

FARELERDE OLUŞTURULAN OSTEOMYELIT MODELLERİNDE YABANCI CİSİM UYGULANMASININ LOKAL VE SİSTEMİK İNFEKSİYON BULGULARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Volkan ÖZTUNA*, **Gülden ERSÖZ****, **Banu COŞKUN*****, **Ali KAYA******
Mehmet ÇOLAK*****, **Fehmi KUYURTAR*******

ÖZET

Giriş: Bu çalışmada farelerde oluşturulan akut hematojen ve post-travmatik osteomyelit modellerinde, kemiğe yerleştirilen yabancı cisimlerin lokal infeksiyon bulguları ve diğer organ tutulumları üzerine etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada kullanılan 30 adet fındık faresi beş gruba ayrıldı. Bütün deneklerde medüller kanal hasarı oluşturulup ilk grup kontrol grubu olarak alındı. İkinci ve üçüncü grupta metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşu ile hematojen osteomyelit modeli oluşturuldu ve 3. grupta medüller kanala silikon dren parçası konuldu. Dördüncü ve beşinci grupta MRSA ile post-travmatik osteomyelit modeli oluşturularak 5. grupta medüller kanala silikon dren parçası konuldu. Fareler 10. günde öldürülerek tibiaları makroskopik, mikrobiyolojik ve histopatolojik olarak incelendi. Kan kültürü örneklerinin ekimi yapıldı. Karaciğer, dalak, böbrek, kalp kası, akciğer ve beyin dokularından alınan örnekler histopatolojik olarak incelendi. Grup 2 ile 3'ün bulguları ve Grup 4 ile 5'in bulguları SPSS 9.05 istatistik programında relatif risk tahmini hesaplanarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Kontrol grubunda lokal ve sistemik infeksiyon bulgusuna rastlanmadı. Hematojen ve post-travmatik osteomyelit modellerinde yabancı cisim uygulanmasının lokal ve sistemik infeksiyon bulguları üzerine bir etkisi olmadığı gözlemlendi.

Tartışma: Osteomyelitte, bakterinin kemiğe yerleşimi sürecinin ortamda bulunan yabancı cisimlerden bağımsız olarak seyrettiği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Osteomyelit, Hayvan Modeli, Yabancı Cisim.

SUMMARY

THE EFFECT OF THE APPLICATION OF FOREIGN BODY ON LOCAL AND SYSTEMIC FINDINGS OF EXPERIMENTAL OSTEOMYELITIS IN MICE

Introduction: In this study, by inducing acute hematogenous and post-traumatic osteomyelitis in mice, the effect of the foreign body fitted into bone on local infection findings and other organ involvement were investigated.

Materials and Method: Thirty mice used in this study were separated into five groups. In all of the subjects the medullary canals were destroyed and the first group formed the control. In the 2nd and the 3rd groups hematogenous osteomyelitis were developed using meticilline resistant *Staphylococcus aureus*, and in the 3rd group a piece of silicon drain tube was placed into the medullary canal. In the 4th and the 5th groups post-traumatic osteomyelitis were induced using meticilline resistant *Staphylococcus aureus* and in the 5th group a piece of silicon drain tube was placed into the medullary canal. Ten days later mice were killed and tibias were studied by macroscopically, microbiologically, and histopathologically. Blood samples were inoculated in agar plate. Samples taken from the liver, the spleen, the kidney, the heart muscle, the lung, and the brain tissues were observed histopathologically. Findings of the group 2 versus 3 and the group 4 versus 5 were statistically compared by using SPSS 9.05 program.

* Yrd. Doç. Dr., Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı.

** Yrd. Doç. Dr., Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakterioloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı.

*** Yrd. Doç. Dr., Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.

**** Doç. Dr., Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakterioloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı.

***** Araş. Gör. Dr., Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı.

***** Prof. Dr., Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı.

Results: There was no local or systemic finding of infection in the control group. The application of foreign body in hematogenous and post-traumatic osteomyelitis models did not influence local or systemic infection findings.

