1
	Linfocitos (%)	37,6 (22-43,3)	41,8 (34-50)	0,4
	Plaquetas ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	515,1 (376-894)	555,2 (380-858)	0,6
	VGS (mm)	2 (1-3)	2 (1-3)	1
Fin	Leucocitos ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	9,3 (7,6-12,6)	8,3 (5,9-11,2)	0,3
	Linfocitos (%)	43,5 (25,7-63,4)	45,9 (27,3-60,3)	0,7
	Plaquetas ($\cdot 10^3/\text{mm}^3$)	599,3 (351-1281)	513,8 (314-979)	0,5
	VGS (mm)	2,5 (2-3)	2,2 (2-3)	0,5

Tabla 36: Evolución de los parámetros inflamatorios en cada uno de los grupos a lo largo del estudio.

5. 2. 4. 3. Diagnóstico de infección tras 4 semanas de la colocación del espaciador

- **Parámetros hematológicos**

Antes de la eutanasia de los animales se realizó la última toma de muestras sanguíneas para definir de nuevo el recuento leucocitario y linfocitario, recuento plaquetario y la VSG en la primera hora en cada uno de los grupos de experimentación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de experimentación en ninguno de los parámetros analizados. Los resultados de dicho análisis pueden encontrarse en la tabla 41.

Parámetro	\bar{X} (rango)		p
	Control	Rifampicina	
Leucocitos ($\cdot 10^3/\mu\text{L}$)	9,3 (7,6-12,6)	8,3 (5,9-11,2)	0,3
Linfocitos (%)	45,5 (25,7-63,4)	45,9 (27,3-60,3)	0,7
Plaquetas ($\cdot 10^3/\mu\text{L}$)	599, 3 (361-1281)	513,8 (314-979)	0,5
VGS (mm)	2,5 (2-3)	2,2 (2-3)	0,5

Tabla 41: Parámetros hematológicos definitorios de infección en cada uno de los grupos de experimentación al final del estudio.

La comparación entre los valores de estas variables al inicio y al final del estudio muestra diferencias estadísticamente significativas en el número de leucocitos, porcentaje de linfocitos y número de plaquetas, siendo estos valores más elevados al final del estudio con $p=0,001$, $p<0,001$ y $p=0,001$ respectivamente. A pesar de esta ausencia de normalización de los parámetros hematológicos todos los valores medios registrados se encontraron por debajo de los puntos corte definitorios de infección. Los resultados y sus valores de significación se encuentran reflejados en la tabla 42.

Parámetro	\bar{X} (rango)		p
	Valor basal	Fin (4S postinoculación)	
Leucocitos ($\cdot 10^3/\mu\text{L}$)	7,02 (6-9,2)	8,79 (5,9-12,6)	0,001
Linfocitos (%)	66,38 (51,9-75,2)	44,92 (25,7-63,4)	<0,001
Plaquetas ($\cdot 10^3/\mu\text{L}$)	281,7 (191-439)	550,5 (314-1281)	0,001
VGS (mm)	3,1 (2-5)	2,2 (2-3)	0,22

Tabla 42: Modificación de los valores hematológicos entre el día 0 y el final del estudio.

En la tabla 43 se encuentran reflejados los resultados de la comparación de las variaciones de los resultados hematológicos definitorios de infección entre el día 0 y el final del estudio. Tampoco en este caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros analizados.

Parámetro	\bar{X} (rango)		p
	Control	Rifampicina	
Leucocitos ($\cdot 10^3/\mu\text{L}$)	2,1 (0,8-3,4)	1,5 (-0,6-4,9)	0,4
Linfocitos (%)	19,9 (9,1-33,5)	21,6 (6,3-37,5)	0,7
Plaquetas ($\cdot 10^3/\mu\text{L}$)	326,6 (92-842)	219,5 (47-555)	0,3
VGS (mm)	0 (-1-1)	-1,2 (-3-1)	0,4

Tabla 43: Análisis antes-después de los valores hematológicos entre el día 0 y el final del estudio en cada uno de los grupos experimentales.

- **Parámetros microbiológicos**

Tras la eutanasia del animal se analizaron 3 muestras por cada uno de los animales procedentes de hueso, cemento y partes blandas mediante la técnica descrita en el apartado 4.5. “Metodología analítica”. En tres de los animales (C1, C3 y R1) no se encontró el espaciador al realizar la artrotomía. Todos ellos presentaron una erosión

cutánea con fondo limpio sin comunicación con la articulación en el momento de la eutanasia.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de experimentación en el recuento de CFU de las muestras de hueso y partes blandas con $p=0,031$ y $p=0,01$ respectivamente, siendo inferior en el grupo de animales tratados con cemento con microcápsulas de rifampicina. Los valores de dicho análisis pueden observarse en la tabla 44.

Muestra	\bar{X} (DS)		p
	Control	Rifampicina	
Espaciador	$1,09 \cdot 10^2$ ($2,19 \cdot 10^2$)	$3,6 \cdot 10^2$ ($7,4 \cdot 10^2$)	0,71
Hueso	$5,7 \cdot 10^2$ ($1,2 \cdot 10^3$)	0	0,031
Partes blandas	$2,3 \cdot 10^4$ ($5,6 \cdot 10^4$)	0	0,01

Tabla 44: Resultados microbiológicos (CFU) al final del estudio (4 semanas tras el primer tiempo de recambio).

La representación gráfica de los resultados puede observarse en la figura 56 y los resultados individuales de cada uno de los animales se encuentran resumidos en la Tabla 45 del Anexo.

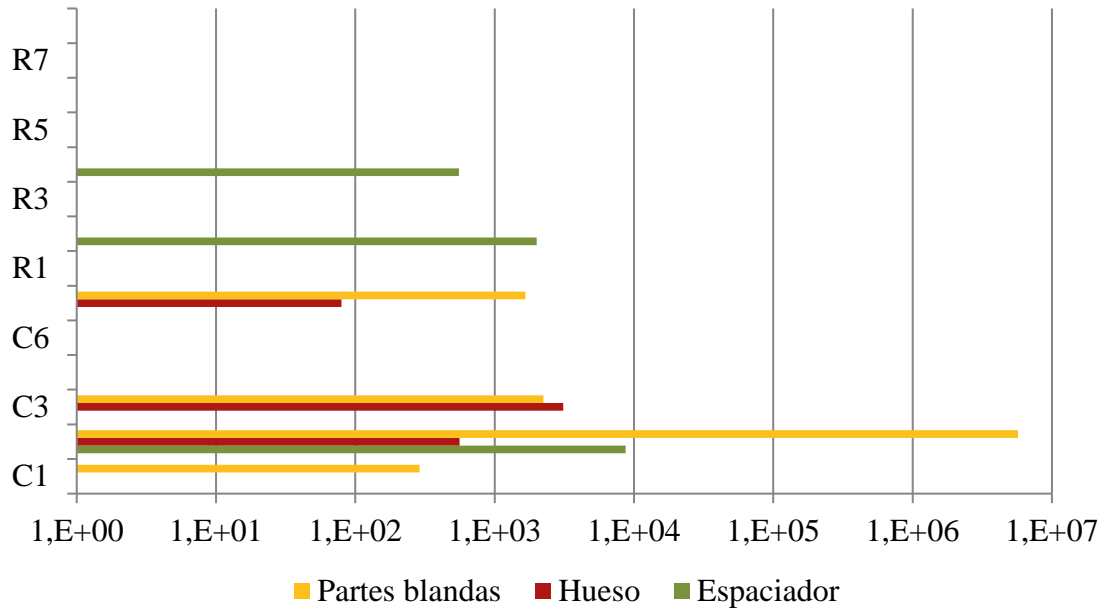


Figura 56: CFUs aisladas de partes blandas, hueso y espaciador al final del estudio.

- **Parámetros clínicos**

Se registró el aspecto macroscópico de la rodilla infectada de cada uno de los animales al final del estudio (4 semanas después de la implantación del espaciador de cemento). En 4 de los animales (C1, C2, C3 y R1) se encontró una erosión cutánea de fondo limpio con indicios de cicatrización sin comunicación con la articulación. C7 y R2, presentaron una dehiscencia de la herida con exposición del tendón rotuliano. En el resto de animales (C5, C6, R4 y R5) no se encontraron signos macroscópicos sugestivos de infección, de encontrarse fístula en el momento del primer tiempo esta estaba cerrada y no se encontró ocupación alguna de la articulación.

Los resultados se encuentran reflejados en la tabla 46.

Animal	Aspecto macroscópico
C1	Erosión cutánea de fondo limpio sin comunicación articular
C2	Erosión cutánea de fondo limpio sin comunicación articular
C3	Erosión cutánea de fondo limpio sin comunicación articular
C4	-
C5	Herida cicatrizada sin signos flogóticos
C6	Herida cicatrizada sin signos flogóticos
C7	Dehiscencia herida con exposición de rotuliano
R1	Erosión cutánea de fondo limpio sin comunicación articular
R2	Dehiscencia de herida
R3	Herida cicatrizada sin signos flogóticos
R4	Herida cicatrizada sin signos flogóticos
R5	Lesión costrosa, sin signos flogóticos
R6	Herida cicatrizada sin signos flogóticos
R7	Herida cicatrizada sin signos flogóticos
R8	Lesión costrosa, sin signos flogóticos
Tabla 46: Aspecto macroscópico de la articulación tras 4 semanas de la implantación del espaciador de cemento.	

Dados los resultados clínicos y hematológicos expuestos previamente y los resultados microbiológicos detallados en este apartado se estableció el diagnóstico de infección 4 de los 14 animales de experimentación que terminaron el estudio, 3 de ellos (C2, C3 y C7) correspondientes al grupo control, lo que supone el 50%, y uno (R2) al grupo de cemento con microcápsulas de rifampicina, es decir, lo que supone el 12,5%. Los valores de los parámetros definitorios de infección de cada uno de los animales de experimentación se encuentran reflejados en la tabla 47.

Animal	Leucocitos (10 ³ /mm ³)	Linfocitos (%)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	VSG (mm)	Nº cultivos positivos	Fístula	Estado
C1	7,8	34,6	361		+ 1	NO	No infectado
C2	10 *	44,9	447		+ 3	NO	Infectado
C3	9	27,5 *	620		+ 2	NO	Infectado
C4							
C5	7,6	37,3	351	3	0	NO	No infectado
C6	9,2	28,8 *	536	2	0	NO	No infectado
C7	12,6 *	27,6 *	1281 *		+ 2	NO	Infectado
R1	11*	25,2*	588		0	NO	No infectado
R2	11,2*	21,2*	488	3	+ 1	NO	Infectado
R3	7,1	28,9 *	463		0	NO	No infectado
R4	9,1	28,2 *	360		+ 1	NO	No infectado
R5	7,5	40,4	314	2	0	NO	No infectado
R6	7,6	28,4 *	979 *	2	0	NO	No infectado
R7	7,5	41	399	2	0	NO	No infectado
R8	5,9	36	520	2	0	NO	No infectado

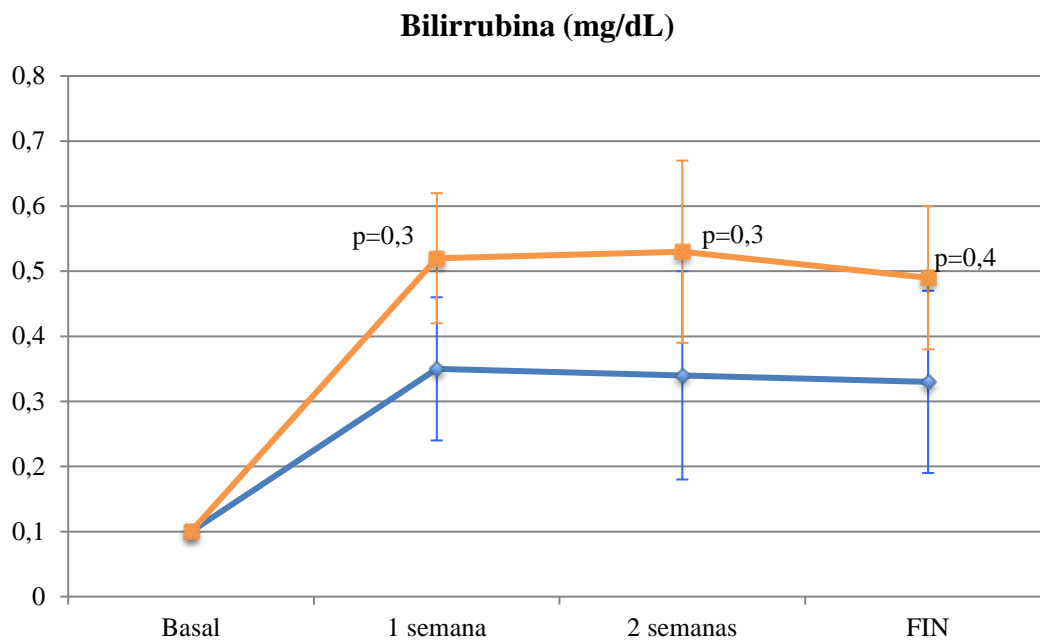
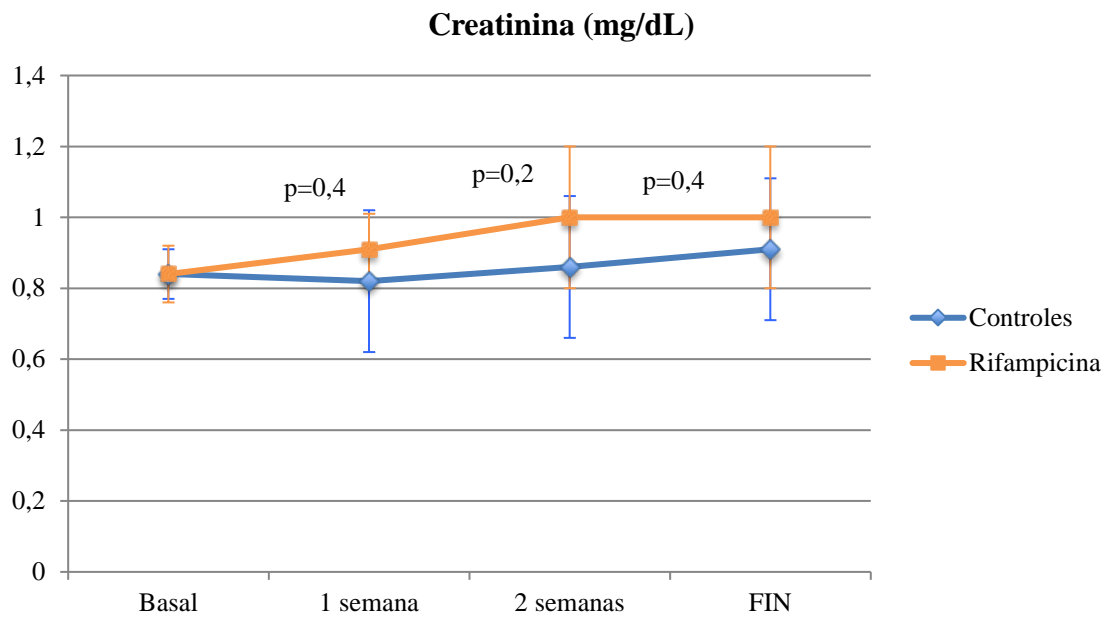
Tabla 47: Parámetros hematológicos, microbiológicos y clínicos definitorios de infección en cada uno de los animales al final del estudio.

* Valores sobre el punto de corte definitorio de infección

5. 2. 5. Determinación de la toxicidad sistémica de la rifampicina

Para determinar el posible paso a sangre de la rifampicina liberada desde el espaciador de cemento se recogieron muestras de sangre el día 11 del ensayo, es decir, a las 72 horas de la implantación del espaciador de cemento. El análisis de dicho suero mediante HPLC no detectó presencia de rifampicina en sangre en ninguno de los animales del grupo R.

Para la determinación de la posible toxicidad renal y hepática como consecuencia de la distribución sistémica de la rifampicina liberada a partir del cemento se realizaron determinaciones analíticas, en ambos grupos de estudio, de creatinina, bilirrubina total, AST y ALT a la semana de la colocación del espaciador de cemento, a las 2 semanas y a las 4 semanas, coincidiendo con la eutanasia del animal. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación en ninguna de las variables estudiadas y en ninguno de los momentos de análisis. En la figura 57 puede observarse la representación gráfica de la evolución de estos parámetros con sus niveles de significación en cada uno de los grupos de estudio. Los valores de dichas variables a las 1, 2 y 4 semanas de la colocación del espaciador se encuentran en las tablas 48-50 mientras que los resultados individuales de cada animal se encuentran reflejados en las tablas 51 y 52 en el Anexo.



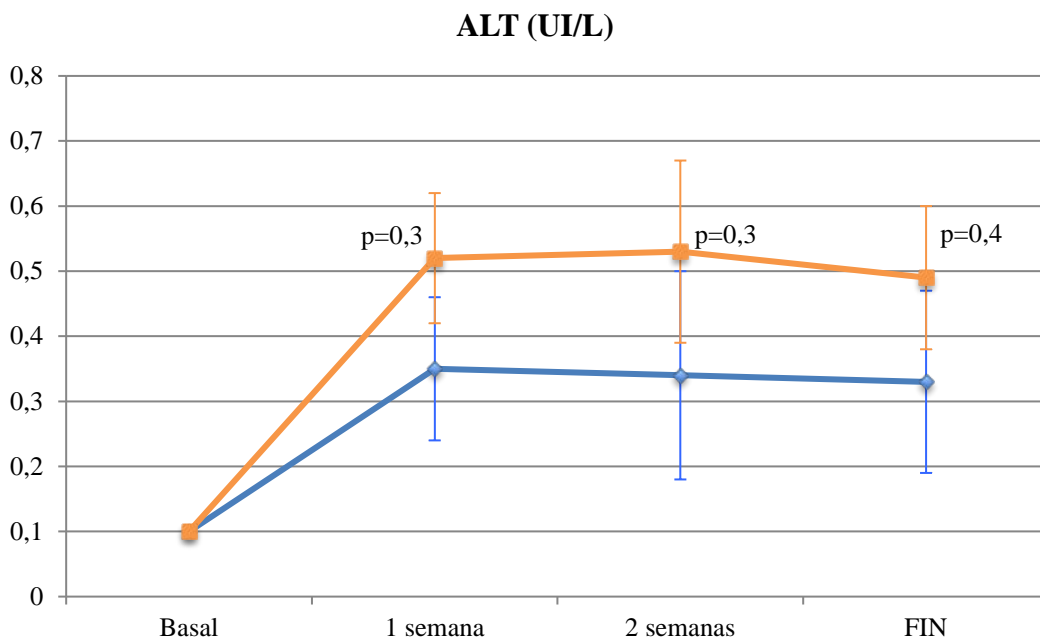
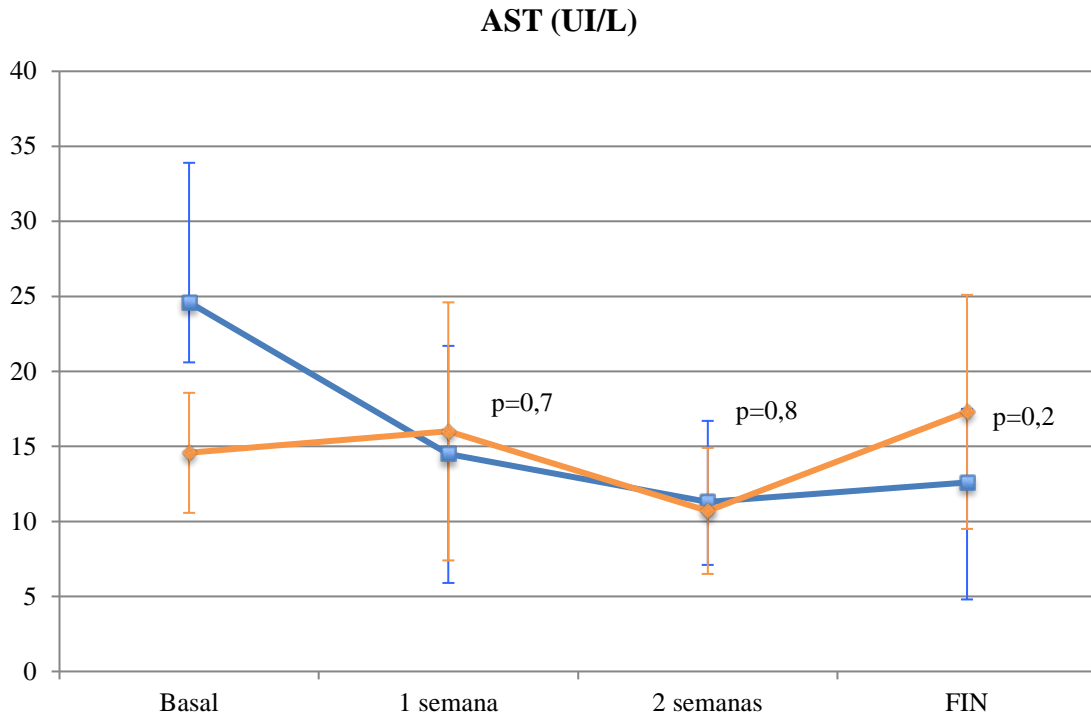


Figura 57: Evolución de la creatinina (mg/dL), bilirrubina total (mg/dL), AST (UI/L) y ALT (UI/L) en ambos grupos a lo largo del estudio

Parámetro	\bar{X} (rango)		p
	Control	Rifampicina	
Creatinina (mg/dL)	0,82 (0,66-1,3)	0,91 (0,64-1,1)	0,4
Bilirrubina (mg/dL)	0,35 (0,17-0,8)	0,52 (0,18-0,9)	0,3
AST (UI/L)	14,5 (5-27)	16 (7-29)	0,7
ALT (UI/L)	41,6 (30-48)	38,3 (20-60)	0,6

Tabla 48: Valores bioquímicos 1 semana después de la implantación del espaciador

Parámetro	\bar{X} (rango)		p
	Control	Rifampicina	
Creatinina (mg/dL)	0,86 (0,61-1,2)	1 (0,7-1,5)	0,2
Bilirrubina (mg/dL)	0,34 (0,09-0,9)	0,53 (0,03-0,9)	0,3
AST (UI/L)	11,3 (7-21)	10,75 (5-16)	0,8
ALT (UI/L)	30,6 (21-51)	29,1 (10-53)	0,8

Tabla 49: Valores bioquímicos 2 semanas después de la implantación del espaciador

Parámetro	\bar{X} (rango)		p
	Control	Rifampicina	
Creatinina (mg/dL)	0,91 (0,58-1,3)	1,03 (0,72-1,4)	0,4
Bilirrubina (mg/dL)	0,33 (0,1-0,8)	0,49 (0,1-0,8)	0,4
AST (UI/L)	12,6 (7-20)	17,3 (12-34)	0,2
ALT (UI/L)	40 (21-81)	43,5 (16-59)	0,7

Tabla 50: Valores bioquímicos 4 semanas después de la implantación del espaciador

Respecto a los posibles **efectos locales** del cemento con microcápsulas de rifampicina, en cinco de los animales (R2, R3, R6, R7 y R8), todos ellos del grupo con microcápsulas de rifampicina, se encontró una articulación de aspecto externo limpio pero ocupada por un líquido espeso. Dicho líquido se congeló para posterior análisis anatomopatológico. Se realizó una tinción de hematoxilina-eosina y se compararon las muestras de tres conejos del grupo de casos (R6, R7 y R8) con una muestra de líquido

intra-articular procedente de un conejo del grupo control (C5). No se encontraron diferencias en la celularidad ni aspecto microscópico de las muestras entre los dos grupos de estudio (figura 58).

