

INVESTIGACIÓN

# Modelos de osteomielitis experimental basados en la utilización de implantes precolonizados y/o suspensiones bacterianas

## Models of experimental osteomyelitis using pre-colonized implants

MONZÓN, M.\*; LACLÉRIGA, A.\*\*; GARCÍA-ÁLVAREZ, F.\*\*\*, y AMORENA, B.\*

\*Unidad Mixta de Investigación. \*\*Servicio de Investigación Agroalimentaria (DGA-CSIC), Zaragoza. FREMAP, Zaragoza.  
\*\*\*Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza. Premio SECOT Menarini, 2000.

**RESUMEN: Objetivo:** El objetivo de este trabajo es valorar distintos modelos de osteomielitis crónica utilizando una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de slime (SP) para establecer cuál de ellos resulta más efectivo en el establecimiento de la infección, así como determinar el papel que desempeña el biofilm y la suspensión bacteriana en el éxito de la infección.

**Diseño experimental:** Un total de 32 animales fue utilizado para un estudio comparativo de modelos de osteomielitis crónica en rata basada en una cepa SP de *S. aureus*, tanto para formar biofilms de 12 h sobre los implantes de acero inoxidable, que se colocaban precolonizados en los animales el día de la intervención, como para preparar las suspensiones bacterianas que se inoculaban.

**Resultados:** Ninguno de los modelos presentó septicemia transcurridos 63 días a partir de la intervención quirúrgica. Sólo con el modelo que utiliza exclusivamente un implante colonizado se alcanzó un 100% de infección en hueso e implante; en el modelo que incorporaba además la inoculación de suspensión bacteriana, también se consiguió un 100% de éxito en la infección de los implantes, pero solamente se infectaron 5 de las 8 tibias intervenidas en este grupo. Cuando se inoculó una suspensión de  $10^6$  ufc sólo se consiguieron infectar (implante y tibia) 6 de los 8 animales, y cuando se redujo a  $10^5$  ufc, tan sólo 2 implantes y 1 tibia.

**Conclusiones:** El modelo que implica la utilización exclusiva de un implante precolonizado con *S. aureus* SP ha demostrado la mayor eficacia para reproducir la infección.

**PALABRAS CLAVE:** *Staphylococcus aureus*. Osteomielitis experimental. Biofilm. Suspensión bacteriana.

**ABSTRACT: Objective:** The aim of this study was to evaluate various models of chronic osteomyelitis using a slime-producing (SP) *Staphylococcus aureus* strain in order to determine the most efficient model for establishing infection. The contribution of each infection component (biofilm and bacterial suspension) to the success of experimental infection also was evaluated.

**Experimental design:** A comparative study was made of four chronic osteomyelitis models in a total of 32 rats. A highly adherent SP *S. aureus* strain was used either to produce 12-h biofilms on stainless-steel implants (which were implanted in animals after precolonization) or to prepare bacterial suspensions that were inoculated at the time of surgery.

**Results:** None of the animals presented septicemia 63 days after surgery. A 100% infection rate of the bone and implant was achieved with the model using only colonized implants without bacterial suspension, as well as in the model to which bacterial suspension was added. In the latter model, all implants became infected, but only 5 of the 8 tibias intervened in this group became infected. However, in the two models in which a sterile implant was implanted, the infection rate was lower. Six of the 8 animals achieved implant and tibia infection when the inoculated suspension contained  $10^6$  cfu. Only 2 implants and 1 tibia became infected in the model involving a suspension of  $10^5$  cfu.

**Conclusion:** The model of an implant colonized only with SP *S. aureus* was the most effective in producing infection.

**KEY WORDS:** *Staphylococcus aureus*. Experimental osteomyelitis. Biofilm. Bacterial suspension.

Correspondencia:

M. MONZÓN  
Plaza Aragón, 2, 9.º B.  
Zaragoza.  
Teléfono - Fax: 976 224204

Recibido: Julio de 2001.

Aceptado: Octubre de 2001.