Conclusion: Our findings suggest that, the process of bacteria settlement in bone is independent from foreign bodies present in the environment.

Key Words: *Osteomyelitis, Animal Model, Foreign Body.*

GİRİŞ

Osteomyelit periostu, korteksi ve medüllayı tutan infektif bir klinik tablodur. Gelişim sürecinde kişinin bağışıklık sistemi ve mikroorganizmanın virülansı ile ilgili birçok faktör rol oynadığı için henüz osteomyelitin patogenezi, profilaksisi, erken tanısı ve tedavisi konusunda fikir birliğine varılamamıştır. Bu nedenle tedavi amaçlı yaklaşımları, iyi tanımlanmış hayvan modellerini kullanarak deneysel ortamlara taşımak gerekir.

Deneysel osteomyelit modeli oluşturabilmek için öncelikle lokal kemik hasarı yapmak gerekmektedir^{1,2,3,4}. Bazı çalışmalarda ise medüller kanal içine yabancı cisim koyarak osteomyelit oluşturulması önerilir^{5,6,7}. Bu modellerin kemikte infeksiyon yapabilme özellikleri ayrıntılı olarak araştırılmış olmasına karşın yabancı cisim varlığının infeksiyon şiddetini artırıp artırmadığı ve diğer organlarda infeksiyon odakları oluşmasını ne derecede etkilediği aynı ilgi ile değerlendirilmemiştir. Bu çalışmada hem hematogen hem de post-travmatik akut osteomyelit modeli oluşturulan deneklerde yabancı cisim uygulamasının bu parametreler üzerine etkileri araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri: Çalışmada, bir toraks operasyonu sonrasında gelişen infeksiyon etkeni olarak izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşu kullanıldı. Bakterinin infektivitesi fındık faresi peritonuna verilerek kanıtlandı. Metisilin direncini kontrol etmek için *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kullanıldı..

İnokulumun hazırlanması: %2 NaCl eklenmiş koyun kanlı agarda 35°C'de 16 saat inkube edildikten sonra direkt plaktan alınan bakteriler %0,85 NaCl ile süspanse edildi. 5000 devir/dakika hız ile 15 dk santrifüje edilip üst kısım dökülerek dipteki çökeltiyeye 10cc %0,85 NaCl eklendi ve bu

işlem iki defa tekrarlandı. En son çökeltiyeye tekrar %0,85 NaCl eklenerek spektrofotometrik kontrollerle 0.5 McFarland ile eşit bulanıklıkta bakteri süspanasyonu (2×10^8 CFU/ml) hazırlandı. Standart bakteri süspanasyonu, IV uygulama için 2×10^5 CFU/0.2 ml (birinci süspanasyon) ve intramedüller uygulama için 2×10^5 CFU/0.05ml (ikinci süspanasyon) canlı bakteri içeren iki ayrı süspanasyon elde edilecek şekilde %0,85 NaCl ile sulandırıldı.

Denekler ve İşlem: Çalışmada 30 adet, patojen taşımayan, 25-40 gr ağırlığında, dişi, inbred fındık faresi kullanıldı. Deneklere çalışma süresince standart yem ve şehir suyu verildi. Günlük 21°C'de 12 saatlik aydınlık-karanlık ortam sağlandı.