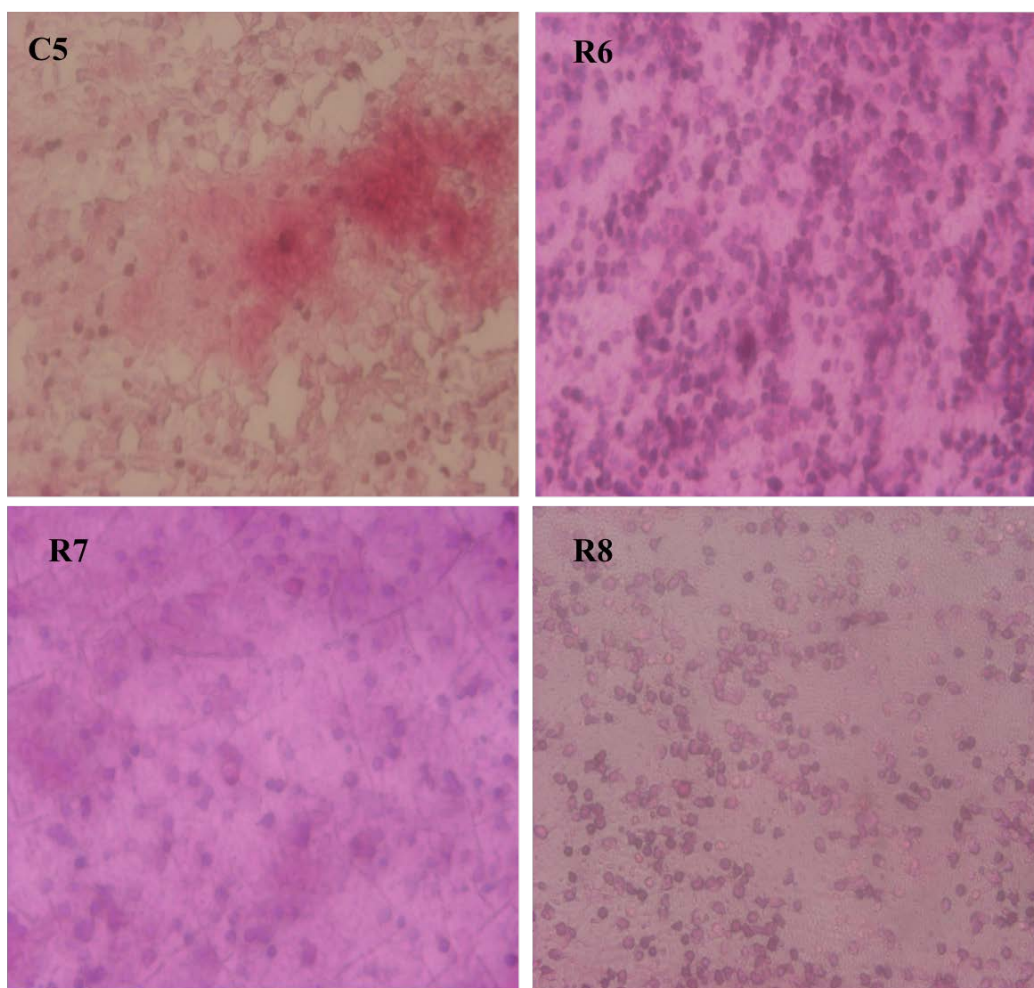


Figura 58: Tinción de hematoxilina-eosina del líquido articular de los conejos C5, R6, R7 y R8.

6. DISCUSIÓN

La imposibilidad de mantener las propiedades mecánicas del cemento óseo al añadir rifampicina es un problema recurrente que ha sido estudiado de forma reiterada (10, 97). A pesar de ello, la importancia de la rifampicina en el tratamiento de las infecciones periprotésicas de origen estafilocócico está ampliamente documentada, habiéndose demostrado su actividad sobre las bacterias en fase estacionaria, formas intracelulares y su capacidad de difusión en el biofilm, mejorando así los resultados del tratamiento de la PJI cuando se emplea en combinación con otros antibióticos (134, 166). Estas circunstancias hacen que la investigación de nuevas herramientas que permitan la liberación intra-articular de rifampicina desde el cemento óseo sea de especial relevancia clínica.

En 2016, nuestro grupo de investigación, fue capaz de diseñar un sistema de liberación controlada de rifampicina a partir de microcápsulas de alginato que mantiene el principio activo aislado del cemento óseo durante la fase de polimerización del mismo. Este aislamiento de la rifampicina dentro de las microcápsulas evita el secuestro de radicales libres generados por el peróxido de benzoilo y permite un fraguado completo del PMMA en tiempos de trabajo habituales. Además, la incorporación de la rifampicina en microcápsulas conduce a su liberación prolongada lo que, previsiblemente, daría lugar a niveles superiores a la concentración mínima eficaz (CME) durante un periodo prologado de tiempo. Los estudios *in vitro* realizados permitieron demostrar la eficacia antiestafilocócica de la rifampicina contenida en las microcápsulas, con un óptimo perfil de liberación en el cemento óseo y manteniendo las propiedades mecánicas de dicho cemento requeridas por la normativa ISO 5833:2002 (32, 33, 244).

Tras estos buenos resultados obtenidos in vitro, en este estudio se ha llevado a cabo la evaluación in vivo de la eficacia y seguridad de las microcápsulas de rifampicina desarrolladas.

Uno de los primeros aspectos a considerar a la hora de abordar este estudio fue el tipo de cemento óseo a utilizar. En los estudios in vitro estaba justificada la utilización de un cemento libre de antibiótico (CMW®1), ya que, de otra forma, no hubiera sido posible determinar la eficacia antimicrobiana de la rifampicina liberada de las microcápsulas incorporadas al mismo. Sin embargo, en el presente trabajo en lugar de emplearse el mismo cemento empleado para los estudios in vitro, se decidió añadir la rifampicina microencapsulada a un cemento con gentamicina (Palacos® R+G). El principal motivo por el que se decidió combinar la rifampicina con otro antibiótico fue minimizar la aparición de resistencias, ya que el rápido desarrollo de las mismas es el principal problema asociado al uso de rifampicina en monoterapia, habiéndose demostrado una clara superioridad del tratamiento combinado frente a la monoterapia en el tratamiento de la infección protésica (72, 199). Se decidió emplear Palacos® R+G de entre todas las alternativas comercializadas por ser el de uso más extendido, el que presenta mejores datos de liberación de antibiótico y por ser el cemento con el que nos encontramos más familiarizados dado el uso frecuente del mismo que hacemos en nuestra práctica clínica.

Aunque son varios los trabajos de investigación en los que se desarrollan microcápsulas de antibióticos para incorporar a cemento óseos, evaluándose sus características mecánicas, eficacia y toxicidad in vitro, no existe en la bibliografía ningún modelo animal validado para la evaluación de estos sistemas in vivo. Por ello, y como paso previo imprescindible al uso clínico de este nuevo cemento óseo, se ha

diseñado un nuevo modelo in vivo para evaluar la eficacia de este cemento con microcápsulas de rifampicina reproduciendo fielmente la sistemática de un recambio en dos tiempos de la práctica clínica habitual. Este modelo preclínico es adecuado para el estudio de la liberación intra-articular de la rifampicina contenida en las microcápsulas y sobre su posible toxicidad sistémica, como ha quedado demostrado en los resultados obtenidos.

6. 1. JUSTIFICACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCIÓN PROTÉSICA

La incidencia creciente de la infección protésica asociada a su alto coste y morbimortalidad hace imprescindible el desarrollo de nuevos modelos experimentales que nos permitan, tanto conocer su etiopatogenia y curso evolutivo, como diseñar nuevas estrategias terapéuticas. Para conseguir estos objetivos debemos reproducir el ambiente existente en la PJI, es decir, un espacio articular hipovascularizado con cierto grado de tolerancia antigénica, una medular hiper celular y un implante que separe estos dos espacios (35). Este ambiente no puede conseguirse sin el empleo de animales de experimentación. En 2016, Carli et al. (36), definen 4 criterios imprescindibles para considerar como clínicamente representativo un modelo animal de PJI:

1. El animal elegido debe tener **propiedades inmunes y musculoesqueléticas** comparables con las del humano.
2. El **implante** debe estar compuesto de materiales clínicamente relevantes, permitir la carga del miembro y reproducir el ambiente periprotésico.
3. El modelo debe emplear **bacterias clínicamente implicadas** en el desarrollo de la infección y ser capaz de producir un **biofilm** en la superficie del implante.
4. El modelo debe incluir la **medición cuantitativa** de bacterias y respuesta inmune del huésped, así como demostrar la presencia del biofilm.

6. 1. 1. Selección del modelo animal

Teóricamente, para conseguir modelos lo más parecido posibles al ambiente periprotésico humano, deberíamos emplear animales grandes como perros y ovejas dado que su arquitectura ósea es muy similar a la del humano conteniendo osteonas y un

sistema harvesiano bien estudiado. El principal inconveniente de estos animales es su tamaño, que los convierte en modelos de difícil manipulación con altos requerimientos de espacio para su mantenimiento y, por ello, de elevado coste (36). En el otro extremo encontramos animales de pequeño tamaño como las ratas y ratones, que no presentan ninguno de los problemas asociados al uso de animales grandes pero tienen dos grandes inconvenientes asociados a su reducido tamaño: aumenta la dificultad técnica de los procedimientos quirúrgicos e impide la monitorización estrecha a nivel bioquímico y hematológico por su escasa volemia. La extracción máxima de sangre recomendada si se realizan extracciones diarias es del 10% del volumen plasmático y el volumen plasmático se define como el 6% del peso del animal. Teniendo en cuenta que la determinación hematológica y bioquímica requiere al menos 2mL de sangre se requieren animales de un mínimo de 3 kg de peso para realizar las determinaciones analíticas necesarias para el establecimiento y monitorización de la infección periprotésica, sin tener en cuenta la pérdida hemática asociada a la cirugía.

Con un tamaño intermedio que permite la realización de los procedimientos y la manipulación frecuente del animal encontramos el conejo, que se ha convertido en uno de los principales modelos de estudio de la infección peri-implante y de efectividad antibiótica desde los estudios iniciales de Southwood et al (1985) y Belmatoug et al (1996) en cadera y rodilla respectivamente (18, 273).

A nivel **musculoesquelético**, el hueso del conejo tiene una densidad mineral similar a la del humano y alcanza la madurez esquelética a los 6 meses (37, 89, 179). Estructuralmente poseen canales vasculares con osteonas en lugar de tener una arquitectura cortical y trabecular (27). Como inconveniente anatómico, algunas publicaciones hacen referencia a la difícil extrapolación de los cambios peri-implante

identificados con estudios radiológicos debido a la hiperflexión fisiológica de la rodilla del conejo (37, 89), por ello no se ha realizado ningún análisis radiográfico a lo largo de este estudio. La presencia de publicaciones referentes a la anatomía de la rodilla del conejo es escasa, habiéndose encontrado exclusivamente la publicación de Crum et al (53) detallando las características posteriores y laterales de la rodilla del conejos NZW y la de Egloff et al (66) en la que se analizan las alteraciones patelofemorales tras la rotura del ligamento cruzado anterior. Por ello, para conseguir un adecuado conocimiento del campo quirúrgico se realizó una prueba sobre una pata de conejo procedente de otro estudio para definir el abordaje a realizar y las características anatómicas de la articulación. Los resultados obtenidos han demostrado una similitud anatómica entre especies suficiente como para permitir una planificación quirúrgica de sustitución y posterior recambio del componente tibial análogo al empleado en el tratamiento de la PJI en humanos. Además, durante la cirugía, tanto en la implantación como en el primer tiempo de recambio, se ha primado la conservación del aparato extensor, ligamentos colaterales medial y lateral y tendón del extensor de los dedos para permitir una movilización temprana de los animales en el postoperatorio. Esta circunstancia no coincide con las disecciones realizadas en otros estudios como el de Alt et al (6) en el que se realizó una sección sistemática del tendón rotuliano, produciendo una disrupción del aparato extensor y dificultando la movilidad postoperatoria de los animales.

El amplio uso del conejo como modelo de experimentación animal hace que sus **características inmunológicas** se encuentren bien definidas. Son modelos animales clave para el estudio de la patología infecciosa e inmune del ser humano y se han consolidado como la principal fuente de anticuerpos monoclonales y policlonales de alta

afinidad (105, 220, 224). Estas características musculoesqueléticas e inmunológicas hacen del conejo uno de los modelos animales más empleado en investigación ortopédica (87, 192).

6. 1. 2. Diseño del implante

La incorporación de la tecnología de impresión 3D en el campo de la cirugía ortopédica ha supuesto un cambio radical en nuestra práctica clínica. Permite el diseño de implantes o plantillas paciente-específicas que no solo han permitido aumentar la precisión en los procedimientos sino que también han demostrado ser capaces de disminuir el tiempo quirúrgico y con ello la tasa de complicaciones. Además, la accesibilidad de los materiales y software necesarios para la elaboración de estas piezas ha permitido que el denominado “Do it yourself” llegue a manos del cirujano ortopédico facilitando el diseño de material a medida no solo del paciente, sino también de su cirujano (12, 13, 76).

En el campo de la cirugía experimental la impresión 3D se ha empleado para el diseño de mallas de soporte de moléculas (proteínas morfogénicas del hueso, factores de crecimiento, etc) y de células (mesenquimales, condrocitos y plaquetas) pero su aplicación en el **diseño de implantes** está aún por desarrollar (306, 324). Podemos encontrar una gran variedad de implantes empleados para la inducción de infecciones osteoarticulares en modelos animales siendo, en su gran mayoría, modificaciones del instrumental empleado en la práctica clínica habitual como tornillos canulados cementados, pasando por agujas de Kirschner con o sin cementar, e incluso prótesis metatarsfalángicas de silicona. Ofluoglu et al (202) emplean tornillos de titanio sin cementar para la inducción de infecciones vertebrales torácicas, Clasper et al (46)

emplean pines de fijación externa de 4mm a modo de dispositivos intramedulares y Belmatoug et al (18) sustituyen la metáfisis tibial proximal de conejos NZW por prótesis metatarsofalángicas de silicona. Estas últimas presentan como desventaja la necesidad de valoración por resonancia magnética para determinar las complicaciones asociadas al implante.

Todos ellos tienen como desventaja que son implantes no diseñados ex profeso para el propio animal, por lo que pueden dar lugar a complicaciones derivadas de su tamaño (por exceso o por defecto) o forma como la luxación del implante, fracturas peri-implante o lesiones osteocondrales. La desproporción huésped-implante puede dar lugar a inestabilidad de los insertos, por lo que teniendo en cuenta que se ha demostrado que una fijación inestable en el hueso produce fuerzas de cizallamiento que alteran la adhesión bacteriana disminuyendo su fuerza y con ello la densidad del biofilm, esta circunstancia no es deseable en el desarrollo de un modelo clínicamente representativo de PJI (164).

En 2017, Carli et al (35) publican el único artículo existente, en nuestro conocimiento, sobre la aplicación del diseño e impresión 3D de implantes ortopédicos en cirugía experimental. En él confeccionan un implante especie-específico para la sustitución tibial proximal en ratones compuesto por un tetón central y una superficie articular plana. En nuestra opinión, este diseño podría disminuir la movilización del miembro por parte de los animales y lo consideramos como fuente de dolor dada la incongruencia existente entre un implante tibial totalmente plano y unos cóndilos femorales curvos, por lo que nos decantamos por un diseño del componente tibial que reprodujese lo más fielmente posible la conformación anatómica de la superficie articular tibial del animal. De esta forma conseguimos confeccionar un implante

altamente congruente que permitió una rápida recuperación funcional de los animales en el postoperatorio y una distribución más fisiológica de las cargas.

El otro factor a tener en cuenta a la hora de diseñar un implante adecuado para reproducir una infección periprotésica es su **composición** (aleación, características de la superficie y porosidad) (48, 49), ya que la adhesión bacteriana y creación del biofilm es un proceso complejo afectado directamente por la composición y carga del implante. Múltiples estudios han demostrado una mayor afinidad bacteriana por los implantes de acero inoxidable frente a los de titanio o tantalio (48, 203), al igual que por los implantes de superficie rugosa e hidrofóbica (48, 49). Chang et al (38) comparan en su estudio la afinidad de *S. epidermidis* por el acero inoxidable y el titanio in vitro e in vivo, demostrando mayor afinidad bacteriana por el acero inoxidable. Además, hacen un subanálisis en el que se valora el número de CFU en función de que el material implantado al animal hubiese sido preincubado con bacterias o la incubación se realizase in situ, demostrando recuentos mayores en los casos de preincubación del metal 7 días después de la inoculación. Aun así, la incubación previa de los implantes de titanio siguió teniendo un recuento bacteriano inferior que la inoculación in situ del acero inoxidable. Arens et al (11) valoran la tasa de infección de placas de acero inoxidable y titanio en conejos NZW tras la inyección local de $4 \cdot 10^{3-5}$ CFU de *S. aureus*. Refieren diferencias estadísticamente significativas ($p=0,018$) entre la tasa de infección de ambos implantes, con un 35% en los implantes de titanio y un 75% en los implantes de acero inoxidable. Respecto al comportamiento de nuevos metales como el tantalio cabe destacar el trabajo de Tokarski et al (287) en el que se analiza la tasa de revisión por causa séptica de prótesis totales de cadera entre el 2000 y 2013, con un total de 144 pacientes. Comparan la tasa de aflojamiento séptico en función de la composición del

componente acetabular (tantalio o titanio), demostrando una mayor tasa de aflojamiento séptico en el caso de los implantes de titanio (17,5%) frente a los de tantalio (3,1%) con $p=0,006$.

A pesar de la bibliografía disponible, pueden encontrarse en la literatura modelos de PJI en los que la composición de los implantes parece ser contraria a los previamente recomendados. Es el caso de Poultsides et al (225), en el que emplean como implantes cilindros de tantalio intramedulares para el desarrollo de un modelo de infección hematógena por MRSA. Estos autores describen una tasa de infección por vía hematógena del 80% tras 4 semanas de la administración del inóculo. También, Helbig et al (100) son contrarios a los principios de afinidad microbiana al emplear cilindros de titanio como cuerpo extraño para el desarrollo de osteomielitis femoral por MRSA en conejos NZW. En este caso los autores no detallan la tasa de infección conseguida ni hacen ningún tipo de análisis microbiológico. En nuestro caso, con la idea de conseguir el máximo rendimiento de la inoculación del *S. aureus* elegido minimizando así el número de animales necesarios para la realización del estudio, nos decantamos por el diseño de implantes de acero inoxidable.

De esta forma en el presente estudio se han diseñado mediante la tecnología de impresión 3D implantes especie-específicos de acero inoxidable y superficie rugosa que permiten una buena congruencia articular y fijación estable ideales para el desarrollo de una infección periprotésica.

6. 1. 3. Determinación de las características del inóculo bacteriano

El primer paso para la determinación de las características del inóculo bacteriano es la **selección del microorganismo** que será responsable de la PJI en nuestro modelo

experimental. Deben emplearse cepas clínicamente relevantes por lo que la mayor parte de los estudios publicados emplean distintas especies de estafilococos coagulasa negativos y *Staphylococcus aureus*, dado que son los principales responsables de la PJI en la práctica clínica (3, 227, 290). Además, en nuestro caso consideramos necesario emplear una cepa productora de biofilm ya que la inclusión de rifampicina en el tratamiento de la PJI tiene como objetivo la erradicación del mismo. Por estas razones en el presente estudio se ha empleado la cepa de *Staph. aureus* metilicilina-sensible ATCC® 29213™, microorganismo ampliamente utilizado a nivel experimental y que ha demostrado ser un capaz de formar un biofilm maduro en las primeras 24 horas desde la inoculación (50, 94). Esta cepa ha sido empleada in vitro por autores como Dall et al (55) y Sritharadol et al (275) para el estudio de la eficacia antibiofilm de distintos antibióticos de forma aislada o en combinación. Clauss et al (47) también emplearon esta cepa para determinar el comportamiento de aquellos microorganismos formadores de biofilm en función de la naturaleza del cuerpo extraño con el que contactasen, así los cultivaron en presencia de PMMA, polietileno, fosfato de calcio y esponjosa humana, demostrando mayor apetencia de estos microorganismos por aquellos materiales porosos frente a los de superficie lisa. Dentro de las series in vivo de infección osteoarticular previamente publicadas con el uso de esta cepa de *Staph. aureus* metilicilina-sensible cabe destacar la de Clasper et al (46) en la que demuestran la infección a nivel microbiológico en al 100% de los animales.

Otro punto a tener en cuenta es la **vía de inoculación** a elegir para inducir nuestra PJI. Existen tres métodos de inoculación que pueden ser empleados en el estudio de la de la infección de un implante: la inoculación in vitro, inoculación in situ y la inyección intravenosa de una concentración predeterminada de bacterias (256). La

inyección intravenosa se emplea para la reproducción experimental de la infección protésica secundaria a una diseminación hematógena y fue descartada en el presente estudio por su eficacia errática, es decir, requiere altas concentraciones bacterianas para conseguir bajas tasas de infección y asocia una importante mortalidad, especialmente en conejos (121, 225, 259). Respecto a los otros métodos empleados para inducir una infección, la inoculación in vitro tiene la ventaja de que el inserto, en el momento de la implantación, ya tiene un biofilm maduro en su superficie, por lo que suele ser el método de elección en modelos de osteomielitis asociada a implante (198, 319). En el diseño de modelos experimentales de PJI suele preferirse la inoculación in vivo (intraoperatoria) de la articulación, ya que reproduce con exactitud la vía de infección más frecuente en la práctica clínica permitiendo así el estudio de la formación del biofilm in vivo, por lo que fue la vía elegida en el presente estudio (18, 212).

Por último, en lo que a la determinación de las características del inóculo se refiere, debemos definir la **dosis bacteriana** del mismo. La dosis bacteriana mínima necesaria para producir una PJI en un modelo animal no se encuentra bien definida en la literatura. Es cierto que varios autores coinciden al destacar que esta dosis mínima parece ser mucho mayor que la necesaria para el desarrollo de una PJI en humanos ($<100\text{CFU}/\text{m}^3$) (279), circunstancia que atribuyen a la influencia de factores dependientes del huésped en el desarrollo de una infección (18, 36). Dada la ausencia de guías claras sobre la cantidad de CFU a inocular se realizó una revisión de la bibliografía disponible recogiendo en cada uno de los estudios consultados la dosis inoculada de *S. aureus*, número de animales infectados sobre el total y número de animales perdidos a causa de la infección (tabla 53).

Fuente	CFU	Infectados	Pérdidas
Belmatoug et al ⁽¹⁸⁾ (1996)	5x10 ⁶	100%	0
Arens et al ⁽¹¹⁾ (1996)	2x10 ⁴	50%	NP
Nijhof et al ⁽¹⁹⁷⁾ (2001)	10 ⁵	100%	10%
Sheehan et al ⁽²⁵⁶⁾ (2004)	10 ⁶ -10 ⁷	100%	0
Craig et al ⁽⁵²⁾ (2005)	10 ³	70%	4,5%
Yin et al ⁽³¹⁹⁾ (2005)	10 ⁶	86%	17,1%
Saleh-Mghir et al ⁽²⁴⁰⁾ (2011)	5x10 ⁷	100%	29,1%
Alt et al ⁽⁶⁾ (2014)	10 ⁵ 10 ⁶	100%	0
Helbig et al ⁽¹⁰⁰⁾ (2014)	10 ⁶	100%	33,3%

Tabla 53: Revisión bibliográfica de modelos de PJI en conejo NZW. NP: no publicado

Los resultados de la búsqueda bibliográfica demostraron que la tasa de infección del 100% se obtenía con inóculos de al menos 10⁵ CFU y que el número de animales perdidos por causa séptica comenzaba a aumentar a partir de las 10⁶ CFU inoculadas. Por ello en el presente estudio se decidió emplear un inóculo de 10⁵ CFU, consiguiéndose una tasa de infección del 93,3% sin ningún animal perdido por sepsis en las 4 semanas que duró el ensayo. No se encontraron dificultades a la hora de realizar la inoculación tras el cierre de la artrotomía empleándose un volumen total final de 1mL y se consiguió el mantenimiento de todo el volumen inyectado a nivel intra-articular.

6. 1. 4. Determinación cuantitativa de la presencia de infección: análisis bioquímico, hematológico y microbiológico de la PJI.