### Introducción

Tanto en Traumatología como en Cirugía ortopédica y cardiovascular, la infección cobra una gran importancia por su frecuencia de aparición y la gra-

vedad de sus consecuencias.<sup>7,19,34</sup> Una infección del biomaterial implantado conlleva un aumento de la morbilidad, coste económico y mortalidad e impide la osteosíntesis.<sup>7,17</sup> Las tasas de infección en este campo no han disminuido significativamente en las últimas décadas, a pesar del uso de diferentes pautas de profilaxis antibióticas, y de las variaciones en la técnica quirúrgica, en los quirófanos y en las formas de fijación de los implantes.<sup>19,34</sup>

Los microorganismos más frecuentes en cirugía son *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.<sup>19</sup> La capacidad que poseen ambas especies para producir «slime», componente que constituye la matriz de los «biofilms» bacterianos que se adhieren a la superficie de los implantes y protege a las bacterias de la acción de los antibióticos y de los macrófagos, pueden generar una infección difícil de erradicar de la zona infectada y tejidos adyacentes.<sup>10,15,18,23</sup>

Durante años se ha buscado un modelo experimental que simule la osteomielitis humana que se ha reproducido con éxito en conejos<sup>2,21-24,30</sup> y en ratas.<sup>32</sup> mediante inoculación sistémica de suspensiones bacterianas o de la bacteria en el implante. Además, se considera de interés el desarrollo de un modelo experimental con cepas formadoras de biofilm que reproduzca los problemas derivados de la colonización del implante y el difícil acceso de los antibióticos. La producción de slime, además de aumentar la adherencia bacteriana al implante,<sup>15,20</sup> puede hacer poco fiable el cálculo de la concentración mínima inhibitoria realizada en tests *in vitro* con bacterias en suspensión<sup>27</sup> del antibiótico para el tratamiento de la infección.<sup>19</sup> Los modelos de biofilms realizados exclusivamente *in vitro* pueden proporcionar una información incompleta, no siempre extrapolable a la situación *in vivo*, teniendo en cuenta que en esta situación los cambios producidos en la zona infectada, tanto para la bacteria como para el huésped, pueden afectar al tamaño y la densidad bacteriana y matricial de los biofilms, conducir a una restricción nutricional en el lugar de la infección<sup>6</sup> o alterar la actividad inmunológica frente a las bacterias.<sup>16,31</sup> Desafortunadamente, los anticuerpos que pueden formarse frente a las bacterias SP no son capaces de eliminar las bacterias adheridas<sup>8</sup> y son numerosos los factores propios del paciente que influyen en el desarrollo de la infección quirúrgica, déficits inmunológicos, diabetes, desnutrición, obesidad, infecciones concomitantes, etc.<sup>19,28</sup> Finalmente, cobran asimismo gran importancia las características del microorganismo infectante.

Por todo ello, consideramos necesario desarrollar un modelo experimental *in vivo* de osteomielitis asociada a implante metálico producida por *S. aureus*

SP, como modelo más cercano a la realidad clínica. El objetivo de este trabajo es evaluar distintos modelos animales para reproducir osteomielitis crónica, y determinar cuál de ellos muestra una mayor fiabilidad en conseguir dicha infección usando una cepa de *S. aureus* productora de slime.

## Material y Método

Como microorganismos para producir la infección bacteriana se utilizó la variante SP, cepa 9213, de *S. aureus* con gran capacidad adherente, obtenida a partir de la cepa original NSP, de morfología lisa y brillante en agar rojo Congo (ARC), mediante el procedimiento descrito previamente.<sup>4</sup> La cepa adherente fue seleccionada a partir de un crecimiento en caldo de tripticasa soja (TSB, Difco, Detroit), suplementada con el 2% de glucosa y con 4 mg/ml de microbolitas de gelatina de 150-210 mm de diámetro (Microcarrier Beads, Sigma, St. Louis) que sirvieron de superficie favorecedora de la adherencia. Tras sucesivos pases en este medio (renovando el medio cada 12 h) y conservando las bolitas con las bacterias adheridas, se observó que dichas bacterias formaban colonias con una morfología rugosa en ARC, correspondiente a las variantes SP. Para verificar que la cepa recuperada de los implantes y tibias en el modelo animal al final del experimento, era la misma que se introdujo en el animal en el día de la intervención, se llevó a cabo su identificación genética mediante ribotipia y PFGE.

*Preparación de la suspensión bacteriana, desarrollo de biofilms sobre los implantes y cuantificación bacteriana en ellos.* Para la inoculación de las suspensiones bacterianas en el momento de la infección, las bacterias se obtuvieron tras un crecimiento de 24 h en TSB, y fueron resuspendidas en PBS a  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  ufc/ml, según el modelo animal utilizado. Cada rata recibió 0,1 ml de suspensión; es decir, aproximadamente  $10^4$ ,  $10^5$  o  $10^6$  ufc, respectivamente.

El material implantado en el animal consistió en agujas de acero de 18G (Abbocot®) seccionadas en piezas de 1,5 cm. Todas las piezas a implantar estériles en autoclave y se conservaron en tubos precintados, a 4 °C, hasta el momento de la operación en condiciones estériles. Los implantes sobre los que se desarrollaron biofilms, una vez esterilizados en autoclave, se introdujeron en tubos que contenían 2 ml de un cultivo bacteriano estacionario (de 24 h), incubándose a 37 °C durante 12 h. Los implantes quedaron así colonizados por un biofilm bacteriano y se recuperaron con pinzas en condiciones de esterilidad; tras 3 lavados con PBS para descartar las bacterias que

quedaban libres, también se almacenaron a 4 °C hasta el momento de la intervención quirúrgica. Previamente a la implantación, se estimó el número de bacterias que formaban el biofilm en piezas control. Para el recuento en la serie control, los implantes ya lavados, se resuspendieron en 2 ml de PBS. Tras 30 min de sonicación a 40 Hz y 22-24 °C, para desintegrar los agregados formados en el biofilm y desprender las bacterias adheridas de las cánulas, se realizó el recuento en placas de TSA y por el método de ATP-bioluminiscencia.<sup>1</sup> Ambos métodos condujeron a resultados similares. Cada implante contenía una media de  $6,15 \pm 0,12 \log_{10}$  ufc en el momento de la intervención.

**Animales.** Se utilizaron 32 ratas macho, raza Wistar, con una media de peso de 375 g, en 4 grupos distintos (tabla 1):

— Grupo con implante colonizado. Recibió solamente el implante colonizado con un biofilm bacteriano de 12 h en el momento de la operación.

— Grupo con implante colonizado y una suspensión bacteriana de  $10^4$  ufc.

— Grupo con implante estéril y una suspensión bacteriana de  $10^5$  ufc.

— Grupo con implante estéril y una suspensión bacteriana de  $10^6$  ufc.

Los implantes, colonizados o estériles, se implantaron en la tibia y, en los modelos correspondientes, también se inoculó una suspensión bacteriana, cuya concentración variaba según el grupo. Se permitió el desarrollo de una infección crónica (63 días). Los animales fueron examinados individual y diariamente a lo largo del período experimental (fiebre y signos de inflamación o dolor).

Antes de sacrificar los animales se anestesiaron con una inyección intramuscular de 50% Ketamina (Ketolar<sup>®</sup>), 40% diazepam (Valium<sup>®</sup>) y 10% atropina<sup>5</sup> extrayendo la sangre por punción cardíaca. El sacrifi-

cio se efectuó con una inyección intracardíaca de cloruro potásico. Una vez muerto el animal se recogieron muestras de tejidos para la cuantificación bacteriana.

**Procedimiento quirúrgico.** Los animales fueron anestesiados como se ha descrito previamente. Después de afeitar y desinfectar la piel de la zona quirúrgica circundante a la rótula, se realizó una incisión, atravesando longitudinalmente el ligamento rotuliano desde la fascia articular (con la ayuda de un bisturí). Se fresó la tibia con una aguja de 16G (1,2 × 40) desde el área proximal hasta la distal, se introdujo el implante metálico (colonizado o estéril) en la cavidad resultante, y se procedió a la inoculación de la suspensión bacteriana correspondiente. La sutura se realizó con grapas y la piel se desinfectó con povidona yodada.

**Detección de la infección y tratamiento de muestras.** La cronicidad se confirmó al final de la experiencia por rayos-x y análisis bacteriológico e histológico (en secciones de tejidos de 4 µm de grosor, usando la tinción Gram). Para los estudios histológicos, antes de la tinción, las muestras se pegaron y decalcificaron en EDTA-PVP (durante 26 días); después de lavar para eliminar la solución decalcificadora, las muestras se deshidrataron consecutivamente en alcohol a distintas concentraciones (70-80-96-100-100%), xilol y se incluyeron en parafina.