Un punto crítico a la hora de comparar la eficacia de distintos tratamientos en la curación de una infección es la demostración de la presencia de la misma en los grupos de experimentación. Para ello pueden emplearse determinaciones sistémicas o locales (36). Respecto a las determinaciones sistémicas, en función del estudio consultado encontramos diagnósticos de infección basados en medidas indirectas, como peso y temperatura, que de forma aislada se consideran insuficientes por lo que suelen combinarse con medidas directas de presencia de infección de carácter bioquímico y hematológico que tienen como finalidad la determinación de la evolución de los marcadores inflamatorios y reactantes de fase aguda (35, 197, 225). La pérdida de peso, a pesar de encontrarse incluida dentro de las medidas indirectas de infección, está considerada como el signo más precoz de deterioro sistémico (230) por lo que en el presente estudio se empleó como variable principal de vigilancia del bienestar animal. La periodicidad de las determinaciones es muy similar en todos los estudios publicados, realizándose determinaciones semanales de peso y temperatura, por lo que ha sido la secuencia empleada en nuestro estudio (100, 225).

Respecto a las determinaciones locales diagnósticas de infección podemos encontrar publicadas determinaciones radiológicas (18, 321), análisis anatomopatológicos (87) y análisis microbiológicos del lugar infectado (52, 293). Teniendo todos estos factores en cuenta, en el presente estudio se ha realizado la determinación de la presencia de infección empleando medidas sistémicas tanto indirectas, monitorizándose el peso y la temperatura, como directas mediante la determinación hematológica y bioquímica de las variaciones en los reactantes de fase

aguda. Además, estas técnicas se han combinado con el uso de medidas locales de diagnóstico de infección mediante el análisis microbiológico realizado 1 semana tras la inoculación.

Respecto a las determinaciones sistémicas directas, en el presente ensayo se decidió reflejar lo mas fielmente posible los protocolos diagnósticos de PJI empleados en la práctica clínica por lo que se realizó una **determinación hematológica y bioquímica** análoga a la empleada por otros autores (26, 35, 197, 225) a la semana de la inoculación intra-articular. Así se decidió determinar el recuento leucocitario, el porcentaje de linfocitos en la fórmula, el recuento plaquetario y la velocidad de sedimentación globular en la primera hora.

En la Tabla 54 puede encontrarse la comparación entre los criterios diagnósticos de PJI empleados en la práctica clínica habitual y los utilizados en el presente estudio para el diagnóstico de infección en el modelo animal seleccionado.

Criterios diagnósticos de PJI en humanos ^(212, 215)	Criterios diagnósticos de PJI en conejo NZW
<p>Uno de los siguientes criterios mayores:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dos cultivos periprotésicos positivos con microorganismos fenotípicamente idénticos. - Presencia de fístula que se comunique con la articulación. <p>Al menos tres criterios menores:</p> <ul style="list-style-type: none"> - PCR y VSG elevadas. - Leucocitosis o esterasa leucocitaria positiva en líquido sinovial. - Neutrofilia en líquido sinovial. - Análisis histológico positivo en tejido periprotésico - Un cultivo positivo 	<p>Al menos un criterio mayor ⁽²¹¹⁾:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dos cultivos intra-articulares positivos para <i>S. aureus</i>. - Presencia de fístula que comunique con la articulación. <p>Al menos tres criterios menores ^(124, 174):</p> <ul style="list-style-type: none"> - VSG > 5mm - Recuento leucocitario superior a $9,7 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ - Linfopenia $\leq 30\%$ - Trombocitosis $> 650 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ - Un cultivo positivo
<p>Tabla 54: Protocolos diagnósticos de PJI en la práctica clínica habitual y en el modelo animal.</p>	

Los criterios establecidos en 2011 por la Musculoskeletal Infection Society (215) consideran la determinación de leucocitosis y neutrofilia en líquido articular como criterios menores diagnósticos de infección. En el presente trabajo, el reducido volumen de líquido de la rodilla de los animales hizo imposible dicho análisis ya que en el grupo R todo el líquido articular recogido a través del drenaje en los primeros tres días tras el primer tiempo de recambio fue necesario para definir el perfil de liberación intra-articular de rifampicina. Por ello, se decidió tener en cuenta como criterios menores diagnósticos de PJI la modificación de la fórmula leucocitaria y elevación de reactantes de fase aguda en sangre (plaquetas y VSG). En condiciones normales la fórmula leucocitaria del conejo tiene un ratio aproximado de neutrófilos:linfocitos de 25%:67% pero ante la presencia de una infección se invierte dicha fórmula dando lugar a un

descenso del número de linfocitos que se considera diagnóstico con valores $\leq 30\%$ (124, 174). Los resultados obtenidos en cada uno de los grupos de experimentación mostraron modificaciones estadísticamente significativas ($p=0,0001$) respecto a los valores basales con una disminución de la proporción de linfocitos en sangre y aumento del recuento leucocitario y plaquetario tras una semana de la inoculación intra-articular.

Dentro de las medidas locales propuestas por Carli et al (36) para definir la presencia de infección se encuentra el **análisis radiológico** de la articulación. A la hora de hacer el análisis de los cambios periarticulares debidos a la infección debemos tener en cuenta que el tipo de prueba de imagen a realizar está condicionada por la naturaleza del implante. Así, en el estudio de las alteraciones óseas debidas a la infección de implantes de silicona se recomienda la realización de una resonancia magnética mientras que si los implantes son metálicos puede hacerse un análisis radiográfico convencional (18, 35). Como se ha comentado previamente, la extrapolación de los cambios radiográficos periprotésicos secundarios a la infección es errática en los conejos por la hiperflexión fisiológica de la rodilla (37, 89, 179), por lo que no se ha realizado ningún análisis radiográfico a lo largo de este estudio. Si embargo, es una técnica muy utilizada, y con escalas validadas para la extrapolación de los cambios óseos, para monitorizar la evolución de la infección o del tratamiento de la misma en los modelos animales de osteomielitis como las empleadas por Yin et al en su modelo de osteomielitis en el conejo NZW (90, 319).

Para demostrar la presencia de infección en un modelo animal de PJI, como ocurre en la práctica clínica, es aconsejable el **análisis microbiológico** de muestras intra-articulares. A pesar de ello pueden encontrarse publicaciones en las que se omite

este tipo de análisis. Cabe destacar el trabajo de Greimel et al (94) en el que se realiza una comparación de la eficacia de varios antibióticos frente a una infección periimplante por *S. aureus*. La ausencia de datos sobre la eficacia de la infección producida mediante inoculación intramedular femoral resta fuerza a los resultados comparativos de los distintos antibióticos empleados para el tratamiento de la infección disminuyendo la validez del estudio. De esta forma, se considera necesaria la demostración directa de la presencia de infección en los modelos experimentales de PJI previa al inicio del estudio comparativo entre distintas opciones terapéuticas para limitar las fuentes de error en la medición de la magnitud del efecto.

En la práctica clínica el número de muestras intraoperatorias recomendado entre 3 y 6, procedentes de tejido blando y óseo, teniendo especial cuidado de minimizar la pérdida de stock óseo (17). Recientes publicaciones recomiendan realizar la sonicación del implante como medio para aumentar la rentabilidad diagnóstica del cultivo (289, 293, 321). En los modelos experimentales el reducido tamaño de la articulación, y por ello el stock óseo limitado, hace que el número de muestras extraídas para el análisis microbiológico tienda a ser menor salvo que la obtención de estas coincida con la eutanasia del animal (6, 52). En el presente estudio experimental se han obtenido un total de 3 muestras por animal para análisis microbiológico, una de partes blandas, otra de la metáfisis tibial proximal y la resultante de la sonicación del implante.

En los últimos años, gracias al desarrollo de los animales transgénicos, disponemos de nuevas opciones para el diagnóstico de la presencia de bacterias y células inflamatorias en el lugar de la infección que no implican la toma de muestras intra-articulares. En su trabajo, Bernthal et al (20) eligen para probar la eficacia antiestafilocócica de implantes reabsorbibles recubiertos de rifampicina y minociclina el uso de la cepa de *S. aureus* SH1000 dotada de bioluminiscencia. Además, eligen como

modelo animal la línea LysEGFP de ratones inbred C57BL/6 que se caracterizan por tener células mieloides con fluorescencia verde. De esta forma, mediante la realización de bioluminiscencia in vivo fueron capaces de determinar la presencia de *S. aureus* viable en la articulación y, mediante la realización de fluorescencia in vivo, determinar la presencia de células inflamatorias en el área afecta. Además, dado que la intensidad de la señal registrada por estos métodos varía en función del número de células inflamatorias o bacterias vivas en el área de estudio, son técnicas que permiten monitorizar la evolución del proceso infeccioso y valorar la magnitud del efecto de distintas estrategias terapéuticas. Este tipo de técnicas son especialmente útiles si van a emplearse modelos animales de reducido tamaño porque permiten diagnosticar la presencia de infección salvaguardando el stock óseo, mejorando la movilidad del animal y la calidad del campo de cara a nuevas intervenciones.

En el presente estudio, siguiendo las recomendaciones de Carli et al(36), también se consideró adecuado **demostrar la capacidad de formación de biofilm** por parte de la cepa de *S. aureus* elegida. Existen dos técnicas principales para visualizar el biofilm: la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la tinción con cristal violeta. El uso de las muestras, bien el inserto o el espaciador de cemento, para la visualización del biofilm implica su pérdida para la posterior realización de recuentos microbiológicos. Para subsanar este problema, autores como Carli et al (35), en su modelo de PJI con ratones destinan la mitad de sus animales a la demostración de la presencia del biofilm por SEM y la otra mitad al recuento microbiológico. Esta estrategia aplicada a estudios en los que se pretenda comparar la eficacia antimicrobiana de dos o más tratamientos implica el aumento del número de animales para conseguir diferencias estadísticamente significativas en lo que al recuento microbiológico se refiere. En nuestro caso nos decantamos por una solución intermedia entre la no demostración de la presencia de

biofilm a los 7 días de la inoculación y el aumento del número de animales que fue la demostración in vitro de la capacidad de formación de biofilm por la cepa de *S. aureus* elegida mediante el cultivo del inserto durante 7 días y su posterior tinción con cristal violeta.

6. 1. 5. Justificación de la realización de un recambio en dos tiempos frente a un recambio en un tiempo

La decisión de emplear este nuevo cemento con rifampicina en un recambio en dos tiempos en lugar que en un recambio en un tiempo o como profilaxis de la PJI está basada en diferentes factores. La cinética de liberación de los antibióticos contenidos en el cemento óseo implica una fase inicial de gran liberación con consecución de elevadas concentraciones intra-articulares seguida de un descenso progresivo de la misma a lo largo del tiempo (267). También se ha demostrado que el mantenimiento de niveles de antibiótico por debajo de la CMI induce la selección de resistencias de los microorganismos a nivel intra-articular, es decir, disminuye la eficacia del antibiótico en cuestión en el tratamiento de la infección (64). Teniendo en cuenta estos hechos y que el uso de rifampicina en asociación con otros antibióticos es el tratamiento de primera línea para el abordaje de las PJI de origen estafilocócico, emplear este cemento con microcápsulas de rifampicina como profilaxis de la PJI o en forma de recambio en un tiempo podría volverla ineficaz para el tratamiento de nuevas infecciones estafilocócicas. Es decir, de presentarse una nueva infección estafilocócica contraída por vía hematogena es probable que la rifampicina no fuera eficaz en su tratamiento y nos viésemos obligados a emplear tratamientos de segunda línea, menos eficaces, para su erradicación. Por estos motivos se ha diseñado el presente estudio en forma de recambio en dos tiempos, ya que el tiempo de permanencia del espaciador es limitado y

aun no se dispone de datos in vitro sobre el perfil de liberación de la rifampicina contenida microcápsulas tras la primera semana (32).

6. 2. EVALUACIÓN IN VIVO DE LA EFICACIA DEL CEMENTO ÓSEO CON MICROCÁPSULAS DE RIFAMPICINA EN EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN PERIPROTÉSICA

La evaluación de la eficacia del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina se dividió en tres secciones: la determinación del perfil de liberación intra-articular de la rifampicina, el estudio de la actividad antimicrobiana del cemento con microcápsulas de rifampicina y la determinación de la toxicidad sistémica de la rifampicina debida a su absorción tras la liberación intra-articular.

6. 2. 1. Análisis del perfil de liberación intra-articular de rifampicina

Se ha comentado previamente que una de las características del biofilm es su capacidad para disminuir la actividad de los antibióticos, haciendo que la CMI de estos se vea aumentada llegando a multiplicar por 200-1000 la dosis activa necesaria para la erradicación de la infección (15, 182). A pesar de ello, la mayoría de estudios que tienen como objetivo la demostración de la eficacia de un antibiótico contenido en el cemento óseo o en implantes ortopédicos realizan exclusivamente un cálculo in vitro de la cinética de liberación de dicho antibiótico sin realizar comprobaciones de la misma in vivo (90). En la bibliografía disponible encontramos los estudios de Tuzuner et al (292), Stewart et al (277) y Giavaresi et al (87) que basan sus resultados de eficacia in vivo en el recuento microbiológico, en la capacidad de detección de antibiótico en sangre o en muestras intra-articulares obtenidas tras la eutanasia del animal por lo que no son capaces de definir la curva de liberación en el modelo experimental (42, 197, 304).

En el presente estudio se prefirió realizar la **determinación in vivo de las características de la curva de liberación** intra-articular de la rifampicina contenida en

las microcápsulas demostrada in vitro en ensayos previos (244). Respecto a estudios con el mismo objetivo cabe destacar el de Chohfi et al, que presentan un modelo animal de osteomielitis para analizar el perfil farmacocinético de un cemento con vancomicina. Para determinar los niveles de vancomicina presentes en el hueso establecen una eutanasia secuencial de los animales y toma de biopsias femorales postmortem. La aplicación de este esquema en el presente estudio fue rechazada al requerir un aumento importante en el número de animales necesarios para cumplir los objetivos establecidos. Siguiendo con la misma línea de análisis farmacocinético, Yenice et al en 2003 (318) sintetizan micropartículas con teicoplanina para el tratamiento de infecciones asociadas a defectos óseos. Para determinar la curva de liberación intra-articular de la teicoplanina realizan artrocentesis repetidas en las rodillas de los animales. El 86% de los animales utilizados desarrollaron complicaciones de la herida quirúrgica perdiéndose una elevada cantidad de muestras para el análisis microbiológico final, quedando este invalidado y siendo la principal limitación de su estudio. Teniendo en cuenta estos antecedentes se decidió, para permitir el acceso a la articulación con la menor morbilidad posible de los animales y minimizando el riesgo de infección, el uso de drenajes intra-articulares de silicona colocados en el primer tiempo de recambio protésico. Así, se realizó una toma de muestras de líquido articular a las 6, 24, 48 y 72 horas de la colocación del espaciador. En todas las muestras obtenidas fue posible la determinación de los niveles de rifampicina al ser estos superiores al límite de cuantificación del HPLC.

Respecto al **método elegido para la cuantificación** de rifampicina, aunque la espectrofotometría puede resultar un método válido para la cuantificación de rifampicina en estudios in vitro, en el presente trabajo se ha realizado la cuantificación de rifampicina mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (33, 63, 154). El

HPLC es un método con una elevada especificidad para la cuantificación de analitos en muestras complejas ya que, previa a su detección espectrofotométrica, se lleva a cabo su separación en función de su capacidad de retención en una determinada fase estacionaria desde una fase móvil que los arrastra. El método de HPLC utilizado en este estudio es, con algún pequeño cambio, el recogido en la Real Farmacopea para la cuantificación de rifampicina como materia prima e incorporada a medicamentos (243). Esta circunstancia es importante porque para el aislamiento de una sustancia activa presente en una muestra con productos de degradación o excipientes es necesario el uso de técnicas analíticas que sean específicas y permitan diferenciar el principio activo de estos otros componentes presentes en la fórmula (149, 173, 271). En el caso de los productos de degradación esta diferenciación es especialmente complicada porque su estructura química es muy similar a la del propio principio activo, siendo la rifampicina quinona el principal producto de degradación del antibiótico que nos ocupa. El cambio introducido consistió en la modificación de la fase móvil, disminuyendo su polaridad (pasando de 35 a un 40% de fase orgánica) con el fin de reducir el tiempo de retención de la rifampicina (de 23 a 11 minutos) y de esta forma acortar la duración de los análisis. Este método analítico se utilizó para cuantificar la rifampicina contenida en las microcápsulas y así determinar la cantidad de las mismas a incorporar al cemento para conseguir una concentración de rifampicina del 0,3%.

Este mismo método se utilizó para determinar la rifampicina en muestras biológicas. Debemos tener en cuenta que el tipo de muestras biológicas empleadas en este ensayo (sangre y líquido sinovial) contienen, además de la rifampicina objeto de estudio, otros compuestos químicos como la gentamicina, anestésicos y analgésicos además de todas las células inflamatorias, microorganismos, detritus celulares, fibrina y sus derivados presentes en la articulación después de la cirugía. Dada la compleja

composición de las muestras de estudio el uso de técnicas separativas para la cuantificación de la rifampicina presente en ellas resulta imprescindible. La eficacia del HPLC en la cuantificación de rifampicina en muestras biológicas ha sido registrada en distintos medios. Calleja et al (31) utilizan este método para la cuantificación de rifampicina en muestras de plasma y de homogeneizado hepático, Goutal et al (93) lo emplean para la determinación plasmática y Srivastava et al (276) lo aplican en plasma y líquido cefalorraquídeo. Además, en el presente estudio se ha determinado la especificidad de este método analítico, es decir, se ha probado en muestras biológicas (suero y líquido) que el método analítico es capaz de cuantificar la rifampicina en presencia de gentamicina. Igualmente se comprobó que el alginato no interfería en la cuantificación y que no se producían interferencias en la misma debidas a ningún componente del líquido sinovial ni del suero, por lo que no se ha producido ningún tipo de magnificación de los valores de rifampicina cuantificados, como se puede observar en el cromatograma de la figura 44.

Resulta complejo definir la cinética de liberación intra-articular de la rifampicina a partir del cemento óseo porque el volumen total de líquido articular varía en función del animal y en función del momento en el que se realiza la extracción. Si que hemos podido demostrar que la liberación de rifampicina se mantiene durante 72 horas, con concentraciones superiores a la CMI in vivo para *S. aureus* (0,06 µg/mL) (103, 191). Esta puntualización es especialmente importante, ya que la evidencia disponible alerta de que la exposición a concentraciones sub-inhedoras de antibiótico produce tolerancia al mismo por parte de los microorganismos integrantes del biofilm (122). La curva de liberación encontrada fue análoga a la demostrada con otros antibióticos con un pico inicial de mayor liberación y descenso progresivo hasta llegar a una fase de

meseta con descenso lento a lo largo del tiempo (84, 154, 221). En todas las determinaciones realizadas nuestra curva de liberación presentó concentraciones de rifampicina intra-articular superiores a las demostradas por Anguita-Alonso et al en 2006 con el uso de rifampicina sin microencapsular (10).

6. 2. 2. Determinación de la eficacia antimicrobiana del cemento con microcápsulas de rifampicina

Para determinar la eficacia antimicrobiana del cemento con microcápsulas de rifampicina en el tratamiento de la PJI se diseñó el modelo experimental previamente justificado y se reprodujo la sistemática de un **recambio en dos tiempos** análogo al realizado en la práctica clínica habitual. En el presente trabajo se comparó el cemento con gentamicina de uso clínico habitual con y sin la adición de microcápsulas de rifampicina. El rápido desarrollo de resistencias a rifampicina cuando esta se emplea en monoterapia es un problema conocido y se debe a una mutación en la RNA-polimerasa DNA-dependiente bacteriana (62, 163, 311, 322). Por ello se decidió añadir las microcápsulas de rifampicina a un cemento con gentamicina. Para diferenciar el efecto antimicrobiano producido por la rifampicina microencapsulada del debido al efecto bactericida de la gentamicina se empleó el mismo cemento con gentamicina en el grupo de controles. Para evitar posibles errores en la valoración de la eficacia y toxicidad de la rifampicina microencapsulada se decidió no administrar antibioterapia intravenosa en ninguno de los grupos de estudio.

Tras el primer tiempo de recambio se realizó una **monitorización de la evolución de los parámetros inflamatorios** (recuento leucocitario, linfocitario,

plaquetario y determinación de la VSG en la primera hora) a los 4 días, 1, 2, 3 semanas postoperatorias y a las 4 semanas postoperatorias coincidiendo con la eutanasia del animal que no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos en ningún momento de estudio. Si que se observó, tras la inoculación intra-articular de *S. aureus*, una elevación del número de leucocitos, plaquetas y VSG acompañada de un descenso en la proporción de linfocitos en ambos grupos de experimentación, resultados esperados al desarrollarse la infección peri-implante. Al final del estudio no se apreció una completa normalización del recuento leucocitario, linfocitario ni plaquetario, circunstancia contraria a la publicada por Poultsides et al (225) en el que se describe la normalización de la VSG y recuento leucocitario a las 4 semanas de la inoculación. Aun así, en nuestro caso los valores medios de cada grupo se encontraron por debajo de los puntos de corte definitorios de infección demostrándose así una tendencia a la normalización del recuento tras el primer tiempo de recambio.

En la práctica clínica el **tiempo** mínimo recomendado de permanencia del espaciador de cemento hasta la realización del segundo tiempo de recambio no está bien definido, aconsejándose esperar al menos dos semanas y no más de 6 meses (119, 204). Con esta premisa era de esperar la amplia variabilidad de tiempo de permanencia del implante/cemento con antibiótico detectada en las publicaciones de ensayos preclínicos con animales. Uno de los estudios con menor intervalo de tiempo es el de Tuzuner et al (292) en el que se mide la eficacia del PMMA con teicoplanina y sulfato de calcio a las 3 semanas de la inducción de la infección por MRSA en ratas. En el otro extremo podemos encontrar trabajos como el de Sinclair et al (264) en el que la eficacia de un esteroide catiónico en el tratamiento de la infección asociada a implante en ovejas no se determina hasta 12 semanas después de la inoculación de MRSA. A pesar de estos casos extremos, la gran mayoría de estudios esperan una media de 4 semanas antes de la

eutanasia del animal y toma de muestras para determinar la eficacia de la intervención realizada (6, 46, 319) por lo que nos decantamos por esta estrategia en el diseño de nuestro trabajo.

Por lo tanto, a las 4 semanas de la implantación del espaciador de ambos grupos de estudio se sacrificó a los animales y se procedió a valorar los mismos criterios definitorios de infección que se emplearon para diagnosticar la presencia de PJI tras la inoculación intra-articular de *S. aureus* (tabla 47 p. 155). Como complicación local del uso de espaciadores se identificaron 3 casos de luxación del espaciador (20%), circunstancia que no es de extrañar dada la hiperflexión fisiológica de la rodilla de estos animales. Este dato es similar al descrito en publicaciones en humanos (61, 261, 283).

El análisis de los parámetros hematológicos y bioquímicos (VSG, leucocitos, plaquetas y linfocitos) no presentó diferencias estadísticamente significativas entre grupos (tabla 36 p. 149). El **análisis microbiológico** demostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos en el número de CFU aisladas en hueso y partes blandas con $p=0,03$ y $p=0,01$ respectivamente, sin encontrarse crecimiento bacteriano en las muestras del grupo tratado con microcápsulas de rifampicina. Tres animales del grupo control presentaron cultivos positivos en las muestras de hueso y cuatro en las muestras procedentes de partes blandas.

Respecto al número de CFU aisladas tras la sonicación del espaciador de cemento, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,71$) entre los grupos de estudio aislándose 109 CFU/mL en el grupo control y 360 CFU/mL en el grupo tratado con microcápsulas de rifampicina. La sonicación es el método empleado para desprender las bacterias que conforman el biofilm adherido a un implante mediante la acción de ultrasonidos (176, 289). Kendall et al (129), en 1995, demuestran que a pesar de la elevada liberación inicial de antibiótico desde el espaciador, este implante

puede actuar como cuerpo extraño sobre el que se desarrolle un nuevo biofilm por lo que la utilidad del cultivo del líquido resultado de la sonicación se ha convertido en motivo de estudio y controversia (129). Algunos autores consideran inútil la sonicación del espaciador porque durante este proceso se produce un aumento de la liberación del antibiótico contenido en él, dando lugar a cultivos negativos aunque en realidad se haya reproducido el biofilm en su superficie. Este fenómeno parece afectar de forma desigual a los antibióticos ya que, según el estudio de Kummer et al (138), la liberación tras la sonicación es mucho mayor en aquellos espaciadores con vancomicina o fosfomicina mientras que afecta levemente a los compuestos por gentamicina y daptomicina.

Esteban et al (68), en 2016, establecen que la relevancia clínica de la sonicación del espaciador radica en que la presencia de cultivos positivos aumenta el riesgo de recurrencia de la infección tras el segundo tiempo de recambio y que recuentos superiores a 10.000 CFU/mL empobrecen los resultados en lo que a curación de la PJI se refiere. Siguiendo esta idea, Nelson et al (195) analizan 36 pacientes en los que se llevó a cabo un segundo tiempo de recambio en cadera o rodilla, 18 de ellos con cultivos positivos exclusivamente del espaciador tras la sonicación y 18 con todos los cultivos negativos. Solo el 50% de los pacientes con cultivos positivos desarrollaron una recurrencia de la infección frente al 11% del grupo con cultivos negativos. Concluyen que la sonicación de los espaciadores de cemento mejora la sensibilidad de los cultivos de tejido tomados intraoperatoriamente y que la presencia de cultivos positivos en el espaciador asocia una OR= 8 (IC95% (1,2-69)) para infección recurrente, por lo que recomiendan un seguimiento estrecho de estos pacientes y aumentar la agresividad de la antibioterapia sistémica tras la colocación del nuevo implante. Estos datos junto con los procedentes de los estudios de Torrens et al (288) y Sorlí et al (272) se establece un valor predictivo positivo de cultivo del espaciador de

entre 0,5 y 0,6. En los resultados presentados en este estudio solo 1 animal del grupo control y dos animales del grupo con microcápsulas de rifampicina presentaron cultivos del espaciador positivo. El animal perteneciente al grupo control también presentó cultivos positivos en las muestras de partes blandas y hueso, además de alteraciones de los parámetros hematológicos diagnósticas de infección. No se observó crecimiento bacteriano en ninguna de las muestras de tejido blando ni hueso de ninguno de los dos animales del grupo con microcápsulas de rifampicina y el recuento de CFU procedente del espaciador fue menor de 10.000 CFU en ambos casos. No obstante, uno de estos animales presentó valores hematológicos diagnósticos de infección siendo este el único del grupo de casos que fue considerado como infectado en la interpretación final de los resultados.

Dados los resultados microbiológicos comentados previamente se ha demostrado la superioridad del cemento con gentamicina y microcápsulas de rifampicina en la erradicación de la PJI a nivel de tejido óseo y de partes blandas frente al tratamiento con gentamicina en monoterapia con $p=0,03$ y $p=0,01$ respectivamente.

6. 2. 3. Análisis de la toxicidad de la rifampicina

La **absorción sistémica** de los antibióticos empleados a nivel intra-articular es un hecho conocido pero la tasa de complicaciones es muy baja encontrándose casos aislados en la literatura. No se han encontrado publicaciones de estudios en animales en los que se determine la concentración sistémica de antibióticos tras la colocación de espaciadores de cemento (65). Basándonos en las referencias disponibles de estudios en humanos, cabe destacar el trabajo de Amerstorfer et al (65), en el que se determinan las concentraciones plasmáticas de vancomicina tras la implantación de un espaciador de

cemento con gentamicina a cuya superficie, antes de su fraguado completo, se añade vancomicina en polvo. Realizaron una toma de muestras sanguíneas diaria durante los 5 primeros días postoperatorios identificándose vancomicina en suero solo durante el primer día postoperatorio y a bajas concentraciones, quedando las concentraciones medias de vancomicina de los días subsiguientes por debajo del límite de detección ($<2\mu\text{g/mL}$). En el presente estudio, solo se realizó la determinación de los niveles séricos de rifampicina en el día 11 del ensayo, es decir, 3 días tras la implantación del espaciador. Aunque es cierto que no se identificó rifampicina en suero en ninguno de los animales del grupo de casos en este momento no puede descartarse la elevación de los niveles plasmáticos en los días previos, coincidiendo con el pico de mayor liberación intra-articular del antibiótico, circunstancia que se considera altamente probable en base a la elevación de bilirrubina sérica hayada y que se discutirá a continuación. Se decidió no realizar una toma de muestras sanguíneas previa para realizar esta determinación en un intento de ganar tiempo para la completa reposición de la volemia del animal tras el día 8 del ensayo en el que se realizó una determinación analítica con extracción de 1,5 mL de sangre a la que debe sumarse la pérdida asociada a la cirugía del primer tiempo de recambio.

Debido a la clásica imposibilidad de añadir rifampicina al cemento óseo, no existen artículos previamente publicados sobre el grado de absorción sistémica de la rifampicina intra-articular incluida en el cemento óseo lo que hace que tampoco se encuentren registrados los **efectos adversos** asociados a esta vía de administración. Por ello, la determinación de toxicidad se ha llevado a cabo buscando de forma específica aquellos efectos secundarios de la rifampicina cuando se emplea por vía sistémica (oral o intravenosa) y mediante un control sistemático de los signos de bienestar animal.

A pesar de que la rifampicina se considera un antibiótico moderadamente bien tolerado existen dos efectos adversos considerados graves cuya aparición obliga a la interrupción del tratamiento: la hepatotoxicidad y el síndrome seudogripal. La **hepatotoxicidad** está considerada como un efecto adverso independiente de la dosis administrada que cursa con una elevación de la alanina-amino-transferasa (ALT) hepática. Es importante no confundir la hepatotoxicidad asociada a rifampicina con otro efecto secundario transitorio y sin gran significado patológico que es la **ictericia asintomática** de tipo colestásico. Esta ictericia es debida a la competencia entre la bilirrubina y la rifampicina por el receptor del hepatocito por lo que cursa con elevación de la bilirrubina en sangre. Suele aparecer al inicio del tratamiento y desaparece de forma espontánea en pocos días (28). En el presente estudio, para definir el daño hepático debido a la administración de rifampicina intra-articular se determinaron la ALT y AST como marcadores de hepatotoxicidad y la bilirrubina como marcador de colestasis. A pesar de que la fosfatasa alcalina es uno de los principales marcadores de colestasis utilizados en la práctica clínica no se ha empleado en el presente estudio porque toda aquella lesión ósea que implique un aumento de la actividad osteoblástica cursa con elevación de la misma y dada la naturaleza del estudio es altamente probable que se produzca ese aumento de la actividad osteoblástica (262).

De esta forma se realizó una determinación de los enzimas previamente mencionados a las 1, 2 y 4 semanas de la colocación del espaciador de cemento en ambos grupos de estudio. Los resultados obtenidos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en ninguno de los parámetros estudiados y en ninguno de los momentos del estudio, como puede apreciarse en las tablas 48-50 de la página 159. No se detectó la elevación de la ALT sobre 80UI/mL en ninguno de los animales estudiados, lo que corresponde a un Grado 0 de hepatotoxicidad (160). Se

detectó un aumento de los niveles de bilirrubina en el grupo tratado con microcápsulas de rifampicina que superó el límite de la normalidad de 0,5mg/dL. Este incremento no se acompañó de la elevación de ALT ni AST, correspondiendo a un patrón de colestasis (262). Por ello, el aumento de los niveles de bilirrubina se ha interpretado como el desarrollo de una ictericia asintomática de tipo colestásico en 5 de los animales (62,5%) que se normalizó de forma espontánea a partir de la segunda semana del primer tiempo de recambio protésico.

En la práctica clínica, el desarrollo de un **síndrome pseudogripal** es un proceso de baja incidencia que, durante el tratamiento con rifampicina, traduce una reacción de hipersensibilidad que puede asociar la aparición de urticaria y púrpura con trombocitopenia, leucopenia, hemólisis y fracaso renal secundario a glomerulonefritis o nefritis intersticial (72). En el presente modelo experimental, la valoración de la presencia de urticaria y púrpura no fue factible dadas las características del modelo animal: cuerpo totalmente cubierto por pelo y tendencia a acicalarse de forma frecuente. No se detectó trombocitopenia, leucopenia ni anemia en ninguno de los animales de estudio, es más, se produjo un aumento del recuento plaquetario y leucocitario secundario a la infección que fue descendiendo de forma constante sin llegar a normalizarse tras 4 semanas de la implantación del espaciador. La presencia de fracaso renal fue monitorizada mediante la determinación de los niveles plasmáticos de creatinina. Hay que tener en cuenta que el fracaso renal agudo es la complicación mejor relacionada con el uso de espaciadores con aminoglucósidos como la gentamicina. Pueden encontrarse casos aislados en la literatura como los presentados por van Raaij et al (298), Patrick et al (217) y James et al (116) con el uso de gentamicina en monoterapia independientemente de la dosis. Por ello, de haberse detectado una elevación de los niveles de creatinina plasmática por encima de 2,5mg/dL no podría

atribuirse exclusivamente a la acción tóxica de la rifampicina en el contexto de un síndrome pseudogripal, circunstancia con incidencia notablemente inferior a la nefrotoxicidad por aminoglucósidos (72, 217, 228, 298).

Los resultados obtenidos en el presente estudio no demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en los niveles de creatinina plasmática, manteniéndose los valores medios por debajo de 2,5mg/dL en todos los momentos de estudio con valores de $p=0,4$; 0,2 y 0,4 a las 1, 2 y 4 semanas de la colocación del espaciador. A nivel individual, tampoco se detectó un aumento de la creatinina plasmática en ninguno de los animales.

Además de los efectos adversos sistémicos detallados previamente se valoró la posible aparición de **efectos adversos locales**. Durante la toma de muestras finales se apreció, en 5 de los animales del grupo de casos, la ocupación de la articulación por un líquido espeso de consistencia viscosa. Se realizó un análisis anatomopatológico, previa tinción con hematoxilina-eosina, del líquido articular de un animal del grupo de controles (C5) y tres animales del grupo de casos (R6, R7 y R8) sin encontrarse diferencias en el tipo de células inflamatorias ni en las características histológicas de la matriz de tejido conjuntivo que las envolvía (131). Es altamente probable que la consistencia viscosa del líquido intra-articular en el grupo tratado con microcápsulas de rifampicina tenga su origen en el comportamiento del alginato que las compone. En el proceso de síntesis de las microcápsulas se consigue que el alginato precipite al combinarlo con calcio generándose así un compuesto sólido. Al introducir los compuestos con alginato en el organismo se podría producir un intercambio entre estas iones calcio con los de sodio presentes en el medio (115). Este intercambio iónico induce la licuefacción del alginato dando lugar a un líquido de alta viscosidad pero sin

alterar su biocompatibilidad, lo que explica el aumento de viscosidad encontrado en las articulaciones de los animales del grupo de rifampicina (148, 300).

Por todo lo detallado previamente, queda demostrado el adecuado perfil de seguridad hepática y renal de la rifampicina contenida en microcápsulas de alginato en el tratamiento de la infección periprotésica. También puede afirmarse que el efecto nefrotóxico de los aminoglucósidos no se ve potenciado por la adición de microcápsulas de rifampicina al cemento óseo.

En la actualidad podemos encontrar múltiples ejemplos del uso diario de compuestos de alginato en nuestra práctica clínica pero los campos donde su uso está más extendido son la liberación controlada de fármacos y el tratamiento de heridas complejas (5). Respecto a su aplicación como sistema de liberación controlada de fármacos podemos encontrar ejemplos de uso diario como antiácidos (Gaviscon double action, Slough, UK), encontrándose el alginato de sodio aprobado en diferentes países para el tratamiento de la gastritis y reflujo gastroesofágico. Otros sistemas de liberación controlada de fármacos pueden encontrarse publicados en forma de ensayos clínicos de fase III, como es el caso de Park et al (209) para el tratamiento de la periodontitis. Este grupo sintetiza microcápsulas de alginato con minociclina que inyecta en las bolsas periodontales de 15 pacientes con periodontitis y demuestran la eficacia antibacteriana de las mismas con una degradación adecuada por las lisozimas salivares en 1 semana. Soliman et al (268), prueban en mujeres con adelgazamiento patológico del endometrio secundaria a citrato de clomifeno el efecto de geles mucoadhesivos de alginato con sildenafil.

Los derivados del alginato son una de las principales herramientas para la curación de heridas complejas, encontrándose compuestos con colágeno en productos

comercializados para el tratamiento de las úlceras del pie diabético como Fibracol™ (Acelity, Texas, EEUU). El alginato de plata ha sido propuesto por Meekul et al (184) para la realización de las curas sucesivas de los pacientes con fascitis necrotizante. También parece tener efectos prometedores en el tratamiento de las úlceras asociadas a traqueostomía en la población pediátrica, dados los buenos resultados de este sistema publicados por Hartzell et al (99). Además, el alginato de calcio ha sido reconocido por el grupo de Brenner et al (24) como la mejor opción para la cobertura de la zona donante en los injertos de piel realizados también en la población pediátrica. En su estudio comparan la eficacia de la espuma, la hidrofibra y el alginato de calcio en términos de tiempo hasta cicatrización, siendo menor en el grupo de alginato cálcico. Cabe destacar también que dadas las propiedades hidratantes de los compuestos de alginato están siendo incorporados en la estructura de las lentes de contacto para reducir la incidencia de ojo seco asociado al uso de estos productos sanitarios, con resultados prometedores y sin aparición de efectos adversos locales, como puede observarse en el trabajo publicado por Chong et al (43). Además, la gran biocompatibilidad de los compuestos con alginato hace que puedan emplearse en dispositivos quirúrgicos como vainas reabsorbibles para evitar las fugas de aire tras la resección pulmonar como es el caso de FOREseal (Laboratories Brothier, Nanterre, Francia).

6. 3. RELEVANCIA CLÍNICA DEL CEMENTO CON MICROCÁPSULAS DE RIFAMPICINA

A pesar de que la infección periprotésica es ya una vieja conocida del cirujano ortopédico, las estrategias terapéuticas disponibles distan mucho de considerarse altamente eficaces para la erradicación de la misma. Esta circunstancia se debe a la confluencia de dos factores: la necesidad de administrar dosis elevadas de antibióticos que no pueden tolerarse por vía sistémica para el tratamiento de la infección y a la continua aparición de microorganismos resistentes a los distintos antibióticos empleados en la práctica clínica (86). Actualmente se registran tasas de fracaso del recambio en dos tiempos del 4-19% si la infección es debida a bacterias meticilinsensibles (74, 104) pero asciende hasta el 18-52% si el causante es meticilin-resistente (130, 139). Los dos antibióticos más empleados en la profilaxis de la PJI, al incluirse de forma comercial en el cemento óseo, son la gentamicina y la tobramicina, y ya desde 2005 puede encontrarse constancia de una tasa de resistencias de los estafilococos causantes de la PJI, de un 41% en el caso de la gentamicina y un 66% para la tobramicina (9).

Es evidente que el ritmo de síntesis de nuevos antibióticos se ha visto superado por la velocidad de aparición de microorganismos resistentes. Una de las estrategias empleadas para hacer frente a estos microorganismos resistentes fue analizar de nuevo los espectros de actuación de los antibióticos ya conocidos, circunstancia que llevó a emplear la rifampicina como tratamiento de infecciones no micobacterianas. Dentro de estas, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de infecciones debidas a estafilococos, meticilin-resistentes (MRSA) y meticilin-sensibles (MSSA), que son los más frecuentemente implicados en el desarrollo de la PJI (166, 233, 234). Además, la

rifampicina ha demostrado ser eficaz frente al biofilm formado por los estafilococos, siendo un antibiótico activo tanto sobre los microorganismos en fase estacionaria que conforman el biofilm como sobre las formas planctónicas (146, 265). Asimismo, algunos fenotipos de *Staph. aureus* (SCVs) han demostrado tener la capacidad de comportarse como patógeno intracelular facultativo, es decir, pueden quedar refugiados dentro de las células promoviendo así la cronicidad de la infección. La rifampicina, debido a las elevadas concentraciones intracelulares que es capaz de alcanzar, ha demostrado ser también eficaz en el tratamiento de las formas intracelulares de este estafilococo (64, 219, 284). Por todo ello la rifampicina se ha convertido en un elemento clave en el tratamiento de la PJI al proporcionar buenos resultados en el tratamiento de estas infecciones cuando se administra por vía sistémica (134). El REIPI Group for the Study of Prosthetic Infection, en 2013 (166), analizan en su estudio multicéntrico los resultados del tratamiento de PJI debidas a MSSA y MRSA con retención del implante. Establecen que el tratamiento con rifampicina durante al menos 1 mes desde la cirugía es un factor determinante para el éxito del desbridamiento. Sin embargo, no existe consenso sobre la dosis o intervalo de administración ideales ya que, a pesar de ser un antibiótico que se considera moderadamente bien tolerado, presenta efectos secundarios graves dependientes de dosis. De esta forma, en la actualidad nos encontramos ante un antibiótico de incalculable valor para el tratamiento de la PJI pero limitados en su administración por la toxicidad sistémica asociada (204, 212).

La inclusión de la rifampicina en el cemento óseo es una estrategia que permitiría aumentar la concentración de antibiótico administrado en el lugar de la infección disminuyendo la tasa de efectos secundarios al reducirse su toxicidad sistémica. No obstante, se han llevado a cabo numerosos intentos de incluir la rifampicina en el cemento óseo obteniéndose curvas de liberación in vitro del

antibiótico útiles pero la interferencia con el proceso de fraguado del PMMA no ha permitido obtener cementos aptos para su uso en la práctica clínica, al tratarse de compuestos incapaces de fraguar o con fraguado muy lento en función de la concentración de rifampicina añadida (10, 241, 260).

La alta complejidad de esta situación ha hecho necesario que la mayoría de los esfuerzos actuales destinados a la búsqueda de soluciones para el tratamiento de la PJI se dirijan a mejorar la liberación de antibióticos desde el cemento óseo o buscar métodos alternativos de liberación de antibióticos a nivel intra-articular (112, 152, 153, 242). Mediante la combinación de estas dos estrategias se diseñó en 2016 un sistema de microencapsulación de rifampicina que permitía el correcto fraguado del cemento óseo, manteniendo las propiedades mecánicas de este y la eficacia antimicrobiana de la rifampicina *in vitro* (33, 244). El estudio preclínico *in vivo* detallado en este trabajo ha demostrado que la eficacia antimicrobiana del cemento con rifampicina contenida en microcápsulas de alginato se mantiene en el modelo animal dando lugar a recuentos microbiológicos inferiores a los conseguidos con el uso de gentamicina en dosis profilácticas. También se ha demostrado que este sistema de liberación controlada consigue mantener concentraciones intra-articulares que sobrepasan la CMI estafilocócica. Respecto al análisis de toxicidad, no se ha detectado absorción a nivel sistémico que produzca reacciones de toxicidad que justifiquen la suspensión del tratamiento. Además, dada la excelente biocompatibilidad del alginato empleado para la síntesis de las microcápsulas tampoco se ha detectado la aparición de efectos secundarios a nivel intra-articular.

Teniendo en cuenta los resultados del presente trabajo junto con los resultados *in vitro* publicados previamente por Sanz-Ruíz et al (244) y Carbó et al (33) podemos

considerar las técnicas de liberación controlada de fármacos como una estrategia a explorar y de resultados prometedores en el tratamiento de la infección protésica. Estas técnicas, bien sea la microencapsulación en particular u otras como el empleo de micropartículas, nanopartículas o vesículas, aun están en fases iniciales de aplicación en el tratamiento de patología infecciosa en diversas localizaciones. A nivel pulmonar se están desarrollando para el tratamiento de neumonías por *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* conteniendo antibióticos como la azitromicina, eritromicina, claritromicina, ceftacídima, ciprofloxacino, tobramicina y rapamicina, que son también especialmente útiles en el tratamiento de infecciones broncopulmonares crónicas por *Pseudomonas* en pacientes con fibrosis quística (59, 102, 132, 156, 172, 173, 216, 269, 271, 286, 291, 307). Los sistemas de liberación controlada de fármacos son de especial interés para el tratamiento de la tuberculosis pulmonar. Así, en el campo del tratamiento antituberculoso con rifampicina incluida en estos sistemas de liberación controlada destacan los hallazgos de Justo et al (123), Moretton et al (189) y Pandey et al (207). Justo et al (123) incluyen la rifampicina en liposomas para su administración inhalatoria y sus determinaciones en cobayas demuestran la persistencia de concentraciones eficaces en macrófagos hasta 5 días después de la administración. Moretton et al (189) diseñan micelas con rifampicina para mejorar su solubilidad y estabilidad demostrando una disminución de la degradación y aumentando la biodisponibilidad vía oral de este antibiótico. Pandey et al (207) incluyen la rifampicina en nanopartículas de PLGA y, tras su administración vía oral a cobayas y ratones, demuestran persistencia de liberación de rifampicina tras 9 días de la administración.

Por vía oral se han diseñado micropartículas gastrorretentivas de amoxicilina para el tratamiento del *Helicobacter pylori* (45, 98) y micropartículas pH sensibles cargadas con cefotaxima buscando una liberación prolongada a nivel del colon de

utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (4). También está descrito el desarrollo de micropartículas con sulfadiacina de plata, amikacina, vancomicina, cefalexina y gentamicina para su incorporación en vendajes y apósitos, siendo eficaces en la prevención y tratamiento de heridas contaminadas por *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (147, 278).

En la actualidad se están desarrollando sistemas de liberación controlada de fármacos para su uso en infecciones osteoarticulares cuyos objetivos principales son la profilaxis de la infección asociada a implantes y aumentar el tiempo de liberación del antibiótico desde el cemento óseo. Pueden encontrarse estudios de experimentación animal como los de Lui et al (161) en los que se inocula *S. aureus* intraoperatoriamente y se administran a la vez vancomicina sin microencapsular o vancomicina microencapsulada. Tras 7 días sus resultados microbiológicos demuestran un crecimiento significativamente menor ($p < 0,05$) de *S. aureus* en los lechos tratados con vancomicina microencapsulada. También con la vancomicina como antibiótico de estudio puede encontrarse el trabajo de Parra-Ruíz et al (210) en el que diseñan cementos óseos con daptomicina o linezolid combinados con vancomicina contenidos en micropartículas de ácido poli (D, L-láctico-co-glicólico) para el tratamiento de microorganismos resistentes. Consiguen una liberación prolongada de los antibióticos durante dos meses a concentraciones eficaces frente a *S. aureus* y verifican la biocompatibilidad con osteoblastos humanos.

A pesar de que la ventaja más intuitiva de estos sistemas es que permiten alcanzar altas concentraciones de principio activo a nivel local durante largos periodos de tiempo evitando gran parte de su toxicidad sistémica no debemos olvidar la otra gran ventaja que suponen en el caso particular del tratamiento de la PJI: permiten aislar el

antibiótico de la reacción de polimerización del PMMA. Este hecho se traduce en la posibilidad de incluir en el tratamiento local de la PJI a todos aquellos antimicrobianos termolábiles o que presentan poca estabilidad química al contacto con el monómero que según los conceptos clásicos quedaban excluidos del arsenal terapéutico. Dentro de estos antimicrobianos encontramos antibióticos como las cefalosporinas de segunda y tercera generación, eritromicina, meropenem o tetraciclinas y una gran cantidad de antifúngicos como la anfotericina B, anfotericina B liposomal, bleomicina, miconazol, caspofungina y anidulafungina (92). En el caso específico de la anfotericina B, a pesar de ser considerado un compuesto termolábil, su adición al cemento óseo se realiza de forma frecuente pero su cinética de liberación parece ser motivo de controversia en la bibliografía actual. De esta forma encontramos los estudios de Goss et al (91) y Kweon et al (143) en los que se detecta una nula o mínima liberación de anfotericina B procedente del espaciador frente a los de Marra et al (178) y Houdek et al (107) en los que se detectan una concentraciones eficaces de este antifúngico, aunque en este último trabajo se puntualiza que la cantidad de anfotericina B liberada, aunque consiguiese concentraciones eficaces, no superó el 0,20%.

La posibilidad de incluir todos estos antimicrobianos termolábiles en el PMMA para el tratamiento local de la PJI aumentaría la especificidad del tratamiento, permitiendo utilizar casi cualquier tipo de antibiótico en función de las sensibilidades del microorganismo causal.