Para el análisis bacteriológico realizado al final del período experimental (9 semanas tras la infección), se extrajeron las tibias que contenían los implantes, las tibias contralaterales como control para determinar si la infección llegaba por vía sistémica a esta pata, hígado, bazo y sangre (en EDTA). Los implantes recuperados se introdujeron en tubos con 2 ml de PBS estéril.

Las bacterias presentes se cuantificaron por recuento en placa y ATP-bioluminiscencia<sup>1</sup> tras una so-

**Tabla 1.** Desarrollo de osteomielitis crónica producida por implantes colonizados con biofilms y/o suspensiones bacterianas de *Staphylococcus aureus*: Comparación de 4 modelos experimentales en ratas

Modelo experimental (N = 8/modelo)	Log <sub>10</sub> ufc introducidas para iniciar la infección	Resultados a los 63 días	
		Implantes infectados (%) <sup>a</sup>	Tibias infectadas (%)
Implante colonizado	6,15 × 0,12	8 (100)	8 (100)
Implante colonizado y suspensión bacteriana	6,15 × 0,12 4	8 (100)	5 (62)*
Implante estéril y suspensión bacteriana	0 5	2 (25)**	1 (12)***
Implante estéril y suspensión bacteriana	0 6	6 (75)	6 (75)

<sup>a</sup>Probabilidad de que este porcentaje difiera de 100%, según el análisis estadístico t Student. \* p = 0,08; \*\* p = 0,004; \*\*\* p = 0,002.

nicación de 30 min a 40 Hz y 22-24 °C (en un baño sonicador; P-Selecta, Barcelona). La cuantificación bacteriana en la sangre y vísceras, diluidas en 10 ml de PBS y homogeneizadas con un Stomacher®, se realizó por recuento en placa tras las diluciones pertinentes en PBS estéril.

*Análisis estadístico.* Se aplicó un análisis estadístico *t* de Student para comparar los porcentajes de infección alcanzados en cada modelo animal, considerando independientemente el lugar de infección (tibia e implante) al final del período experimental.

### Resultados

Al final del período experimental, no se detectó septicemia en ninguno de los modelos experimentales, puesto que el hígado, el bazo, la sangre y la tibia no intervenida resultaron estériles en todos los animales. Las bacterias recuperadas de hueso e implantes fueron en todos los casos *S. aureus* y tenían el mismo ribotipo y morfología colonial (SP) que la cepa inoculada, descartándose la presencia de bacterias contaminantes.

El desarrollo de infección en cada modelo experimental difería al estudiar el porcentaje de animales en los que se lograba infectar la tibia, así como en los que el implante permanecía infectado. Sólo el modelo de implante colonizado, en ausencia de suspensión bacteriana, fue capaz de alcanzar un 100% de infección en el implante y en el hueso. El modelo que incorporaba la inoculación de  $10^4$  bacterias en suspensión además de implante con el biofilm, consiguió un 100% de infecciones de los implantes, pero solamente se infectaron 5 de las 8 tibias intervenidas. Sin embargo, en los 2 modelos en los que el implante introducido era estéril, se infectaron, 6 de los 8 animales (implante y tibia) cuando la suspensión fue de  $10^6$  bacterias mientras que con una suspensión de  $10^5$  ufc, se infectaron sólo 2 implantes y 1 tibia.

### Discusión

El análisis comparativo de los modelos de osteomielitis experimental utilizados muestran una capacidad distinta para infectar en el hueso y en el implante. Un implante colonizado ha sido la única manera capaz de provocar la infección en un 100% de las tibias y los implantes. La utilización de implantes colonizados con estafilococos tienen mayor probabilidad de reproducir la infección en modelos experimentales.