A la vista de los resultados de este trabajo el cemento con microcápsulas de rifampicina ha demostrado ser eficaz en el tratamiento in vivo de la infección periprotésica por *Staphylococcus aureus* presentando unas concentraciones intraarticulares por encima de la CMI estafilocócica y sin presentar efectos adversos

sistémicos ni locales que contraindiquen su uso en la práctica clínica. Aún así se consideran necesarios más estudios que permitan ampliar el tamaño muestral para mejorar la calidad de la extrapolación de resultados y la realización de los ensayos preclínicos de toxicidad aguda para definir la dosis máxima de rifampicina que podría incluirse en el PMMA.

6. 4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La principal limitación del presente estudio es el reducido tamaño muestral, el aumento del mismo permitiría aumentar la validez de nuestros resultados e identificar efectos secundarios de baja incidencia. A pesar de ellos, la normativa vigente en lo que a uso de animales de experimentación se refiere considera imprescindible el uso de estrategias para la reducción del número de animales empleados en los ensayos preclínicos, por lo que se han empleado solo tres animales más que el mínimo de 6 por grupo calculado para un nivel de significación de 0,05. El uso de tres animales más se justifica por el aumento del riesgo de no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre grupos por la pérdida temprana de uno de los animales de experimentación.

Respecto a las microcápsulas, se podría decir que la carga en rifampicina de las microcápsulas empleadas en este trabajo fue algo mas baja que los valores indicados en estudios previos (34). El valor mas bajo publicado fue de 3,58%, frente al 2,4% de la cuantificación realizada en el presente estudio. Este hecho puede estar relacionado con la heterogeneidad de las microcápsulas de rifampicina comprobada por microscopía electrónica y es probable que esta heterogenicidad también sea responsable de las dificultades encontradas para homogeneizar la mezcla de la fracción polvo del cemento óseo con las microcápsulas de alginato. Estas dificultades se solventaron mediante el mezclado manual con la fracción líquida consiguiéndose una buena homogenización final.

A la hora de determinar la concentración de rifampicina en sangre tras la colocación del espaciador con las microcápsulas se realizó una única determinación el día 11 del ensayo. Para conseguir datos más representativos del posible paso sistémico

de la rifampicina hubiese sido más exacta la determinación de la concentración del mismo en sangre a las pocas horas de la cirugía, que es el momento de mayor liberación intra-articular. No se realizó por una sospecha ya justificada previamente del compromiso de la volemia del animal. Aun así, el desarrollo en el grupo de casos de unas anomalías en el perfil hepático sugestivas de colestasis hace sospechar que existe un paso de rifampicina sistémico aunque no haya sido detectado en el presente estudio.

Por último, comentar un concepto relacionado con la sobre-esterilización realizada mediante radiaciones gamma de las microcápsulas de rifampicina. Para la preparación de las muestras individuales de cemento óseo para cada uno de los animales fue necesario abrir el contenedor de las microcápsulas por lo que existe el riesgo de pérdida de la esterilidad. Para minimizar ese riesgo se tomaron todas las precauciones posibles mediante el uso de instrumental y guantes estériles y realización de las manipulaciones alrededor del mechero.

6. 5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son alentadores en lo que al uso de espaciadores con rifampicina microencapsulada en el tratamiento de la infección periprotésica estafilocócica en humanos se refiere. Como se ha demostrado, las microcápsulas son un buen vehículo para la liberación de antimicrobianos desde el cemento óseo. Este hecho podría suponer una herramienta de incalculable valor en el tratamiento de **PJI de etiología fúngica** como las debidas a las distintas especies de *Candida* que, a pesar de ser menos frecuentes que las estafilocócicas, asocian peores resultados en su tratamiento. Parte de la responsabilidad del peor pronóstico de estas infecciones fúngicas se debe a los problemas asociados a la incorporación de anfotericina B y voriconazol en el cemento óseo. Como se ha expuesto previamente la cinética de liberación de anfotericina B en el cemento es pobre pero además parece modificar las propiedades mecánicas del mismo. Los estudios de Cunningham et al (54), comparan las características de la liberación de anfotericina B y de la anfotericina B liposomal desde el cemento óseo y hacen un análisis mecánico de ambos compuestos. Determinan la superioridad de la anfotericina B liposomal en lo que a liberación se refiere, consiguiendo dosis eficaces de anfotericina hasta el séptimo día del estudio pero también describen un aumento de la fragilidad del cemento óseo frente al uso de anfotericina B no incluida en liposomas. Un problema similar ha sido descrito por el grupo de Miller et al (186) con la inclusión de voriconazol en el cemento óseo. Describen una adecuada cinética de liberación del antifúngico pero reseñan una disminución de la resistencia a la compresión del cemento óseo.

Como se ha probado en el presente trabajo la el uso de sistemas de liberación controlada permite la liberación del antibiótico manteniéndolo aislado durante el

fraguado del PMMA preservando así las propiedades mecánicas del cemento. Por ello el uso de técnicas de microencapsulación podría permitir mantener las propiedades mecánicas del cemento con voriconazol y el uso de otros métodos como las nanopartículas o microcápsulas podrían ser útiles en el caso de la anfotericina B. Además, el uso de estas técnicas permitiría incluir equinocandinas como la anidulafungina, que son compuestos termolábiles, en el tratamiento de la PJI fúngica.

En ingeniería tisular, la implantación de mallas o sustitutos óseos con microcápsulas de antibióticos podría resultar una forma eficaz de prevenir y tratar la **osteomielitis y pseudoartrosis séptica** (157). Dentro de las investigaciones en curso cabe destacar el trabajo de Yao et al (317), en el que han desarrollado micropartículas de PCL y quitosano cargadas con vancomicina con las que se recubrieron sustitutos óseos cerámicos de Bioglass®. Se observó que las propiedades mecánicas de los sistemas mejoraron significativamente dando lugar a valores de resistencia y de área bajo la curva de tensión-deformación entre 3 y 7 veces mayores que en los sistemas no recubiertos. En el ensayo de liberación in vitro se detectó una liberación rápida del antibiótico en las primeras 8 horas seguida de una liberación sostenida durante 11 días, mientras que al incorporar el antibiótico sin encapsular, la liberación fue completa a las 24h. En otro estudio Li et al (157) recubren estos mismos sustitutos óseos cerámicos con microesferas de PHBV cargadas con vancomicina observándose, de nuevo, una ligera mejora en las propiedades mecánicas del sistema, y confirmándose in vitro que las microesferas no inhibieron su bioactividad al observarse un crecimiento homogéneo de cristales de hidroxiapatita durante 7 días. La vancomicina encapsulada mostró una liberación dual que se mantuvo durante 1 mes.

Pueden encontrarse también ejemplos del desarrollo de sistemas de liberación controlada de antibióticos para el tratamiento de osteomielitis y pseudoartrosis séptica sin su combinación con sustitutos óseos. En su trabajo Wang et al (305) evaluaron in vitro la eficacia de la terapia local con microesferas de cefazolina y gentamicina para la profilaxis de infección asociada a implantes ortopédicos, demostrando persistencia de la liberación de ambos antibióticos durante 2-4 semanas. La ampicilina también ha sido incorporada en microesferas de PLGA para la profilaxis de la osteomielitis, evaluándose en conejos por el grupo de Jacob et al (114) y demostrando resultados superiores a la ampicilina sin microencapsular. Por último, cabe destacar el trabajo de Ueng et al (296) en el que elaboran microcápsulas de alginato que contienen vancomicina junto con células madre mesenquimales de conejo que se cultivaron en un medio osteogénico durante 14 días manteniéndose durante este tiempo concentraciones del antibiótico muy por encima de la CMI de *S. aureus*. Los resultados del estudio in vivo demostraron que tras 4 semanas las microcápsulas implantadas participaron en la formación de hueso nuevo.

Para finalizar, los sistemas de liberación controlada de fármacos podrían formar parte de los **implantes ortopédicos**. En los últimos años se han desarrollado multitud de materiales que se añaden a la superficie de los implantes ortopédicos, principalmente para favorecer su osteointegración. Uno de estos elementos de “cobertura” es el dióxido de titanio que forma parte de implantes dentales y se emplea como recubrimiento de codos no cementados (106, 158). Este dióxido de titanio puede añadirse al componente metálico en forma de nanotubos o compuestos de quitosano (266, 315). En 2016, Rumian et al (236) propusieron un sistema novedoso en el que añaden microcápsulas de PLGA con gentamicina al dióxido de titanio, consiguiéndose la inmovilización de las microcápsulas en la estructura mediante el uso de alginato sódico reticulado. In vitro se

obtuvo una liberación rápida inicial del antibiótico del 22% en 8 horas, seguida de una liberación sostenida durante 6 semanas. Se comprobó la eficacia antimicrobiana frente a *Staphylococcus* spp, y la citocompatibilidad con osteoblastos. En 2017, el mismo grupo probó este mismo sistema con microesferas de PLGA cargadas con vancomicina obteniéndose resultados análogos (237).

7. CONCLUSIONES

1) Se ha diseñado un modelo experimental que permite reproducir de forma fiel el ambiente de la infección periprotésica obteniendo una elevada tasa de infección. Por ello se considera un modelo ideal para el estudio de su patogenia y de distintas posibilidades terapéuticas.

2) Mediante el empleo de la tecnología de impresión 3D se han fabricado implantes específicos de especie que han permitido una rápida recuperación postoperatoria de los animales. Además, su especificidad mejora la estabilidad del implante favoreciendo el desarrollo del biofilm en su superficie.

3) La liberación intra-articular de la rifampicina contenida en las microcápsulas añadidas al cemento óseo presenta niveles por encima de la CMI estafilocócica en todos los momentos de medición. Además, esta curva de liberación a partir del cemento óseo es similar a la presentada por otros antibióticos.

4) Los análisis microbiológicos han demostrado la superioridad estadísticamente significativa del uso de cemento con gentamicina asociado a microcápsulas de rifampicina frente al uso aislado de cemento con gentamicina en el tratamiento de la infección periprotésica.

5) La absorción sistémica de rifampicina no ha dado lugar a efectos secundarios graves. El único efecto encontrado ha sido la ictericia asintomática de tipo colestásico. Por ello se considera una vía segura de administración de rifampicina que permite

administración de altas concentraciones de antibiótico con menor toxicidad que la vía sistémica.

6) El cemento con microcápsulas de rifampicina es eficaz en el tratamiento in vivo de la infección periprotésica por *Staphylococcus aureus* formador de biofilm.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Achermann Y, Eigenmann K, Ledergerber B, Derksen L, Rafeiner P, Clauss M, et al. Factors associated with rifampin resistance in staphylococcal periprosthetic joint infections (PJI): a matched case-control study. *Infection*. 2013;41(2):431-7.
2. Achermann Y, Vogt M, Spormann C, Kolling C, Remschmidt C, Wust J, et al. Characteristics and outcome of 27 elbow periprosthetic joint infections: results from a 14-year cohort study of 358 elbow prostheses. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(3):432-8.
3. Aggarwal VK, Bakhshi H, Ecker NU, Parvizi J, Gehrke T, Kendoff D. Organism profile in periprosthetic joint infection: pathogens differ at two arthroplasty infection referral centers in Europe and in the United States. *J Knee Surg*. 2014;27(5):399-406.
4. Agüero L, Zaldivar D, Pena L, Solis Y, Ramon JA, Dias ML. Preparation and Characterization of pH-Sensitive Microparticles Based on Polyelectrolyte Complexes for Antibiotic Delivery. *Polym Eng Sci*. 2015;55(5):981-7.
5. Ahmad Z, Khuller GK. Alginate-based sustained release drug delivery systems for tuberculosis. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008;5(12):1323-34.
6. Alt V, Kirchhof K, Seim F, Hrubesch I, Lips KS, Mannel H, et al. Rifampicin-fosfomicin coating for cementless endoprostheses: antimicrobial effects against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Acta Biomater*. 2014;10(10):4518-24.
7. Anagnostakos K. Therapeutic Use of Antibiotic-loaded Bone Cement in the Treatment of Hip and Knee Joint Infections. *J Bone Jt Infect*. 2017;2(1):29-37.
8. Anagnostakos K, Kelm J. Enhancement of antibiotic elution from acrylic bone cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;90(1):467-75.
9. Anguita-Alonso P, Hanssen AD, Osmon DR, Trampuz A, Steckelberg JM, Patel R. High rate of aminoglycoside resistance among staphylococci causing prosthetic joint infection. *Clinical orthopaedics and related research*. 2005;439:43-7.
10. Anguita-Alonso P, Rouse MS, Piper KE, Jacofsky DJ, Osmon DR, Patel R. Comparative study of antimicrobial release kinetics from polymethylmethacrylate. *Clinical orthopaedics and related research*. 2006;445:239-44.
11. Arens S, Schlegel U, Printzen G, Ziegler WJ, Perren SM, Hansis M. Influence of materials for fixation implants on local infection. An experimental study of steel versus titanium DCP in rabbits. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1996;78(4):647-51.

12. Arnal-Burro J, Perez-Mananes R, Gallo-Del-Valle E, Igualada-Blazquez C, Cuervas-Mons M, Vaquero-Martin J. Three dimensional-printed patient-specific cutting guides for femoral varization osteotomy: Do it yourself. *Knee*. 2017;24(6):1359-68.
13. Auricchio F, Marconi S. 3D printing: clinical applications in orthopaedics and traumatology. *EFORT Open Rev*. 2016;1(5):121-7.
14. Bain DF, Munday DL, Cox PJ. Evaluation of biodegradable rifampicin-bearing microsphere formulations using a stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay. *Eur J Pharm Sci*. 1998;7(1):57-65.
15. Balaban N, Stoodley P, Fux CA, Wilson S, Costerton JW, Dell'Acqua G. Prevention of staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP. *Clinical orthopaedics and related research*. 2005(437):48-54.
16. Baleani M, Persson C, Zolezzi C, Andollina A, Borrelli AM, Tigani D. Biological and biomechanical effects of vancomycin and meropenem in acrylic bone cement. *The Journal of arthroplasty*. 2008;23(8):1232-8.
17. Bejon P, Berendt A, Atkins BL, Green N, Parry H, Masters S, et al. Two-stage revision for prosthetic joint infection: predictors of outcome and the role of reimplantation microbiology. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(3):569-75.
18. Belmatoug N, Cremieux AC, Bleton R, Volk A, Saleh-Mghir A, Grossin M, et al. A new model of experimental prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a microbiologic, histopathologic, and magnetic resonance imaging characterization. *J Infect Dis*. 1996;174(2):414-7.
19. Berbari EF, Osmon DR, Lahr B, Eckel-Passow JE, Tsaras G, Hanssen AD, et al. The Mayo prosthetic joint infection risk score: implication for surgical site infection reporting and risk stratification. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2012;33(8):774-81.
20. Bernthal NM, Stavrakis AI, Billi F, Cho JS, Kremen TJ, Simon SI, et al. A mouse model of post-arthroplasty *Staphylococcus aureus* joint infection to evaluate in vivo the efficacy of antimicrobial implant coatings. *PLoS One*. 2010;5(9):e12580.
21. Bertazzoni Minelli E, Benini A, Magnan B, Bartolozzi P. Release of gentamicin and vancomycin from temporary human hip spacers in two-stage revision of infected arthroplasty. *J Antimicrob Chemother*. 2004;53(2):329-34.
22. Bode LG, Kluytmans JA, Wertheim HF, Bogaers D, Vandenbroucke-Grauls CM, Roosendaal R, et al. Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*. 2010;362(1):9-17.

23. Bozic KJ, Kamath AF, Ong K, Lau E, Kurtz S, Chan V, et al. Comparative Epidemiology of Revision Arthroplasty: Failed THA Poses Greater Clinical and Economic Burdens Than Failed TKA. *Clinical orthopaedics and related research*. 2015;473(6):2131-8.
24. Brenner M, Hilliard C, Peel G, Crispino G, Geraghty R, O'Callaghan G. Management of pediatric skin-graft donor sites: a randomized controlled trial of three wound care products. *J Burn Care Res*. 2015;36(1):159-66.
25. Buchholz HW, Engelbrecht H. [Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins]. *Chirurg*. 1970;41(11):511-5.
26. Bue M, Hanberg P, Koch J, Jensen LK, Lundorff M, Aalbaek B, et al. Single-dose bone pharmacokinetics of vancomycin in a porcine implant-associated osteomyelitis model. *J Orthop Res*. 2018;36(4):1093-8.
27. Burkholder T. The rabbit as an experimental model. *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*: Elsevier; 2012.
28. Burman WJ, Gallicano K, Peloquin C. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(5):327-41.
29. Burnett RS, Aggarwal A, Givens SA, McClure JT, Morgan PM, Barrack RL. Prophylactic antibiotics do not affect cultures in the treatment of an infected TKA: a prospective trial. *Clinical orthopaedics and related research*. 2010;468(1):127-34.
30. Cabrita HB, Croci AT, Camargo OP, Lima AL. Prospective study of the treatment of infected hip arthroplasties with or without the use of an antibiotic-loaded cement spacer. *Clinics (Sao Paulo)*. 2007;62(2):99-108.
31. Calleja I, Blanco-Prieto MJ, Ruz N, Renedo MJ, Dios-Vieitez MC. High-performance liquid-chromatographic determination of rifampicin in plasma and tissues. *J Chromatogr A*. 2004;1031(1-2):289-94.
32. Carbó-Laso E. Estudio experimental de la utilización de rifampicina microencapsulada en el polimetilmetacrilato: propiedades químicas, mecánicas y microbiológicas. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2016.
33. Carbo-Laso E, Sanz-Ruiz P, Del Real-Romero JC, Ballesteros-Iglesias Y, Paz-Jimenez E, Aran-Ais F, et al. Nuevo método de liberación de antibióticos del cemento óseo (polimetilmetacrilato): redefiniendo los límites. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2017.

34. Carbo-Laso E, Sanz-Ruíz, P., Vaquero-Martín, J., Real-Romero, J., Ballesteros-Iglesias, M., Paz-Jimenez, E., Arán, F., Pérez-Limiñana, M., Sánchez-Navarro, M., inventor Bone Cement With Microencapsulated Antimicrobial. Spain 2017.
35. Carli AV, Bhimani S, Yang X, Shirley MB, de Mesy Bentley KL, Ross FP, et al. Quantification of Peri-Implant Bacterial Load and in Vivo Biofilm Formation in an Innovative, Clinically Representative Mouse Model of Periprosthetic Joint Infection. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2017;99(6):e25.
36. Carli AV, Ross FP, Bhimani SJ, Nodzo SR, Bostrom MP. Developing a Clinically Representative Model of Periprosthetic Joint Infection. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2016;98(19):1666-76.
37. Castaneda S, Largo R, Calvo E, Rodriguez-Salvanes F, Marcos ME, Diaz-Curiel M, et al. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol*. 2006;35(1):34-41.
38. Chang CC, Merritt K. Infection at the site of implanted materials with and without preadhered bacteria. *J Orthop Res*. 1994;12(4):526-31.
39. Chen AF, Parvizi J. Antibiotic-loaded bone cement and periprosthetic joint infection. *J Long Term Eff Med Implants*. 2014;24(2-3):89-97.
40. Chen J, Cui Y, Li X, Miao X, Wen Z, Xue Y, et al. Risk factors for deep infection after total knee arthroplasty: a meta-analysis. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2013;133(5):675-87.
41. Chen X, Ku S, Weibel JA, Ximenes E, Liu X, Ladisch M, et al. Enhanced Antimicrobial Efficacy of Bimetallic Porous CuO Microspheres Decorated with Ag Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(45):39165-73.
42. Chohfi M, Langlais F, Fourastier J, Minet J, Thomazeau H, Cormier M. Pharmacokinetics, uses, and limitations of vancomycin-loaded bone cement. *International orthopaedics*. 1998;22(3):171-7.
43. Chong PQ, Yeo S, Too CL, Boo C, Tong L. Effects of wearing a daily disposable lens on tear film: a randomised controlled trial. *Clin Exp Optom*. 2016;99(3):241-7.
44. Chopra R, Shaikh S, Chatzinoff Y, Munaweera I, Cheng B, Daly SM, et al. Employing high-frequency alternating magnetic fields for the non-invasive treatment of prosthetic joint infections. *Sci Rep*. 2017;7(1):7520.

45. Chun MK, Sah H, Choi HK. Preparation of mucoadhesive microspheres containing antimicrobial agents for eradication of H-pylori. *Int J Pharmaceut.* 2005;297(1-2):172-9.
46. Clasper JC, Stapley SA, Bowley DM, Kenward CE, Taylor V, Watkins PE. Spread of infection, in an animal model, after intramedullary nailing of an infected external fixator pin track. *J Orthop Res.* 2001;19(1):155-9.
47. Clauss M, Trampuz A, Borens O, Böhner M, Ilchmann T. Biofilm formation on bone grafts and bone graft substitutes: comparison of different materials by a standard in vitro test and microcalorimetry. *Acta Biomater.* 2010;6(9):3791-7.
48. Cordero J, Munuera L, Folgueira MD. Influence of metal implants on infection. An experimental study in rabbits. *The Journal of bone and joint surgery British volume.* 1994;76(5):717-20.
49. Cordero J, Munuera L, Folgueira MD. The influence of the chemical composition and surface of the implant on infection. *Injury.* 1996;27 Suppl 3:SC34-7.
50. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-45.
51. Coulter CA, Flecknell PA, Leach MC, Richardson CA. Reported analgesic administration to rabbits undergoing experimental surgical procedures. *BMC Vet Res.* 2011;7:12.
52. Craig MR, Poelstra KA, Sherrell JC, Kwon MS, Belzile EL, Brown TE. A novel total knee arthroplasty infection model in rabbits. *J Orthop Res.* 2005;23(5):1100-4.
53. Crum JA, LaPrade RF, Wentorf FA. The anatomy of the posterolateral aspect of the rabbit knee. *J Orthop Res.* 2003;21(4):723-9.
54. Cunningham B, McLaren AC, Pauken C, McLemore R. Liposomal Formulation Increases Local Delivery of Amphotericin from Bone Cement: A Pilot Study. *Clinical orthopaedics and related research.* 2012;470(10):2671-6.
55. Dall GF, Tsang SJ, Gwynne PJ, MacKenzie SP, Simpson A, Breusch SJ, et al. Unexpected synergistic and antagonistic antibiotic activity against *Staphylococcus* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2018.
56. Deirmengian C, Greenbaum J, Lotke PA, Booth RE, Jr., Lonner JH. Limited success with open debridement and retention of components in the treatment of acute *Staphylococcus aureus* infections after total knee arthroplasty. *The Journal of arthroplasty.* 2003;18(7 Suppl 1):22-6.

57. Della Valle C, Parvizi J, Bauer TW, DiCesare PE, Evans RP, Segreti J, et al. American Academy of Orthopaedic Surgeons clinical practice guideline on: the diagnosis of periprosthetic joint infections of the hip and knee. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2011;93(14):1355-7.
58. Diefenbeck M, Muckley T, Hofmann GO. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. *Injury*. 2006;37 Suppl 2:S95-104.
59. Dimer F, Carvalho-Wodarz CD, Hauptenthal J, Hartmann R, Lehr CM. Inhalable Clarithromycin Microparticles for Treatment of Respiratory Infections. *Pharm Res-Dordr*. 2015;32(12):3850-61.
60. Dorati R, DeTrizio A, Genta I, Grisoli P, Merelli A, Tomasi C, et al. An experimental design approach to the preparation of pegylated polylactide-co-glicolide gentamicin loaded microparticles for local antibiotic delivery. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;58:909-17.
61. Duncan CP, Beauchamp C. A temporary antibiotic-loaded joint replacement system for management of complex infections involving the hip. *Orthop Clin North Am*. 1993;24(4):751-9.
62. Dunne WM, Jr., Mason EO, Jr., Kaplan SL. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(12):2522-6.
63. Duran N, Alvarenga MA, Da Silva EC, Melo PS, Marcato PD. Microencapsulation of antibiotic rifampicin in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Arch Pharm Res*. 2008;31(11):1509-16.
64. Dusane DH, Kyrouac D, Petersen I, Bushrow L, Calhoun JH, Granger JF, et al. Targeting intracellular *Staphylococcus aureus* to lower recurrence of orthopaedic infection. *J Orthop Res*. 2018;36(4):1086-92.
65. Edelstein AI, Okroj KT, Rogers T, Della Valle CJ, Sporer SM. Systemic Absorption of Antibiotics From Antibiotic-Loaded Cement Spacers for the Treatment of Periprosthetic Joint Infection. *The Journal of arthroplasty*. 2017.
66. Egloff C, Sawatsky A, Leonard T, Fung T, Valderrabano V, Herzog W. Alterations in patellofemoral kinematics following vastus medialis transection in the anterior cruciate ligament deficient rabbit knee. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2014;29(5):577-82.

67. Erivan R, Lecointe T, Villatte G, Mulliez A, Descamps S, Boisgard S. Complications with cement spacers in 2-stage treatment of periprosthetic joint infection on total hip replacement. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2017.
68. Esteban J, Gadea I, Perez-Jorge C, Sandoval E, Garcia-Canete J, Fernandez-Roblas R, et al. Diagnosis of spacer-associated infection using quantitative cultures from sonicated antibiotics-loaded spacers: implications for the clinical outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(2):207-13.
69. Fadero PE, Shah M. Three dimensional (3D) modelling and surgical planning in trauma and orthopaedics. *Surgeon.* 2014;12(6):328-33.
70. Faschingbauer M, Reichel H, Bieger R, Kappe T. Mechanical complications with one hundred and thirty eight (antibiotic-laden) cement spacers in the treatment of periprosthetic infection after total hip arthroplasty. *International orthopaedics.* 2015;39(5):989-94.
71. Flores C, Degoutin S, Chai F, Raoul G, Hornez JC, Martel B, et al. Gentamicin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for the prevention of maxillofacial and orthopedic implant infections. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;64:108-16.
72. Flórez J AJ, Mediavilla A. *Farmacología humana.* 4 ed. Barcelona, España: MASSON; 2005. 1400 p.
73. Florschütz AV, Lane PD, Crosby LA. Infection after primary anatomic versus primary reverse total shoulder arthroplasty. *J Shoulder Elbow Surg.* 2015;24(8):1296-301.
74. Ford AN, Holzmeister AM, Rees HW, Belich PD. Characterization of Outcomes of 2-Stage Exchange Arthroplasty in the Treatment of Prosthetic Joint Infections. *The Journal of arthroplasty.* 2018.
75. Fox D, O'Connor R, Mallon P, McMahon G. Simultaneous determination of efavirenz, rifampicin and its metabolite desacetyl rifampicin levels in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;56(4):785-91.
76. Frame M, Leach W. DIY 3D printing of custom orthopaedic implants: a proof of concept study. *Surg Technol Int.* 2014;24:314-7.
77. Franco PH, Chellini PR, Oliveira MA, Pianetti GA. Simultaneous Determination of First-Line 4-FDC Antituberculosis Drugs by UHPLC-UV and HPLC-UV: A Comparative Study. *J AOAC Int.* 2017.

78. Frommelt L. Principles of systemic antimicrobial therapy in foreign material associated infection in bone tissue, with special focus on periprosthetic infection. *Injury*. 2006;37 Suppl 2:S87-94.
79. Frommelt LK, K-D. Properties of bone cement: Antibiotic-loaded cement. . Breusch SM, H., editor. Berlin Heidelberg 2005.
80. Gainza G, Aguirre JJ, Pedraz JL, Hernandez RM, Igartua M. rhEGF-loaded PLGA-Alginate microspheres enhance the healing of full-thickness excisional wounds in diabetised Wistar rats. *Eur J Pharm Sci*. 2013;50(3-4):243-52.
81. Galvez-Lopez R, Pena-Monje A, Antelo-Lorenzo R, Guardia-Olmedo J, Moliz J, Hernandez-Quero J, et al. Elution kinetics, antimicrobial activity, and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded acrylic bone cement. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(1):70-4.
82. Garcia S, Soriano A, Esteban P, Almela M, Gallart X, Mensa J. [Usefulness of adding antibiotic to cement in one stage exchange of chronic infection in total hip arthroplasty]. *Med Clin (Barc)*. 2005;125(4):138-9.
83. Gardner J, Gioe TJ, Tatman P. Can this prosthesis be saved?: implant salvage attempts in infected primary TKA. *Clinical orthopaedics and related research*. 2011;469(4):970-6.
84. Gasparini G, De Gori M, Calonego G, Della Bora T, Caroleo B, Galasso O. Drug elution from high-dose antibiotic-loaded acrylic cement: a comparative, in vitro study. *Orthopedics*. 2014;37(11):e999-1005.
85. Gehrke T, Alijanipour P, Parvizi J. The management of an infected total knee arthroplasty. *Bone Joint J*. 2015;97-B(10 Suppl A):20-9.
86. George J, Newman JM, Klika AK, Miller EM, Tan TL, Parvizi J, et al. Changes in Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Between the Stages of 2-Stage Revision Arthroplasty. *The Journal of arthroplasty*. 2018.
87. Giavaresi G, Bertazzoni Minelli E, Sartori M, Benini A, Della Bora T, Sambri V, et al. Microbiological and pharmacological tests on new antibiotic-loaded PMMA-based composites for the treatment of osteomyelitis. *J Orthop Res*. 2012;30(3):348-55.
88. Gilchrist SE, Lange D, Letchford K, Bach H, Fazli L, Burt HM. Fusidic acid and rifampicin co-loaded PLGA nanofibers for the prevention of orthopedic implant associated infections. *J Control Release*. 2013;170(1):64-73.

89. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, et al. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol.* 1988;255(4 Pt 1):E416-21.
90. Gimeno M, Pinczowski P, Vazquez FJ, Perez M, Santamaria J, Arruebo M, et al. Porous orthopedic steel implant as an antibiotic eluting device: prevention of post-surgical infection on an ovine model. *Int J Pharm.* 2013;452(1-2):166-72.
91. Goss B, Lutton C, Weinrauch P, Jabur M, Gillett G, Crawford R. Elution and mechanical properties of antifungal bone cement. *Journal of Arthroplasty.* 2007;22(6):902-8.
92. Goss B, Lutton C, Weinrauch P, Jabur M, Gillett G, Crawford R. Elution and mechanical properties of antifungal bone cement. *The Journal of arthroplasty.* 2007;22(6):902-8.
93. Goutal S, Auvity S, Legrand T, Hauquier F, Cisternino S, Chapy H, et al. Validation of a simple HPLC-UV method for rifampicin determination in plasma: Application to the study of rifampicin arteriovenous concentration gradient. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;123:173-8.
94. Greimel F, Scheuerer C, Gessner A, Simon M, Kalteis T, Grifka J, et al. Efficacy of antibiotic treatment of implant-associated *Staphylococcus aureus* infections with moxifloxacin, flucloxacillin, rifampin, and combination therapy: an animal study. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:1729-36.
95. Gumbo T, Louie A, Deziel MR, Liu W, Parsons LM, Salfinger M, et al. Concentration-dependent *Mycobacterium tuberculosis* killing and prevention of resistance by rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(11):3781-8.
96. Hachicha W, Kodjikian L, Fessi H. Preparation of vancomycin microparticles: importance of preparation parameters. *Int J Pharm.* 2006;324(2):176-84.
97. Han CD, Oh T, Cho SN, Yang JH, Park KK. Isoniazid could be used for antibiotic-loaded bone cement for musculoskeletal tuberculosis: an in vitro study. *Clinical orthopaedics and related research.* 2013;471(7):2400-6.
98. Hao SL, Wang BC, Wang YZ. Researching the dose ratio in a controlled release multiple-drug delivery system: using combination therapy with porous microparticles for the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *J Mater Chem B.* 2015;3(3):417-31.
99. Hartzell LD, Havens TN, Odom BH, Stillman TG, Boswell JL, Bower CM, et al. Enhanced tracheostomy wound healing using maltodextrin and silver alginate compounds in pediatrics: a pilot study. *Respir Care.* 2014;59(12):1857-62.

100. Helbig L, Simank HG, Lorenz H, Putz C, Wolfl C, Suda AJ, et al. Establishment of a new methicillin resistant *Staphylococcus aureus* animal model of osteomyelitis. *International orthopaedics*. 2014;38(4):891-7.
101. Hendriks JG, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. *Biomaterials*. 2004;25(3):545-56.
102. Hickey AJ, Durham PG, Dharmadhikari A, Nardell EA. Inhaled drug treatment for tuberculosis: Past progress and future prospects. *J Control Release*. 2016;240:127-34.
103. Hirai J, Hagihara M, Kato H, Sakanashi D, Nishiyama N, Koizumi Y, et al. Investigation on rifampicin administration from the standpoint of pharmacokinetics/pharmacodynamics in a neutropenic murine thigh infection model. *J Infect Chemother*. 2016;22(6):387-94.
104. Hofmann AA, Goldberg T, Tanner AM, Kurtin SM. Treatment of infected total knee arthroplasty using an articulating spacer: 2- to 12-year experience. *Clinical orthopaedics and related research*. 2005(430):125-31.
105. Holsapple MP, West LJ, Landreth KS. Species comparison of anatomical and functional immune system development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2003;68(4):321-34.
106. Hosoki M, Nishigawa K, Miyamoto Y, Ohe G, Matsuka Y. Allergic contact dermatitis caused by titanium screws and dental implants. *J Prosthodont Res*. 2016;60(3):213-9.
107. Houdek MT, Greenwood-Quaintance KE, Morrey ME, Patel R, Hanssen AD. Elution of High Dose Amphotericin B Deoxycholate From Polymethylmethacrylate. *Journal of Arthroplasty*. 2015;30(12):2308-10.
108. Hsieh PH, Shih CH, Chang YH, Lee MS, Shih HN, Yang WE. Two-stage revision hip arthroplasty for infection: comparison between the interim use of antibiotic-loaded cement beads and a spacer prosthesis. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2004;86-A(9):1989-97.
109. Hsu AR, Haddad SL, Myerson MS. Evaluation and management of the painful total ankle arthroplasty. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2015;23(5):272-82.

110. Huang H, Wu, C., Chen, J. . The effects of gamma irradiation sterilization temperature, and pH on the antimicrobial activity of epinecidin-1. *Journal of Marine Science and Technology-Taiwan*. 2017;25(3):352-7.
111. Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1) (2005).
112. Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials*. 2016;81:58-71.
113. Isiklar ZU, Demirors H, Akpınar S, Tandogan RN, Alparslan M. Two-stage treatment of chronic staphylococcal orthopaedic implant-related infections using vancomycin impregnated PMMA spacer and rifampin containing antibiotic protocol. *Bull Hosp Jt Dis*. 1999;58(2):79-85.
114. Jacob E, Setterstrom JA, Bach DE, Heath JR, 3rd, McNiesh LM, Cierny G, 3rd. Evaluation of biodegradable ampicillin anhydrate microcapsules for local treatment of experimental staphylococcal osteomyelitis. *Clinical orthopaedics and related research*. 1991(267):237-44.
115. Jain D, Bar-Shalom D. Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research. *Drug Dev Ind Pharm*. 2014;40(12):1576-84.
116. James A, Larson T. Acute renal failure after high-dose antibiotic bone cement: case report and review of the literature. *Ren Fail*. 2015;37(6):1061-6.
117. Jeon SJ, Oh M, Yeo WS, Galvao KN, Jeong KC. Underlying mechanism of antimicrobial activity of chitosan microparticles and implications for the treatment of infectious diseases. *PLoS One*. 2014;9(3):e92723.
118. Jindani A, Borgulya G, de Patino IW, Gonzales T, de Fernandes RA, Shrestha B, et al. A randomised Phase II trial to evaluate the toxicity of high-dose rifampicin to treat pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016;20(6):832-8.
119. Jiranek WA, Waligora AC, Hess SR, Golladay GL. Surgical Treatment of Prosthetic Joint Infections of the Hip and Knee: Changing Paradigms? *The Journal of arthroplasty*. 2015;30(6):912-8.
120. Johal HS, Garg T, Rath G, Goyal AK. Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. *Drug Deliv*. 2016;23(2):550-63.
121. Johansson A, Lindgren JU, Nord CE, Svensson O. Material and design in haematogenous implant-associated infections in a rabbit model. *Injury*. 1999;30(10):651-7.
122. Johnson PJ, Levin BR. Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Genet*. 2013;9(1):e1003123.

123. Justo OR, Moraes AM. Incorporation of antibiotics in liposomes designed for tuberculosis therapy by inhalation. *Drug Deliv.* 2003;10(3):201-7.
124. Kabata J, Gratwohl A, Tichelli A, John L, Speck B. Hematologic values of New Zealand white rabbits determined by automated flow cytometry. *Lab Anim Sci.* 1991;41(6):613-9.
125. Kang SL, Rybak MJ, McGrath BJ, Kaatz GW, Seo SM. Pharmacodynamics of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, alone and in combination with rifampin, against methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(12):2702-9.
126. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhave A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *Lancet.* 2016;387(10016):386-94.
127. Kapadia BH, Pivec R, Johnson AJ, Issa K, Naziri Q, Daley JA, et al. Infection prevention methodologies for lower extremity total joint arthroplasty. *Expert Rev Med Devices.* 2013;10(2):215-24.
128. Katherine E. Quesenberry JWC. *Ferrets, Rabbits and Rodents. Clinical Medicine and Surgery.* 2 ed. Missouri: Saunders; 2004. 461 p.
129. Kendall RW, Duncan CP, Beauchamp CP. Bacterial growth on antibiotic-loaded acrylic cement. A prospective in vivo retrieval study. *The Journal of arthroplasty.* 1995;10(6):817-22.
130. Kilgus DJ, Howe DJ, Strang A. Results of periprosthetic hip and knee infections caused by resistant bacteria. *Clinical orthopaedics and related research.* 2002(404):116-24.
131. Klatt EC. *Robbins y Cotran. Atlas de Anatomía Patológica.* . 1 ed. Elsevier, editor2007.
132. Klinger-Strobel M, Lautenschlager C, Fischer D, Mainz JG, Bruns T, Tuchscher L, et al. Aspects of pulmonary drug delivery strategies for infections in cystic fibrosis - where do we stand? *Expert Opin Drug Del.* 2015;12(8):1351-74.
133. Klouche S, Sariali E, Mamoudy P. Total hip arthroplasty revision due to infection: a cost analysis approach. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2010;96(2):124-32.
134. Konig DP, Schierholz JM, Munnich U, Rutt J. Treatment of staphylococcal implant infection with rifampicin-ciprofloxacin in stable implants. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2001;121(5):297-9.
135. Koo KH, Yang JW, Cho SH, Song HR, Park HB, Ha YC, et al. Impregnation of vancomycin, gentamicin, and cefotaxime in a cement spacer for two-stage cementless

- reconstruction in infected total hip arthroplasty. *The Journal of arthroplasty*. 2001;16(7):882-92.
136. Koyonos L, Zmistowski B, Della Valle CJ, Parvizi J. Infection control rate of irrigation and debridement for periprosthetic joint infection. *Clinical orthopaedics and related research*. 2011;469(11):3043-8.
137. Kuehn KD, Ege W, Gopp U. Acrylic bone cements: composition and properties. *Orthop Clin North Am*. 2005;36(1):17-28, v.
138. Kummer A, Tabin UF, Borens O. Effect of Sonication on the Elution of Antibiotics from Polymethyl Methacrylate (PMMA). *J Bone Jt Infect*. 2017;2(4):208-12.
139. Kurd MF, Ghanem E, Steinbrecher J, Parvizi J. Two-stage exchange knee arthroplasty: does resistance of the infecting organism influence the outcome? *Clinical orthopaedics and related research*. 2010;468(8):2060-6.
140. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *The Journal of arthroplasty*. 2012;27(8 Suppl):61-5 e1.
141. Kusuma SK, Ward J, Jacofsky M, Sporer SM, Della Valle CJ. What is the role of serological testing between stages of two-stage reconstruction of the infected prosthetic knee? *Clinical orthopaedics and related research*. 2011;469(4):1002-8.
142. Kuzyk PR, Dhotar HS, Sternheim A, Gross AE, Safir O, Backstein D. Two-stage revision arthroplasty for management of chronic periprosthetic hip and knee infection: techniques, controversies, and outcomes. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2014;22(3):153-64.
143. Kweon C, McLaren AC, Leon C, McLemore R. Amphotericin B Delivery From Bone Cement Increases With Porosity but Strength Decreases. *Clinical orthopaedics and related research*. 2011;469(11):3002-7.
144. Lautenschlager EP, Jacobs JJ, Marshall GW, Meyer PR, Jr. Mechanical properties of bone cements containing large doses of antibiotic powders. *J Biomed Mater Res*. 1976;10(6):929-38.
145. Lecaroz C, Campanero MA, Gamazo C, Blanco-Prieto MJ. Determination of gentamicin in different matrices by a new sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectrometric method. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(3):557-63.

146. Lee CY, Huang CH, Lu PL, Ko WC, Chen YH, Hsueh PR. Role of rifampin for the treatment of bacterial infections other than mycobacteriosis. *J Infect.* 2017;75(5):395-408.
147. Lee JE, Park JC, Lee KH, Oh SH, Kim JG, Suh H. An infection-preventing bilayered collagen membrane containing antibiotic-loaded hyaluronan microparticles: Physical and biological properties. *Artificial Organs.* 2002;26(7):636-46.
148. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2012;37(1):106-26.
149. Lee MY, Bourgeois S, Almouazen E, Pelletier J, Renaud F, Fessi H, et al. Microencapsulation of rifampicin for the prevention of endophthalmitis: In vitro release studies and antibacterial assessment. *Int J Pharm.* 2016;505(1-2):262-70.
150. Lee YS, Koo KH, Kim HJ, Tian S, Kim TY, Maltenfort MG, et al. Synovial Fluid Biomarkers for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of bone and joint surgery American volume.* 2017;99(24):2077-84.
151. Legnoverde MS BE. Influence of particle size on the absorption and release of cephalexin encapsulated in mesoporous silica SBA-15. *Materials Letters.* 2016;181(Oct):331-4.
152. Leng M, Hu S, Lu A, Cai M, Luo X. The anti-bacterial poly(caprolactone)-poly(quaternary ammonium salt) as drug delivery carriers. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(7):3049-59.
153. Levack AE, Cyphert EL, Bostrom MP, Hernandez CJ, von Recum HA, Carli AV. Current Options and Emerging Biomaterials for Periprosthetic Joint Infection. *Curr Rheumatol Rep.* 2018;20(6):33.
154. Lewis G, Janna S. The in vitro elution of gentamicin sulfate from a commercially available gentamicin-loaded acrylic bone cement, VersaBond AB. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004;71(1):77-83.
155. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:357-72.
156. Li T, Wen J, Jiang WL, Gong M, Yang ZQ, Xiao H. [Antimicrobial effects of erythromycin microspheres against *Mycoplasma Pneumoniae* in rats]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2008;28(10):1875-7.
157. Li W, Ding YP, Rai R, Roether JA, Schubert DW, Boccaccini AR. Preparation and characterization of PHBV microsphere/45S5 bioactive glass composite scaffolds with vancomycin releasing function. *Mat Sci Eng C-Mater.* 2014;41:320-8.

158. Lilja M, Forsgren J, Welch K, Astrand M, Engqvist H, Stromme M. Photocatalytic and antimicrobial properties of surgical implant coatings of titanium dioxide deposited through cathodic arc evaporation. *Biotechnol Lett.* 2012;34(12):2299-305.
159. Lima ESAA, Silva-Filho RG, Fernandes HMZ, Saramago CSM, Viana AS, Souza MJ, et al. Sub-Inhibitory Concentrations of Rifampicin Strongly Stimulated Biofilm Production in *S. aureus*. *Open Microbiol J.* 2017;11:142-51.
160. Lindström-Gommers L, Balkamos G, Salmonson T, Tominaga T, Nakashima N, Yasuda N, et al., editors. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Clinical safety data management definitions and standards for expediting reporting; 1994; Geneva, Switzerland.
161. Liu G, Chen S, Fang J, Xu BS, Li S, Hao YH, et al. Vancomycin microspheres reduce postoperative spine infection in an in vivo rabbit model. *Bmc Pharmacol Toxicol.* 2016;17.
162. Liu J, Sun J, Zhang W, Gao K, He Z. HPLC determination of rifampicin and related compounds in pharmaceuticals using monolithic column. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;46(2):405-9.
163. Liu Y, Cui J, Wang R, Wang X, Drlica K, Zhao X. Selection of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* during tuberculosis therapy: concurrent bacterial eradication and acquisition of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(6):1172-5.
164. Liu Y, Tay JH. Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *J Appl Microbiol.* 2001;90(3):337-42.
165. Lonner JH, Siliski JM, Della Valle C, DiCesare P, Lotke PA. Role of knee aspiration after resection of the infected total knee arthroplasty. *Am J Orthop (Belle Mead NJ).* 2001;30(4):305-9.
166. Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA, Soriano A, Sanchez-Somolinos M, Baraia-Etxaburu JM, et al. A large multicenter study of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections managed with implant retention. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2013;56(2):182-94.
167. Louveau B, Fernandez C, Zahr N, Sauvageon-Martre H, Maslanka P, Faure P, et al. Determination of rifampicin in human plasma by high-performance liquid

chromatography coupled with ultraviolet detection after automatized solid-liquid extraction. *Biomed Chromatogr.* 2016;30(12):2009-15.

168. Ma G. Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: strategy, preparation, and applications. *J Control Release.* 2014;193:324-40.

169. Ma Z, Kim D, Adesogan AT, Ko S, Galvao K, Jeong KC. Chitosan Microparticles Exert Broad-Spectrum Antimicrobial Activity against Antibiotic-Resistant Micro-organisms without Increasing Resistance. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(17):10700-9.

170. Magnan B, Bondi M, Maluta T, Samaila E, Schirru L, Dall'Oca C. Acrylic bone cement: current concept review. *Musculoskeletal surgery.* 2013;97(2):93-100.

171. Malizos KN. Global Forum: The Burden of Bone and Joint Infections: A Growing Demand for More Resources. *The Journal of bone and joint surgery American volume.* 2017;99(5):e20.

172. Manca ML, Cassano R, Valenti D, Trombino S, Ferrarelli T, Picci N, et al. Isoniazid-gelatin conjugate microparticles containing rifampicin for the treatment of tuberculosis. *J Pharm Pharmacol.* 2013;65(9):1302-11.

173. Manca ML, Valenti D, Sales OD, Nacher A, Fadda AM, Manconi M. Fabrication of polyelectrolyte multilayered vesicles as inhalable dry powder for lung administration of rifampicin. *Int J Pharm.* 2014;472(1-2):102-9.

174. Manning PJ, Ringler DH, Newcomer CE. *The biology of the laboratory rabbit.* 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1994. xiii, 483 p. p.

175. Marculescu CE, Berbari EF, Hanssen AD, Steckelberg JM, Harmsen SW, Mandrekar JN, et al. Outcome of prosthetic joint infections treated with debridement and retention of components. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2006;42(4):471-8.

176. Mariaux S, Furustrand T, Tiffin U, Borens O. Diagnosis of Persistent Infection in Prosthetic Two-Stage Exchange: Evaluation of the Effect of Sonication on Antibiotic Release from Bone Cement Spacers. *J Bone Jt Infect.* 2018;3(1):37-42.

177. Marques MRC, Loebenberg, R., Almukainzi, M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technologies.* 2011;8(3):15-28.

178. Marra F, Robbins GM, Masri BA, Duncan C, Wasan KM, Kwong EH, et al. Amphotericin B-loaded bone cement to treat osteomyelitis caused by *Candida albicans*. *Canadian Journal of Surgery.* 2001;44(5):383-6.