Algunos de los componentes (plaquetas, moléculas del huésped y restos celulares) presentes en los biofilms formados solamente *in vivo* pueden haber sido menos abundantes en los biofilms cuyo desarro-

llo ha sido iniciado *in vitro*. Sin embargo, éstos tienen la ventaja de ofrecer una homogeneidad en los biofilms formados que posteriormente servirán de diana para los antibióticos en los tratamientos postquirúrgicos. Gracias a esta homogeneidad, es posible establecer comparaciones entre distintos antibióticos. Por el contrario, los modelos basados en el uso de suspensiones bacterianas sólo pueden dar lugar a la formación de biofilms irregulares o afectando a diferentes zonas de infección, lo cual dificulta el establecimiento de comparaciones. Por otra parte, consideramos más apropiado el empleo de especies murinas (rata en este caso) como animales de experimentación, ya que en éstas el sistema inmunológico se asemeja al del ser humano.<sup>14,25,28</sup>

La presencia del implante en la clínica eleva sustancialmente las tasas de infección.<sup>17,18,23</sup> Dentro de los modelos experimentales desarrollados, en el de implante asociado a una suspensión bacteriana como fuente de infección, se han empleado catéteres de silicona intramedulares en la tibia del conejo<sup>24</sup> y tallos metálicos,<sup>2,22,32,36</sup> pero como se ha verificado en este estudio, ninguno de ellos garantiza la infección persistente. Por otro lado, los implantes precolonizados se han empleado de manera aislada en el peritoneo,<sup>35</sup> o bien en modelos de cirugía ortopédica asociados a una suspensión bacteriana.<sup>3,16</sup> Sin embargo, estos últimos dificultan el análisis diferencial del efecto atribuible al biofilm formado sobre el implante debido a la suspensión bacteriana inoculada. Concretamente, los modelos que emplean la vía sanguínea,<sup>11,22</sup> opción con menor porcentaje de logro de osteomielitis y mayor mortalidad, serían comparables en la práctica a las infecciones producidas por la aparición de focos infecciosos en distintos puntos del organismo; mientras que aquéllos que utilizan implante precolonizado, se aproximarían a la situación clínica de material contaminado por defecto de esterilización o contaminación intraoperatoria. El modelo desarrollado con mayor éxito en este trabajo, implica el uso de implantes precolonizados en ausencia de suspensión bacteriana en el momento de la intervención; este modelo ha demostrado ser efectivo para la producción de biofilms sobre los implantes (100% de implantes infectados al final del período experimental) y para la reproducción de la infección crónica (100% de tibias infectadas), por lo que puede considerarse un modelo fiable para el estudio de este tipo de infección.

Llama la atención que el modelo que incorpora la inoculación de suspensión bacteriana además del implante con el biofilm, sólo consiguiera la infección en el 62% de las tibias intervenidas. Probablemente se deba a la mayor capacidad de una suspensión bac-

teriana diluida ( $10^4$  ufc) para estimular la respuesta inmunológica del organismo. La discrepancia de estos resultados con los obtenidos en un trabajo anterior en el que se utilizaba una estrategia mixta equivalente y se lograba un 100% de infección,<sup>16</sup> puede deberse a la mayor concentración de bacterias encontrada en el biofilm al inicio de la infección (del orden de  $10^8$  ufc), como resultado de que su formación se realizó en TSB suplementado con glucosa, en lugar de TSB sin suplemento. La eficacia de la utilización de suspensión bacteriana únicamente ( $10^6$  ufc) se halla en este estudio disminuida respecto a la publicación de Gracia y cols.<sup>16</sup> probablemente porque se utilizó un menor número de animales.

Hay autores que defienden el empleo de un agente esclerosante como elemento determinante para conseguir una osteomielitis<sup>9,22,23,29,33</sup> que no se ha mostrado necesario en nuestro modelo. Algunos ensayos *in vitro* e *in vivo* (cobayas) de sensibilidad a antibióticos que implican la utilización de bacterias adheridas a las superficies, emplean superficies cubiertas con fibronectina, favoreciendo la adhesión

bacteriana a través de los receptores (fibronectin-binding protein) de *S. aureus*.<sup>12-13</sup> La estrategia aplicada en este estudio para elegir la cepa bacteriana se basa en la utilización de una variante de *S. aureus* SP altamente adherente, y resistente a la fagocitosis, lo que favorece la cronicidad.<sup>15,20,26</sup> La adhesión al implante se debe a una interacción entre el biomaterial y la cepa. Las cepas SP demuestran una mayor capacidad para mantenerse adheridas, según König y cols.<sup>20</sup> a la hidrofobicidad. En nuestro estudio, se ha observado que la población bacteriana SP adherida al implante, permanece 2 meses después de la intervención coincidiendo con lo observado en otros estudios.<sup>5</sup>

Un modelo experimental válido debe lograr reproducir la infección en la mayor proporción posible de animales con la menor tasa de mortalidad. El modelo elegido, un implante colonizado, cumple ambos requisitos siendo una herramienta útil para el estudio de las osteomielitis generadas por *S. aureus* asociadas a la formación de biofilms en implantes y para la valoración de la eficacia de distintos tratamientos.