179. Martiniakova M, Omelka R, Chrenek P, Ryban L, Parkanyi V, Grosskopf B, et al. Changes of femoral bone tissue microstructure in transgenic rabbits. *Folia Biol (Praha)*. 2005;51(5):140-4.
180. Masri BA, Duncan CP, Beauchamp CP. Long-term elution of antibiotics from bone-cement: an in vivo study using the prosthesis of antibiotic-loaded acrylic cement (PROSTALAC) system. *The Journal of arthroplasty*. 1998;13(3):331-8.
181. Maurer TB, Ochsner PE. [Infected knee arthroplasty. A treatment algorithm at the Kantonsspital Liestal, Switzerland]. *Orthopade*. 2006;35(9):917-8, 20-8.
182. McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirtliff M, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol*. 2014;9(8):987-1007.
183. McLaren AC, McLaren SG, McLemore R, Vernon BL. Particle size of fillers affects permeability of polymethylmethacrylate. *Clinical orthopaedics and related research*. 2007;461:64-7.
184. Meekul J, Chotirosniramit A, Himakalasa W, Orrapin S, Wongthanee A, Pongtam O, et al. A Randomized Controlled Trial on the Outcome in Comparing an Alginate Silver Dressing With a Conventional Treatment of a Necrotizing Fasciitis Wound. *Int J Low Extrem Wounds*. 2017;16(2):108-13.
185. Miller MA, Race A, Gupta S, Higham P, Clarke MT, Mann KA. The role of cement viscosity on cement-bone apposition and strength: an in vitro model with medullary bleeding. *The Journal of arthroplasty*. 2007;22(1):109-16.
186. Miller RB, McLaren AC, Pauken C, Clarke HD, McLemore R. Voriconazole Is Delivered From Antifungal-Loaded Bone Cement. *Clinical orthopaedics and related research*. 2013;471(1):195-200.
187. Mohan B, Sharda N, Singh S. Evaluation of the recently reported USP gradient HPLC method for analysis of anti-tuberculosis drugs for its ability to resolve degradation products of rifampicin. *J Pharm Biomed Anal*. 2003;31(3):607-12.
188. Mont MA, Waldman BJ, Hungerford DS. Evaluation of preoperative cultures before second-stage reimplantation of a total knee prosthesis complicated by infection. A comparison-group study. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2000;82-A(11):1552-7.
189. Moreton MA, Hocht C, Taira C, Sosnik A. Rifampicin-loaded 'flower-like' polymeric micelles for enhanced oral bioavailability in an extemporaneous liquid fixed-dose combination with isoniazid. *Nanomedicine (Lond)*. 2014;9(11):1635-50.

190. Morton DB. Humane endpoints in animal experimentation for biomedical research: ethical, legal and practical aspects. *Lab Anim.* 2005;8(1):5-12.
191. Motta I, Calcagno A, Bonora S. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of anti-tubercular drugs: a tool for treatment optimization? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2018;14(1):59-82.
192. Muller-Serieys C, Saleh Mghir A, Massias L, Fantin B. Bactericidal activity of the combination of levofloxacin with rifampin in experimental prosthetic knee infection in rabbits due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):2145-8.
193. Namba RS, Inacio MC, Paxton EW. Risk factors associated with deep surgical site infections after primary total knee arthroplasty: an analysis of 56,216 knees. *The Journal of bone and joint surgery American volume.* 2013;95(9):775-82.
194. Navarro Hernández J, . *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales.* Editorial S, editor. México: SAMSARA; 2012.
195. Nelson CL, Jones RB, Wingert NC, Foltzer M, Bowen TR. Sonication of antibiotic spacers predicts failure during two-stage revision for prosthetic knee and hip infections. *Clinical orthopaedics and related research.* 2014;472(7):2208-14.
196. Neut D, van de Belt H, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. The effect of mixing on gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements. *Acta Orthop Scand.* 2003;74(6):670-6.
197. Nijhof MW, Fler A, Hardus K, Vogely HC, Schouls LM, Verbout AJ, et al. Tobramycin-containing bone cement and systemic cefazolin in a one-stage revision. Treatment of infection in a rabbit model. *J Biomed Mater Res.* 2001;58(6):747-53.
198. Nishitani K, Sutipornpalangkul W, de Mesy Bentley KL, Varrone JJ, Bello-Irizarry SN, Ito H, et al. Quantifying the natural history of biofilm formation in vivo during the establishment of chronic implant-associated *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in mice to identify critical pathogen and host factors. *J Orthop Res.* 2015;33(9):1311-9.
199. O'Reilly T, Kunz S, Sande E, Zak O, Sande MA, Tauber MG. Relationship between antibiotic concentration in bone and efficacy of treatment of staphylococcal osteomyelitis in rats: azithromycin compared with clindamycin and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(12):2693-7.
200. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp.* 2011(47).

201. Odum SM, Fehring TK, Lombardi AV, Zmistowski BM, Brown NM, Luna JT, et al. Irrigation and debridement for periprosthetic infections: does the organism matter? *The Journal of arthroplasty*. 2011;26(6 Suppl):114-8.
202. Ofluoglu EA, Bulent E, Derya AM, Sancar BY, Akin G, Bekir T, et al. Efficiency of antibiotic-loaded polymethylmethacrylate rods for treatment of the implant-related infections in rat spine. *J Spinal Disord Tech*. 2012;25(3):E48-52.
203. Oga M, Arizono T, Sugioka Y. Bacterial adherence to bioinert and bioactive materials studied in vitro. *Acta Orthop Scand*. 1993;64(3):273-6.
204. Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Executive summary: diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;56(1):1-10.
205. Paddleford R. *Manual of Small Animal Anesthesia*. 2 ed. Philadelphia 1999.
206. Padegimas EM, Maltenfort M, Ramsey ML, Williams GR, Parvizi J, Namdari S. Periprosthetic shoulder infection in the United States: incidence and economic burden. *J Shoulder Elbow Surg*. 2015;24(5):741-6.
207. Pandey R, Zahoor A, Sharma S, Khuller GK. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003;83(6):373-8.
208. Park SE, Kim JY, Cho SW, Rhee SK, Kwon SY. Complications and revision rate compared by type of total elbow arthroplasty. *J Shoulder Elbow Surg*. 2013;22(8):1121-7.
209. Park YJ, Lee JY, Yeom HR, Kim KH, Lee SC, Shim IK, et al. Injectable polysaccharide microcapsules for prolonged release of minocycline for the treatment of periodontitis. *Biotechnol Lett*. 2005;27(22):1761-6.
210. Parra-Ruiz FJ, Gonzalez-Gomez A, Fernandez-Gutierrez M, Parra J, Garcia-Garcia J, Azuara G, et al. Development of advanced biantibiotic loaded bone cement spacers for arthroplasty associated infections. *Int J Pharm*. 2017;522(1-2):11-20.
211. Parvizi J. New definition for periprosthetic joint infection. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2011;40(12):614-5.
212. Parvizi J, Gehrke T. International consensus on periprosthetic joint infection: let cumulative wisdom be a guide. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2014;96(6):441.

213. Parvizi J, Pawasarat IM, Azzam KA, Joshi A, Hansen EN, Bozic KJ. Periprosthetic joint infection: the economic impact of methicillin-resistant infections. *The Journal of arthroplasty*. 2010;25(6 Suppl):103-7.
214. Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, Chen AF, et al. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *The Journal of arthroplasty*. 2018;33(5):1309-14 e2.
215. Parvizi J, Zmistowski B, Berbari EF, Bauer TW, Springer BD, Della Valle CJ, et al. New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clinical orthopaedics and related research*. 2011;469(11):2992-4.
216. Patil K, Bagade S, Bonde S, Sharma S, Saraogi G. Recent therapeutic approaches for the management of tuberculosis: Challenges and opportunities. *Biomed Pharmacother*. 2018;99:735-45.
217. Patrick BN, Rivey MP, Allington DR. Acute renal failure associated with vancomycin- and tobramycin-laden cement in total hip arthroplasty. *Ann Pharmacother*. 2006;40(11):2037-42.
218. Paz E, Sanz-Ruiz P, Abenojar J, Vaquero-Martin J, Forriol F, Del Real JC. Evaluation of Elution and Mechanical Properties of High-Dose Antibiotic-Loaded Bone Cement: Comparative "In Vitro" Study of the Influence of Vancomycin and Cefazolin. *The Journal of arthroplasty*. 2015;30(8):1423-9.
219. Pea F. Intracellular Pharmacokinetics of Antibacterials and Their Clinical Implications. *Clin Pharmacokinet*. 2018;57(2):177-89.
220. Peng X. Rabbit models for studying human infectious diseases. *Comparative Medicine*. 2015;65(6):499-507.
221. Penner MJ, Duncan CP, Masri BA. The in vitro elution characteristics of antibiotic-loaded CMW and Palacos-R bone cements. *The Journal of arthroplasty*. 1999;14(2):209-14.
222. Penner MJ, Masri BA, Duncan CP. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. *The Journal of arthroplasty*. 1996;11(8):939-44.
223. Perez-Mananes R, Burro JA, Manaute JR, Rodriguez FC, Martin JV. 3D Surgical Printing Cutting Guides for Open-Wedge High Tibial Osteotomy: Do It Yourself. *J Knee Surg*. 2016;29(8):690-5.

224. Pinheiro A, Neves F, Lemos de Matos A, Abrantes J, van der Loo W, Mage R, et al. An overview of the lagomorph immune system and its genetic diversity. *Immunogenetics*. 2016;68(2):83-107.
225. Poultsides LA, Papatheodorou LK, Karachalios TS, Khaldi L, Maniatis A, Petinaki E, et al. Novel model for studying hematogenous infection in an experimental setting of implant-related infection by a community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* strain. *J Orthop Res*. 2008;26(10):1355-62.
226. Proffen BL, McElfresh M, Fleming BC, Murray MM. A comparative anatomical study of the human knee and six animal species. *Knee*. 2012;19(4):493-9.
227. Pulido L, Ghanem E, Joshi A, Purtill JJ, Parvizi J. Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors. *Clinical orthopaedics and related research*. 2008;466(7):1710-5.
228. Quesenberry KE CJ. *Ferrets, Rabbits and Rodents. Clinical medicine and Surgery*. Third edition ed. St. Louis, Missouri 631462012. 466 p.
229. Rao N, Crossett LS, Sinha RK, Le Frock JL. Long-term suppression of infection in total joint arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research*. 2003(414):55-60.
230. Ray MA, Johnston NA, Verhulst S, Trammell RA, Toth LA. Identification of markers for imminent death in mice used in longevity and aging research. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2010;49(3):282-8.
231. Renz N, Yermak K, Perka C, Trampuz A. Alpha Defensin Lateral Flow Test for Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: Not a Screening but a Confirmatory Test. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2018;100(9):742-50.
232. Rezapoor M, Parvizi J. Prevention of Periprosthetic Joint Infection. *The Journal of arthroplasty*. 2015;30(6):902-7.
233. Rodriguez-Pardo D, Pigrau C, Corona PS, Almirante B. An update on surgical and antimicrobial therapy for acute periprosthetic joint infection: new challenges for the present and the future. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(2):249-65.
234. Rodriguez-Pardo D, Pigrau C, Lora-Tamayo J, Soriano A, del Toro MD, Cobo J, et al. Gram-negative prosthetic joint infection: outcome of a debridement, antibiotics and implant retention approach. A large multicentre study. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(11):O911-9.

235. Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med.* 2007;4(12):e329.
236. Rumian L, Tiainen H, Cibor U, Krok-Borkowicz M, Brzychczy-Wloch M, Haugen HJ, et al. Ceramic scaffolds enriched with gentamicin loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles for prevention and treatment of bone tissue infections. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;69:856-64.
237. Rumian L, Tiainen H, Cibor U, Krok-Borkowicz M, Brzychczy-Wloch M, Haugen HJ, et al. Ceramic scaffolds with immobilized vancomycin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles for bone defects treatment. *Materials Letters.* 2017;190:67-70.
238. Sakar F, Ozer AY, Erdogan S, Ekizoglu M, Kart D, Ozalp M, et al. Nano drug delivery systems and gamma radiation sterilization. *Pharm Dev Technol.* 2017;22(6):775-84.
239. Saleh KJ, El Othmani MM, Tzeng TH, Mihalko WM, Chambers MC, Grupp TM. Acrylic bone cement in total joint arthroplasty: A review. *J Orthop Res.* 2016;34(5):737-44.
240. Saleh-Mghir A, Muller-Serieys C, Dinh A, Massias L, Cremieux AC. Adjunctive rifampin is crucial to optimizing daptomycin efficacy against rabbit prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4589-93.
241. Sanchez CJ, Jr., Shiels SM, Tennent DJ, Hardy SK, Murray CK, Wenke JC. Rifamycin Derivatives Are Effective Against Staphylococcal Biofilms In Vitro and Elutable From PMMA. *Clinical orthopaedics and related research.* 2015;473(9):2874-84.
242. Sangeetha K, Girija EK. Tailor made alginate hydrogel for local infection prophylaxis in orthopedic applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;78:1046-53.
243. Sanitarios. CNdIRFEAEdMyP. Real Farmacopea Española. 5 ed. Madrid2014.
244. Sanz-Ruiz P, Carbo-Laso E, Del Real-Romero JC, Aran-Ais F, Ballesteros-Iglesias Y, Paz-Jimenez E, et al. Microencapsulation of rifampicin: A technique to preserve the mechanical properties of bone cement. *J Orthop Res.* 2017.

245. Sanz-Ruiz P, Paz E, Abenojar J, Carlos del Real J, Vaquero J, Forriol F. Effects of vancomycin, cefazolin and test conditions on the wear behavior of bone cement. *The Journal of arthroplasty*. 2014;29(1):16-22.
246. Sarigol E, Bozdogan Pehlivan S, Ekizoglu M, Sagiroglu M, Calis S. Design and evaluation of gamma-sterilized vancomycin hydrochloride-loaded poly(varepsilon-caprolactone) microspheres for the treatment of biofilm-based medical device-related osteomyelitis. *Pharm Dev Technol*. 2017;22(6):706-14.
247. Sassi G, inventor; Ascor Chimici SRL, assignee. Sustained release microcapsules contg. erythromycin thicyanate-used partic. in feedstuffs for trating or preventing infections in animals, partic. swine dysentery1996.
248. Schindler M, Christofilopoulos P, Wyssa B, Belaieff W, Garzoni C, Bernard L, et al. Poor performance of microbiological sampling in the prediction of recurrent arthroplasty infection. *International orthopaedics*. 2011;35(5):647-54.
249. Sealy C. Biodegradable microparticles combat antibiotic resistance. *Mater Today*. 2018;21(2):103-.
250. Segreti J, Nelson JA, Trenholme GM. Prolonged suppressive antibiotic therapy for infected orthopedic prostheses. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1998;27(4):711-3.
251. Seldes RM, Winiarsky R, Jordan LC, Baldini T, Brause B, Zodda F, et al. Liquid gentamicin in bone cement: a laboratory study of a potentially more cost-effective cement spacer. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2005;87(2):268-72.
252. Senneville E, Joulie D, Legout L, Valette M, Dezeque H, Beltrand E, et al. Outcome and predictors of treatment failure in total hip/knee prosthetic joint infections due to *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;53(4):334-40.
253. Shah SR, Henslee AM, Spicer PP, Yokota S, Petrichenko S, Allahabadi S, et al. Effects of antibiotic physicochemical properties on their release kinetics from biodegradable polymer microparticles. *Pharm Res*. 2014;31(12):3379-89.
254. Shah UH, Patel S, Raval M. Stability Indicating Reverse Phase HPLC method for estimation of Rifampicin and Piperine in Pharmaceutical Dosage Form. *Curr Drug Discov Technol*. 2017.
255. Shahi A, Parvizi J. Prevention of Periprosthetic Joint Infection. *Arch Bone Jt Surg*. 2015;3(2):72-81.

256. Sheehan E, McKenna J, Mulhall KJ, Marks P, McCormack D. Adhesion of *Staphylococcus* to orthopaedic metals, an in vivo study. *J Orthop Res.* 2004;22(1):39-43.
257. Sherrell JC, Fehring TK, Odum S, Hansen E, Zmistowski B, Dennis A, et al. The Chitranjan Ranawat Award: fate of two-stage reimplantation after failed irrigation and debridement for periprosthetic knee infection. *Clinical orthopaedics and related research.* 2011;469(1):18-25.
258. Shi M, Kretlow JD, Nguyen A, Young S, Scott Baggett L, Wong ME, et al. Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate constructs for osseous space maintenance and infection control. *Biomaterials.* 2010;31(14):4146-56.
259. Shiels SM, Bedigrew KM, Wenke JC. Development of a hematogenous implant-related infection in a rat model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015;16:255.
260. Shiels SM, Tennent DJ, Akers KS, Wenke JC. Determining potential of PMMA as a depot for rifampin to treat recalcitrant orthopaedic infections. *Injury.* 2017;48(10):2095-100.
261. Shin SS, Della Valle CJ, Ong BC, Meere PA. A simple method for construction of an articulating antibiotic-loaded cement spacer. *The Journal of arthroplasty.* 2002;17(6):785-7.
262. Siddique A, Kowdley KV. Approach to a patient with elevated serum alkaline phosphatase. *Clin Liver Dis.* 2012;16(2):199-229.
263. Sierra RJ, Trousdale RT, Pagnano MW. Above-the-knee amputation after a total knee replacement: prevalence, etiology, and functional outcome. *The Journal of bone and joint surgery American volume.* 2003;85-A(6):1000-4.
264. Sinclair KD, Pham TX, Williams DL, Farnsworth RW, Loc-Carrillo CM, Bloebaum RD. Model development for determining the efficacy of a combination coating for the prevention of perioperative device related infections: a pilot study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(7):1143-53.
265. Singh JA, Sperling JW, Schleck C, Harmsen WS, Cofield RH. Periprosthetic infections after total shoulder arthroplasty: a 33-year perspective. *J Shoulder Elbow Surg.* 2012;21(11):1534-41.
266. Sjoström T, McNamara LE, Meek RM, Dalby MJ, Su B. 2D and 3D nanopatterning of titanium for enhancing osteoinduction of stem cells at implant surfaces. *Adv Healthc Mater.* 2013;2(9):1285-93.

267. Slane J, Gietman B, Squire M. Antibiotic elution from acrylic bone cement loaded with high doses of tobramycin and vancomycin. *J Orthop Res.* 2017.
268. Soliman GM, Fetih G, Abbas AM. Thermosensitive bioadhesive gels for the vaginal delivery of sildenafil citrate: in vitro characterization and clinical evaluation in women using clomiphene citrate for induction of ovulation. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017;43(3):399-408.
269. Somayaji R, Parkins MD. Tobramycin inhalation powder: an efficient and efficacious therapy for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Ther Deliv.* 2015;6(2):121-37.
270. Somerson JS, Morrey ME, Sanchez-Sotelo J, Morrey BF. Diagnosis and Management of Periprosthetic Elbow Infection. *The Journal of bone and joint surgery American volume.* 2015;97(23):1962-71.
271. Son YJ, McConville JT. Preparation of sustained release rifampicin microparticles for inhalation. *J Pharm Pharmacol.* 2012;64(9):1291-302.
272. Sorli L, Puig L, Torres-Claramunt R, Gonzalez A, Alier A, Knobel H, et al. The relationship between microbiology results in the second of a two-stage exchange procedure using cement spacers and the outcome after revision total joint replacement for infection: the use of sonication to aid bacteriological analysis. *The Journal of bone and joint surgery British volume.* 2012;94(2):249-53.
273. Southwood RT, Rice JL, McDonald PJ, Hakendorf PH, Rozenbils MA. Infection in experimental hip arthroplasties. *The Journal of bone and joint surgery British volume.* 1985;67(2):229-31.
274. Souto-Pardo C. Mezclado de sólidos. In: Síntesis, editor. *Tratado de tecnología farmacéutica. II.* Madrid 2016. p. 43-58.
275. Sritharadol R, Hamada M, Kimura S, Ishii Y, Srichana T, Tateda K. Mupirocin at Subinhibitory Concentrations Induces Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist.* 2018.
276. Srivastava A, Waterhouse D, Ardrey A, Ward SA. Quantification of rifampicin in human plasma and cerebrospinal fluid by a highly sensitive and rapid liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;70:523-8.
277. Stewart S, Barr S, Engiles J, Hickok NJ, Shapiro IM, Richardson DW, et al. Vancomycin-modified implant surface inhibits biofilm formation and supports bone-

- healing in an infected osteotomy model in sheep: a proof-of-concept study. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2012;94(15):1406-15.
278. Stinner DJ, Noel SP, Haggard WO, Watson JT, Wenke JC. Local Antibiotic Delivery Using Tailorable Chitosan Sponges: The Future of Infection Control? *Journal of orthopaedic trauma*. 2010;24(9):592-7.
279. Stocks GW, O'Connor DP, Self SD, Marcek GA, Thompson BL. Directed air flow to reduce airborne particulate and bacterial contamination in the surgical field during total hip arthroplasty. *The Journal of arthroplasty*. 2011;26(5):771-6.
280. Struelens B, Claes S, Bellemans J. Spacer-related problems in two-stage revision knee arthroplasty. *Acta orthopaedica Belgica*. 2013;79(4):422-6.
281. Suckow MA SK, Wilson RP. . The laboratory rabbit, guinea pig, hamster and other rodents. First edition ed. London: Elsevier; 2011. 1288 p.
282. Tabutin J, D'Ollonne T, Cambas PM. Antibiotic addition to cement - is it beneficial. *Hip international : the journal of clinical and experimental research on hip pathology and therapy*. 2012;22(1):9-12.
283. Takahira N, Itoman M, Higashi K, Uchiyama K, Miyabe M, Naruse K. Treatment outcome of two-stage revision total hip arthroplasty for infected hip arthroplasty using antibiotic-impregnated cement spacer. *J Orthop Sci*. 2003;8(1):26-31.
284. Tande AJ, Osmon DR, Greenwood-Quaintance KE, Mabry TM, Hanssen AD, Patel R. Clinical characteristics and outcomes of prosthetic joint infection caused by small colony variant staphylococci. *MBio*. 2014;5(5):e01910-14.
285. Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(2):302-45.
286. Tewes F, Brillault J, Lamy B, O'Connell P, Olivier JC, Couet W, et al. Ciprofloxacin-Loaded Inorganic-Organic Composite Microparticles To Treat Bacterial Lung Infection. *Mol Pharmaceut*. 2016;13(1):100-12.
287. Tokarski AT, Novack TA, Parvizi J. Is tantalum protective against infection in revision total hip arthroplasty? *Bone Joint J*. 2015;97-B(1):45-9.
288. Torrens C, Santana F, Puig L, Sorli L, Alier A. Results of cement spacer sonication in the second stage of two-stage treatment of shoulder arthroplasty infection. *J Orthop Surg Res*. 2018;13(1):58.
289. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 2007;357(7):654-63.

290. Tsai JC, Sheng WH, Lo WY, Jiang CC, Chang SC. Clinical characteristics, microbiology, and outcomes of prosthetic joint infection in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015;48(2):198-204.
291. Tsifansky MD, Yeo Y, Evgenov OV, Bellas E, Benjamin J, Kohane DS. Microparticles for inhalational delivery of antipseudomonal antibiotics. *Aaps Journal.* 2008;10(2):254-60.
292. Tuzuner T, Sencan I, Ozdemir D, Alper M, Duman S, Yavuz T, et al. In vivo evaluation of teicoplanin- and calcium sulfate-loaded PMMA bone cement in preventing implant-related osteomyelitis in rats. *J Chemother.* 2006;18(6):628-33.
293. Ueng SW, Lin SS, Wang IC, Yang CY, Cheng RC, Liu SJ, et al. Efficacy of vancomycin-releasing biodegradable poly(lactide-co-glycolide) antibiotics beads for treatment of experimental bone infection due to *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Surg Res.* 2016;11(1):52.
294. Ueng SW, Yuan LJ, Lee N, Lin SS, Chan EC, Weng JH. In vivo study of biodegradable alginate antibiotic beads in rabbits. *J Orthop Res.* 2004;22(3):592-9.
295. Ueng SW, Yuan LJ, Lee N, Lin SS, Liu SJ, Chan EC, et al. In vivo study of hot compressing molded 50:50 poly (DL-lactide-co-glycolide) antibiotic beads in rabbits. *J Orthop Res.* 2002;20(4):654-61.
296. Ueng SWN, Lee MS, Lin SS, Chan EC, Liu SJ. Development of a biodegradable alginate carrier system for antibiotics and bone cells. *Journal of Orthopaedic Research.* 2007;25(1):62-72.
297. van de Belt H, Neut D, Uges DR, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, et al. Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release. *Biomaterials.* 2000;21(19):1981-7.
298. van Raaij TM, Visser LE, Vulto AG, Verhaar JA. Acute renal failure after local gentamicin treatment in an infected total knee arthroplasty. *The Journal of arthroplasty.* 2002;17(7):948-50.
299. Van Thiel GS, Berend KR, Klein GR, Gordon AC, Lombardi AV, Della Valle CJ. Intraoperative molds to create an articulating spacer for the infected knee arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research.* 2011;469(4):994-1001.
300. Venkatesan J, Bhatnagar I, Manivasagan P, Kang KH, Kim SK. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *Int J Biol Macromol.* 2015;72:269-81.