### Bibliografía

1. Amorena, B; Gracia, E; Monzón, M; Pérez, M, y Hernández, J: Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. *J Antimicrob Chemother*, 44: 43-55, 1999.
2. Andriole, V; Nagel, DA, y Southwick, WO: Chronic staphylococcal osteomyelitis: an experimental model. *Yale J Biol Med*, 1: 33, 1974.
3. Barth, E; Myrvik, QM; Wagner, W, y Gristina, AG: *In vitro* and *in vivo* comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomaterials*, 10: 325-328, 1989.
4. Baselga, R; Albizu, I; De La Cruz, M; Del Cacho, E; Barberán, M, y Amorena, B: Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: Implications in colonization and virulence. *Infect Immun*, 61: 4857-4862, 1993.
5. Belmatoug, N; Crémieux, AC; Bleton, R; Volk, A; Salch-Mghir A, y Grossin, M: New model of experimental prosthetic joint infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A microbiologic, histopathologic and magnetic resonance imaging characterization. *J Infect Dis*, 174: 414-417, 1996.
6. Bergamini, TM; Corpus, RA; Brittan, KR; Peyton, JC, y Cheadle, WG: The natural history of bacterial biofilm graft infection. *J Surg Res*, 56: 393-396, 1994.
7. Bloom, BS, y Esterhai, JL: Musculoskeletal infection: impact, morbidity and cost to society, medicine, and government. En: Esterhai JL, Gristina AG, Poss R, eds. Musculoskeletal infection. Méjico: *American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 5-11, 1992.
8. Costerton, JW; Stewart, PS, y Greenberg, EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322, 1999.
9. Crane, IR; Kapdi, CC; Wolfe, JN; Silberger, BK, y Lerner, AM: Xeroradiographic, bacteriologic and pathologic studies in experimental staphylococcus osteomyelitis. *Proc Soc Exp Biol Med*, 156: 303, 1977.
10. Deighton, MA; Borland, R, y Capstick, JA: Virulence of *Staphylococcus epidermidis* in a mouse model: significance of extracellular slime. *Epidemiol Infect*, 117: 267-280, 1996.
11. Deysine, M; Isenberg, HD, y Steiner, G: Chronic haematogenous osteomyelitis; studies on an experimental model. *Int Orthop*, 7: 69-78, 1983.
12. Domingue, G; Ellis, B; Dasgupta, M, y Costerton, JW: Testing antimicrobial susceptibilities of adherent bacteria by a method that incorporates guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *J Clin Microbiol*, 32: 2564-2568, 1994.
13. Fischer, B; Vaudaux, P; Magnin, M; el Mestikawy, Y; Proctor, RA; Lew, DP y Vasey, H: Novel animal model for studying molecular mechanisms of bacterial adhesion to bone-implanted metallic devices: role of fibronectin in *Staphylococcus aureus* adhesion. *J Orthop Res*, 14: 914-920, 1996.
14. García-Álvarez, F; Navarro-Zorraquino, M; Lozano, R, y cols.: The role of S-adenosylmethionine in blocking lymphocyte decrease in sepsis. En: Faist E, ed. The immune consequences of trauma, shock and sepsis. Bologna, *Monduzzi Editore*, 889-92, 1997.
15. Gracia, E; Fernández, A; Conchello, P; Laclériga, A; Paniagua, L; Seral, F, y Amorena, B: Adherence of *Staphylococcus aureus* slime-producing strain variants to biomaterials used in orthopaedic surgery. *Int Orthop*, 21: 46-51, 1997.
16. Gracia, E; Laclériga, A; Monzón, M; Leiva, J; Oteiza, C, y Amorena, B: Application of a rat osteomyelitis model to compare *in vivo* and *in vitro* antibiotic efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms. *J Surg Res*, 79: 146-153, 1998.