301. Vilos C, Constandil L, Herrera N, Solar P, Escobar-Fica J, Velasquez LA. Ceftiofur-loaded PHBV microparticles: A potential formulation for a long-acting antibiotic to treat animal infections. *Electron J Biotechn.* 2012;15(4).
302. Voloshin I, Schippert DW, Kakar S, Kaye EK, Morrey BF. Complications of total elbow replacement: a systematic review. *J Shoulder Elbow Surg.* 2011;20(1):158-68.
303. Wahlig H. [Kinetics of the liberation of antibiotics from bone cements--results of comparative studies in vitro and in vivo]. *Aktuelle Probl Chir Orthop.* 1987;31:221-6.
304. Wahlig H, Dingeldein E, Bergmann R, Reuss K. The release of gentamicin from polymethylmethacrylate beads. An experimental and pharmacokinetic study. *The Journal of bone and joint surgery British volume.* 1978;60-B(2):270-5.
305. Wang G, Liu SJ, Ueng SW, Chan EC. The release of cefazolin and gentamicin from biodegradable PLA/PGA beads. *Int J Pharm.* 2004;273(1-2):203-12.
306. Wang H, Wu G, Zhang J, Zhou K, Yin B, Su X, et al. Osteogenic effect of controlled released rhBMP-2 in 3D printed porous hydroxyapatite scaffold. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016;141:491-8.
307. Wang QY, Mi GJ, Hickey D, Li YA, Tu JS, Webster TJ, et al. Azithromycin-loaded respirable microparticles for targeted pulmonary delivery for the treatment of pneumonia. *Biomaterials.* 2018;160:107-23.
308. Wasielewski RC, Barden RM, Rosenberg AG. Results of different surgical procedures on total knee arthroplasty infections. *The Journal of arthroplasty.* 1996;11(8):931-8.
309. Weaver LA, Blaze CA, Linder DE, Andrutis KA, Karas AZ. A model for clinical evaluation of perioperative analgesia in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010;49(6):845-51.
310. Webb JC, Spencer RF. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *The Journal of bone and joint surgery British volume.* 2007;89(7):851-7.
311. Wehrli W. Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Rev Infect Dis.* 1983;5 Suppl 3:S407-11.
312. Westrich GH, Walcott-Sapp S, Bornstein LJ, Bostrom MP, Windsor RE, Brause BD. Modern treatment of infected total knee arthroplasty with a 2-stage reimplantation protocol. *The Journal of arthroplasty.* 2010;25(7):1015-21, 21 e1-2.

313. Wolf CF, Gu NY, Doctor JN, Manner PA, Leopold SS. Comparison of one and two-stage revision of total hip arthroplasty complicated by infection: a Markov expected-utility decision analysis. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2011;93(7):631-9.
314. Wu CH, Gray CF, Lee GC. Arthrodesis should be strongly considered after failed two-stage reimplantation TKA. *Clinical orthopaedics and related research*. 2014;472(11):3295-304.
315. Xia W, Grandfield K, Hoess A, Ballo A, Cai Y, Engqvist H. Mesoporous titanium dioxide coating for metallic implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(1):82-93.
316. Yamamoto K, Miyagawa N, Masaoka T, Katori Y, Shishido T, Imakiire A. Clinical effectiveness of antibiotic-impregnated cement spacers for the treatment of infected implants of the hip joint. *J Orthop Sci*. 2003;8(6):823-8.
317. Yao QQ, Noeaid P, Roether JA, Dong YN, Zhang QQ, Boccaccini AR. Bioglass (R)-based scaffolds incorporating polycaprolactone and chitosan coatings for controlled vancomycin delivery. *Ceram Int*. 2013;39(7):7517-22.
318. Yenice I, Calis S, Atilla B, Kas HS, Ozalp M, Ekizoglu M, et al. In vitro/in vivo evaluation of the efficiency of teicoplanin-loaded biodegradable microparticles formulated for implantation to infected bone defects. *J Microencapsul*. 2003;20(6):705-17.
319. Yin LY, Lazzarini L, Li F, Stevens CM, Calhoun JH. Comparative evaluation of tigecycline and vancomycin, with and without rifampicin, in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis in a rabbit model. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(6):995-1002.
320. Yoon JR, Yang SH, Shin YS. Diagnostic accuracy of interleukin-6 and procalcitonin in patients with periprosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *International orthopaedics*. 2018.
321. Zahar A, Kocsis G, Citak M, Puskas G, Domahidy M, Hajdu M, et al. Use of antibiotic-impregnated bone grafts in a rabbit osteomyelitis model. *Technol Health Care*. 2017;25(5):929-38.
322. Zavasky DM, Sande MA. Reconsideration of rifampin: a unique drug for a unique infection. *JAMA*. 1998;279(19):1575-7.
323. Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release*. 2016;224:86-102.

324. Zhang W, Lian Q, Li D, Wang K, Hao D, Bian W, et al. Cartilage repair and subchondral bone migration using 3D printing osteochondral composites: a one-year-period study in rabbit trochlea. *Biomed Res Int.* 2014;2014:746138.
325. Zimmerli W, Moser C. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;65(2):158-68.
326. Zimmerli W, Sendi P. Pathogenesis of implant-associated infection: the role of the host. *Semin Immunopathol.* 2011;33(3):295-306.
327. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 2004;351(16):1645-54.
328. Zmistowski B, Karam JA, Durinka JB, Casper DS, Parvizi J. Periprosthetic joint infection increases the risk of one-year mortality. *The Journal of bone and joint surgery American volume.* 2013;95(24):2177-84.

9. ANEXO


Figura 14: Aprobación del protocolo experimental por la Comunidad Autónoma de Madrid.



CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE,
ADMINISTRACIÓN LOCAL
Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO

Comunidad de Madrid

REGISTRO DE SALIDA
Ref: 10/143903.9/17 Fecha: 12/05/2017 14:14



Cons. Medio Amb., Admón. Local y O. T.
Reg. C. Medio Amb. Adn. Local y Ord. T. (ALC)
Destino: Francisco Javier Vaquero Martín

Vista la solicitud presentada por FRANCISCO JAVIER VAQUERO MARTÍN, para la autorización del proyecto de memoria técnica titulada ESTUDIO IN VIVO DE LA EFICACIA DEL CEMENTO ÓSEO CON RIFAMPICINA CONTENIDA EN MICROCÁPSULAS DE ALGINATO EN EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN PROTÉSICA: a desarrollar en el centro usuario CAI ANIMALARIO UCM con código de registro ES280790000086 y siendo el responsable del proyecto FRANCISCO JAVIER VAQUERO MARTÍN.

Visto el informe del Área de Protección Animal.


Considerando que el citado proyecto se ajusta a lo establecido en el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: autorizar la realización del proyecto referenciado siempre que se mantengan las condiciones que dieron lugar a la autorización y que el personal que intervenga tenga la preparación y formación adecuada que se especifica en el citado Real Decreto.

Tal y como se establece en el informe de evaluación aportado, este proyecto no deberá ser sometido a la realización de una evaluación retrospectiva.

Contra esta Resolución, que no agota la vía administrativa, cabe interponer recurso de alzada en el plazo de un mes, contado desde el día siguiente a la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, conforme a lo establecido en el artículo 121 y siguientes de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas.

Madrid, 04 de mayo de 2017.
EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA
P.D.F. Resolución 2 de noviembre de 2015
EL SUBDIRECTOR GENERAL DE RECURSOS AGRARIOS



Fdo.: Jesús Carpintero Hervás

Ref PROEX 059/17

Figura 15: Aprobación del protocolo experimental por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
CENTRO DE ASISTENCIA A LA INVESTIGACIÓN
"ANIMALARIO UCM"

El Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid (CEEA-UCM) del Centro de Asistencia a la Investigación Animalario de la UCM (CAI Animalario-UCM)

INFORMA:

Que se ha revisado desde el punto de vista técnico el Proyecto de Investigación con el título: "ESTUDIO IN VIVO DE LA EFICACIA DEL CEMENTO ÓSEO CON RIFAMPICINA CONTENIDA EN MICROCÁPSULAS DE ALGINATO EN EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN PROTÉSICA"

Que el investigador principal y responsable de diseñar y supervisar los procedimientos **D. FRANCISCO JAVIER VAQUERO MARTÍN**, acreditado con las categorías **C y B** por la Comunidad de Madrid, utilizará como modelos experimentales "CONEJO"

Que ha aprobado la estabulación de los animales y la realización de los procedimientos detallados en el proyecto, en las instalaciones del CAI Animalario de la UCM con número de registro en la Dirección General de Agricultura y Alimentación, Consejería de Economía y Empleo de la Comunidad Autónoma de Madrid, **ES280790000086**

Este informe favorable se ha realizado en cumplimiento de los artículos 33.1 y 38.1 del Real Decreto 53/2013 de 1 de Febrero (BOE 8 Febrero 2013) sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos incluyendo la docencia.

Lo que se informa en Madrid, a 10 de marzo de 2017

El Vicerrector de Política Científica,
Investigación y Doctorado

Ignacio Lizasoain Hernández



La Secretaria del CEEA-UCM

M. Pilar Bringas de la Lastra

Tiempo	Peso (kg)*	Consumo agua (cm)**	Consumo comida (cm)**	Aspecto heces	Respiración	Postura	Mueve pata intervenida	Actividad	Acicalado
PreQx									
24h									
48h									
72h									
96h									
Primer T									
24h									
48h									
72h									
96h									
1semana									
1S + 3días									
2S									
2S + 3 días									
3S									
3S + 3 días									
4S									

Tabla 12: Hoja de recogida de datos para la evaluación de la severidad del dolor. La doble línea indica la realización de un procedimiento quirúrgico. Las mediciones se realizaron a las 20:00h. PreQx: valores preoperatorios, S: semana, Primer T: primer tiempo de recambio protésico.

* La determinación del peso solo se realizó a la llegada del animal, tras 1 semana de la infección, 4 días después del primer tiempo y, después, semanalmente hasta el fin del estudio.

** Consumo de agua y comida (cm): La reposición de agua y comida se realizó a las 9:00h. Mediremos los cm de agua/comida restantes en el reservorio a las 20:00h respecto al total de la altura del mismo.



Figura 13: Procedimiento seguido para la toma de muestras sanguíneas de la vena marginal de la oreja del conejo NZW inmovilizado en un cepo.



Figura 24: Mezcla de fracción polvo del Palacos® R+G con microcápsulas de rifampicina.

	Basal	Primer tiempo	4 días	1S	2S	3S	FIN
C1	3,59	3,43	3,42	3,5	3,62	3,7	3,7
C2	3,38	3,03	2,96	3	3,12	3,2	3,3
C3	3,54	3,08	3,09	3,08	3,2	3,4	3,25
C4	3,37	3,3	-	-	-	-	-
C5	3,2	3,3	3,12	3,12	3,11	3,24	3,33
C6	3,4	3,5	3,53	3,46	3,46	3,58	3,63
C7	3,48	3,3	2,95	2,92	3	3	2,9
R1	3,29	3,61	3,09	3,02	3,06	3	3,1
R2	3,5	3,45	3,31	3,29	3,33	3,45	3,56
R3	3,5	3,28	3,19	3,03	3,03	3	3,1
R4	3,61	3,5	3,36	3,34	3,3	3,4	3,6
R5	3,3	3,35	3,22	3,16	3,11	3,06	3,11
R6	3,7	4	3,52	3,44	3,26	3,48	3,74
R7	3,4	3,5	3,33	3,34	3,42	3,59	3,75
R8	3,6	4	3,91	3,89	3,92	3,99	4,01
p	0,3	0,02	0,18	0,3	0,7	0,9	0,4
Tabla 27: Peso (kg) registrado en cada uno de los animales a lo largo del estudio							

	Basal	Primer tiempo	4 días	1S	2S	3S	FIN
C1	38,9	39,9	39,4	39,6	39,3	39,1	38,3
C2	40,2	39,6	39	38,5	38,6	39	39,3
C3	38,5	39,4	38,8	38,2	39,1	38,5	39,9
C4	39,5	39,2	-	-	-	-	-
C5	38,9	39	38,6	38,1	39	38,2	39,1
C6	39	39,1	38,9	39,3	39,6	39,6	38,9
C7	39,6	38,9	39	37,3	38,3	39,3	38,3
R1	39,4	40	39,4	39,4	37,9	38,5	39,4
R2	39,2	39,2	38,9	38,3	38,5	38,8	38
R3	37,1	38,7	38,7	37,9	37,9	37,6	38
R4	39,3	39,8	38,6	38,3	38,1	38,9	39,5
R5	38,9	39,9	38,2	38,6	38,4	38,3	38,8
R6	38,9	39,6	39,4	39,4	39,5	38,6	39,6
R7	39,3	39,3	38,3	38,9	38,8	38,8	38,4
R8	39,4	38,9	38,1	38,5	38,1	37,5	38,5
p	0,4	0,5	0,2	0,6	0,057	0,06	0,5

Tabla 28: Temperatura (°C) registrada en cada uno de los animales a lo largo del estudio

Animal	CFU meseta	CFU hueso	CFU partes blandas
C1	$1,09 \cdot 10^4$	$1,06 \cdot 10^5$	$1,62 \cdot 10^5$
C2	$2,09 \cdot 10^4$	0	$4,76 \cdot 10^5$
C3	$1,07 \cdot 10^3$	$2,00 \cdot 10^5$	$2,60 \cdot 10^5$
C4	0	0	0
C5	0	$2,50 \cdot 10^7$	$3,80 \cdot 10^4$
C6	$2,10 \cdot 10^5$	$4,80 \cdot 10^6$	$7,80 \cdot 10^4$
C7	$2,78 \cdot 10^6$	$1,04 \cdot 10^8$	$2,08 \cdot 10^8$
R1	$2,69 \cdot 10^4$	$7,99 \cdot 10^6$	$1,08 \cdot 10^6$
R2	$5,90 \cdot 10^4$	$1,30 \cdot 10^7$	$1,40 \cdot 10^7$
R3	$4,35 \cdot 10^4$	$5,06 \cdot 10^6$	$6,06 \cdot 10^4$
R4	$6,80 \cdot 10^5$	$1,57 \cdot 10^6$	$3,54 \cdot 10^4$
R5	$5,20 \cdot 10^6$	$4,20 \cdot 10^5$	0
R6	$4,00 \cdot 10^4$	$2,50 \cdot 10^6$	$4,30 \cdot 10^4$
R7	$1,40 \cdot 10^3$	0	0
R8	$1,70 \cdot 10^6$	$1,30 \cdot 10^7$	$5,80 \cdot 10^6$
X (SD)	$7,2 \cdot 10^5$ ($1,4 \cdot 10^6$)	$1,02 \cdot 10^7$ ($2,63 \cdot 10^7$)	$1,7 \cdot 10^7$ ($5,3 \cdot 10^7$)

Tabla 32: Resultados microbiológicos (número de CFU) de cada uno de los animales una semana después de la inoculación de *S. aureus*.

Animal	Valores basales				Valores 1 semana tras la inoculación			
	Leucocitos (10 ³ /mm ³)	Linfocitos (%)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	VSG (mm)	Leucocitos (10 ³ /mm ³)	Linfocitos (%)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	VSG (mm)
C1	6,5	66,1	191		7,8	34,6	361	
C2	7,7	71,9	269		10	44,9	447	
C3	6,1	51,9	212		9	27,5	620	
C4	8,7	73,9	235	--	--	--	--	--
C5	6,8	66,1	259	2	7,6	37,3	351	3
C6	6	61,7	266	3	9,2	28,8	536	2
C7	9,2	63,5	439		12,6	27,6	1281	
R1	6,1	61,2	191		11	25,2	588	
R2	6,6	64,8	292	2	11,2	21,2	488	3
R3	7,7	69,6	299		7,1	28,9	463	
R4	7,3	72,3	295		9,1	28,2	360	
R5	7,4	66,6	267	5	7,5	40,4	314	2
R6	6	59,4	424	3	7,6	28,4	979	2
R7	7,1	75,2	278	5	7,5	41	399	2
R8	6,1	71,6	309	2	5,9	36	520	2

Tabla 37: Parámetros hematológicos basales y a la semana de la inoculación de *S. aureus* de cada uno de los animales.

Animal	Valores 4 días tras el primer tiempo				Valores 1 semana tras el primer tiempo			
	Leucocitos (10 ³ /mm ³)	Linfocitos (%)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	VSG (mm)	Leucocitos (10 ³ /mm ³)	Linfocitos (%)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	VSG (mm)
C1	8,2	45,6	331		14,1	25,5	507	8,2
C2	9,4	45,1	930		10	39,7	609	9,4
C3	10,1	21,7	873		10,2	19,9	761	10,1
C4	--	--	--	--	--	--	--	--
C5	8,8	43,3	759	2	7,7	41	674	8,8
C6	9,3	42	727	2	8,2	51,6	871	9,3
C7	18,5	22,1	783		14,8	27,9	1104	18,5
R1	14,2	24,4	738		15,5	13,3	799	14,2
R2	10	26,8	824	2	10,1	33,5	929	10
R3	10,5	32,2	964		7,4	35,8	676	10,5
R4	11,4	30,8	847		12,6	29,9	804	11,4
R5	9,5	46,6	771	3	8,7	52,9	875	9,5
R6	11,6	30,7	1167	4	10,9	31	1092	11,6
R7	13,1	40,6	392	2	13	42,6	515	13,1
R8	7,4	46,7	780	3	7,3	45,1	873	7,4

Tabla 38: Parámetros hematológicos de cada uno de los animales a los 4 días y 1 semana de la implantación del espaciador de cemento.

Animal	Valores 2 semanas tras primer tiempo				Valores 3 semanas tras primer tiempo			
	Leucocitos (10 ³ /mm ³)	Linfocitos (%)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	VSG (mm)	Leucocitos (10 ³ /mm ³)	Linfocitos (%)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	VSG (mm)
C1	11,1	41	497		9,3	43,3	376	
C2	8,5	54,6	584		8,7	55,9	445	
C3	7,3	34,3	607		6	29,1	417	
C4	--	--	--	--	--	--	--	--
C5	8,3	46	655	2	9,8	43	457	3
C6	9,2	45,8	592	1	13,1	22	502	1
C7	16,7	34,3	773		13	32,5	894	
R1	11,3	30,4	630		11,2	34,4	716	
R2	8,7	37,2	722	1	21,06	50	518	1
R3	7,7	49,6	653		7,6	48,3	587	
R4	10,1	39,4	476		8,6	49,1	410	
R5	8	52,5	623	2	9,7	34	380	2
R6	10,8	37,9	749	2	13,2	40	858	3
R7	10,2	50,8	533	3	25	40	425	2
R8	6,7	50,8	687	2	14,8	39	548	2

Tabla 39: Parámetros hematológicos de cada uno de los animales a las 2 y 3 semanas de la colocación del espaciador de cemento.

Valores 4 semanas tras primer tiempo				
Animal	Leucocitos (10³/mm³)	Linfocitos (%)	Plaquetas (10³/mm³)	VSG (mm)
C1	7,8	34,6	361	
C2	10	44,9	447	
C3	9	27,5	620	
C4	--	--	--	--
C5	7,6	37,3	351	3
C6	9,2	28,8	536	2
C7	12,6	27,6	1281	
R1	11	25,2	588	
R2	11,2	21,2	488	3
R3	7,1	28,9	463	
R4	9,1	28,2	360	
R5	7,5	40,4	314	2
R6	7,6	28,4	979	2
R7	7,5	41	399	2
R8	5,9	36	520	2

Tabla 40: Parámetros hematológicos definitorios de infección en cada uno de los animales al final del estudio.

Animal	CFU espaciador	CFU hueso	CFU partes blandas
C1	-	0	$2,89 \cdot 10^2$
C2	$8,71 \cdot 10^3$	$5,6 \cdot 10^2$	$5,71 \cdot 10^6$
C3	-	$3,11 \cdot 10^3$	$2,24 \cdot 10^3$
C4	-	-	-
C5	0	0	0
C6	0	0	0
C7	0	79,7	$1,66 \cdot 10^3$
R1	-	0	0
R2	$2 \cdot 10^3$	0	0
R3	0	0	0
R4	$5,53 \cdot 10^2$	0	0
R5	0	0	0
R6	0	0	0
R7	0	0	0
R8	0	0	0
X (SD)	272 (607)	247,8 (827,2)	$1,05 \cdot 10^4$ ($3,6 \cdot 10^4$)

Tabla 45: Resultados microbiológicos (número de CFU) de cada uno de los animales al final del estudio.

Animal	Valores basales				1 semana tras el primer tiempo			
	Creatinina (mg/dL)	Bilirrubina total (mg/dL)	AST (UI)	ALT (UI)	Creatinina (mg/dL)	Bilirrubina total (mg/dL)	AST (UI)	ALT (UI)
C1	0,78	0,06	62	40	0,68	0,17	13	39
C2	0,87	0,18	18	39	0,72	0,19	12	46
C3	0,75	--	--	--	0,69	0,19	17	43
C4	0,87	--	--	--	--	--	--	--
C5	0,95	0,11	14	76	1,3	0,6	27	48
C6	0,9	0,10	13	37	0,9	0,8	5	30
C7	0,78	0,11	16	39	0,66	0,19	13	44
R1	0,9	0,17	20	50	0,94	0,18	29	60
R2	0,69	0,11	9	42	0,9	0,6	10	27
R3	0,89	--	--	--	0,73	0,19	14	23
R4	0,85	0,14	18	61	0,64	0,19	10	42
R5	0,96	0,09	16	46	1	0,6	26	44
R6	0,89	0,11	10	30	1	0,9	7	20
R7	0,84	0,12	13	58	1,1	0,9	23	42
R8	0,75	0,04	16	76	1	0,6	9	49

Tabla 51: Evolución de la creatinina (mg/dL), bilirrubina total (mg/dL), AST (UI/L) y ALT (UI/L) en cada uno de los animales en el día 0 y 1 semana después del primer tiempo de recambio protésico

Animal	2 semanas tras el primer tiempo				4 semanas tras el primer tiempo			
	Creatinina (mg/dL)	Bilirrubina total (mg/dL)	AST (UI)	ALT (UI)	Creatinina (mg/dL)	Bilirrubina total (mg/dL)	AST (UI)	ALT (UI)
C1	0,82	0,1	11	26	0,8	0,11	7	27
C2	0,73	0,08	8	31	0,79	0,1	17	37
C3	0,72	0,08	14	28	0,8	0,11	9	28
C4	--	--	--	--	--	--	--	--
C5	1,1	0,8	21	51	1,3	0,8	20	81
C6	1,2	0,9	7	27	1,2	0,8	12	46
C7	0,61	0,09	7	21	0,58	0,11	11	21
R1	0,78	0,04	13	24	1,01	0,12	14	51
R2	1	0,8	5	30	1,1	0,8	14	33
R3	0,79	0,08	7	10	0,78	0,1	12	16
R4	0,7	0,03	6	22	0,72	0,1	12	30
R5	1,5	0,8	15	34	1,4	0,6	34	59
R6	1,1	0,8	13	13	1,2	0,8	24	46
R7	1,1	0,9	16	53	1,1	0,6	17	56
R8	1,1	0,8	11	47	0,8	0,8	12	57

Tabla 52: Evolución de la creatinina (mg/dL), bilirrubina total (mg/dL), AST (UI/L) y ALT (UI/L) en cada uno de los animales a las 2 y 4 semanas del primer tiempo de recambio.