17. **Gristina, AG; Naylor, PT, y Myrvik, QN:** Molecular mechanisms of musculoskeletal sepsis. En: Esterhai J.L., Gristina A.G., Poss R., eds. Musculoskeletal infection. Méjico: *American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 13-28, 1992.
18. **Gristina, AG:** Implant failure and the immuno-incompetent fibro-inflammatory zone. *Clin Orthop*, 298: 106-118, 1994.
19. **Hanssen, AD, y Rand, JA:** Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg*, 80-A: 910-922, 1998.
20. **König, DP; Perdreau-Remington, F; Rütt, J; Stoberger, P; Hilgers, RD, y Plum, G:** Slime production of *Staphylococcus epidermidis*. Increased bacterial adherence and accumulation onto pure titanium. *Acta Orthop Scand*, 69: 523-526, 1998.
21. **Lambe, DW; Ferguson, KP; Mayberry-Carson, KJ; Tober-Meyer, B, y Costerton, JW:** Foreign body associated experimental osteomyelitis induced with *Bacteroides fragilis* and *Staphylococcus epidermidis* in rabbits. *Clin Orthop*, 266: 285-294, 1991.
22. **Lasierra, JM; Aznar, JM; Albareda, J; Palanca, D; Remartínez, JM; Marín, J, y Seral, F:** Modelo de osteomielitis experimental con tallo metálico intramedular. *Rev Ortop Traum*, 38-IB: 437-445, 1994.
23. **Mayberry-Carson, KJ; Tober-Meyer, B; Smith, JK; Lambe, DW, y Costerton, JW:** Bacterial adherence and glycocalyx formation in osteomyelitis experimentally induced with *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 43: 825-833, 1984.
24. **Mayberry-Carson, KJ; Tober-Meyer, B; Lambe, DW, y Costerton, JW:** *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Staphylococcus epidermidis*. *Clin Orthop*, 280: 289-299, 1992.
25. **Miller, RA; Jacobson, G; Weil, G, y Simons, ER:** Diminished calcium influx in lectin-stimulated T cells from old mice. *J Cell Physiol*, 132: 337-342, 1987.
26. **Monleón, E; Pacheco, C; Luján, L; Bolea, R; Luco, DF y Vargas, MA:** Effect of *in vitro* visna virus infection on adherence and phagocytosis of staphylococci by ovine cells. *Vet Microbiol*, 57: 13-28, 1997.
27. **NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, vol 2. Approved standards M7-A2, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, Pa., 1990.
28. **Navarro-Zorraquino, M:** Aspectos inmunológicos de la cirugía. En: Navarro-Zorraquino M., ed. El paciente quirúrgico desde el punto de vista inmunológico. Zaragoza: Editorial Universitaria, 21-50, 1997.
29. **Norden, CW:** Experimental osteomyelitis. A description of the model. *J Infect Dis*, 122: 410, 1970.
30. **Norden, CW, y Budinsky, A:** Treatment of experimental chronic osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* with ampicillin/sulbactam. *J Infect Dis*, 161: 52-53, 1990.
31. **Pérez Fernández, P; Herrera, Y; Martínez, P; Gómez-Lus, ML, y Prieto, J:** Enhancement of the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to phagocytosis after treatment with phosphomycin compared with other antimicrobial agents. *Exper Chemother*, 41: 45-49, 1995.
32. **Power, ME; Olson, ME; Domingue, PAG, y Costerton, JW:** A rat model of *Staphylococcus aureus* chronic osteomyelitis that provides a suitable system for studying the human infection. *J Med Microbiol*, 33: 189-198, 1990.
33. **Rinsky, L; Goris, ML; Schurman, DJ, y Nagel, DA:** <sup>99</sup>Tcchnetium bone scanning in experimental osteomyelitis. *Clin Orthop*, 178: 303, 1983.
34. **Vielpeau, C; Locker, B; Van Nederveelde, T, y Heuguet, V:** Le risque infectieux en chirurgie orthopédique. En: Bach J.F., Imbert J.C., Jasmin C., Ménard J., Neveux J.Y., eds. Techniques chirurgicales, orthopédie. París: *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 4400501-18, 1989.
35. **Ward, KH; Olson, ME; Lam, K, y Costerton, JW:** Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. *J Med Microbiol*, 36: 406-413, 1992.
36. **Widmer, AF; Frei, R; Rajacic, Z, y Zimmerli, W:** Correlation between *in vivo* and *in vitro* efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis*, 162: 96-102, 1990.