Farelerin anestezisi, kas içine 80 mg/kg dozda ketamin hidroklorid (Ketalar®; EWL Eczacıbaşı Warner Lambert İstanbul-Türkiye) enjeksiyonuyla sağlandı. Bütün farelerin sol cruris proksimal antero-medial yüzleri traş edildikten sonra bütün bacak %10 povidin solusyonuyla (Biokadin®; Biokar Düzce-Türkiye) boyandı. Cilt-cilt altı steril olarak geçildikten sonra 11 no bisturi ucu ile periost sıyrıldı. 22 no iğne ucuyla tibia proksimal metafizer bölge korteksi manuel olarak delindi ve iğne ucu ile rimerizasyon yapılarak medüller kanal hasarı oluşturuldu. Bu işlemten sonra denekler eşit sayıda 5 grup oluşturacak şekilde ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu olarak alındı ve bakteri uygulanmadı; 2. grubun (hematojen 1) kuyruk veninden 0.2 ml birinci bakteri süspanasyonu verildi; 3. gruba (hematojen 2) medüller kanala 0.1x0.2 cm silikon dren parçası konulduktan sonra kuyruk veninden 0.2 ml birinci bakteri süspanasyonu verildi; 4. gruba (post-travmatik 1) medüller kanala ikinci bakteri süspanasyonundan 0.05 ml verildi; 5. gruba (post-travmatik 2) ikinci bakteri süspanasyonundan 0.05 ml intramedüller olarak verildikten sonra medüller kanala 0.1x0.2 cm silikon dren parçası kondu. İşlemin sonunda cilt katküt iplikle kapatıldı. Uygulama sonrası dördüncü günde 2. gruptan bir fare exitus oldu. Steril şartlarda çıkartılan sol tibiasından alınan örnek ve intrakardiak kan örneği kanlı agara ekildi. Karaciğer, böbrek, dalak ve akciğerden alınan doku örnekleri histopatolojik olarak incelendi. Onuncu günde bütün denekler servikal dislokasyon ile öldürüldü. Sol cruriste ödem, fistül ve tibiada apse odağı olup olmadığı değerlendirildi. Mikrobiyolojik inceleme için steril şartlarda tibialardan alınan örnekler ve intrakardiak kan örnekleri kanlı agara ekildi. Kültür sonuçları 35°C de 24 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirildi. Histopatolojik

değerlendirme için deneklerden alınan tibia, karaciğer, böbrek, dalak, beyin, akciğer ve kalp dokuları, %10'luk formalinde tesbit edildi. Tibia örnekleri, %5'lik nitrik asit solüsyonunda bir gün bekletilerek dekalsifiye edildi. Daha sonra diğer doku örnekleriyle birlikte rutin doku takibi prosedürü uygulanarak, parafin bloklar elde edildi. Mikrotom (Leica 2125RT) aracılığıyla 5mm'lik kesitler alındı. Kesitler deparafinasyonu takiben hematoksilen eozin boyası ile boyanıp Olympus BX50 ışık mikroskobu ile değerlendirildi ve Olympus PM10SP fotoğraf sistemi ile fotoğrafları çekildi.

İstatistiksel değerlendirme: İkinci ve üçüncü gruplar ile 4. ve 5. gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirme bilgisayar ortamında SPSS for Windows 9.05 kullanılarak relatif risk tahmini (RR) ile yapıldı⁸.

SONUÇLAR

Dördüncü günde exitus olan deneğin kan ve tibia kültürlerinde *S. aureus* izole edildi. Diğer organlarında yaygın PNL infiltrasyonu gözlemlendi. Ölüm nedeninin sepsis olduğu düşünüldü. Deneklerin makroskopik, mikrobiyolojik ve histopatolojik bulguları Tablo I'de verilmiştir.

Hematojen ve post-travmatik osteomyelit modellerinde yabancı cisim uygulanmasının makroskopik bulguları arttırmadığı gözlemlendi (sırası ile RR= 1.5 (%95 CI[0.3, 5.9]), RR 1[0.44, 2.22]).

Exitus olan dışında diğer deneklerin kan kültüründe üreme olmadı. Grup 2 ve grup 5 in tibia kültürlerinde birer denekte (%16.7) MRSA'a ek olarak sırasıyla *Enterobacter cloacea* ve *Klebsiella pneumoniae* üredi. Hematojen ve posttravmatik osteomyelit modellerinde yabancı cisim uygulanmasının tibia kültürlerindeki üreme oranını arttırmadığı gözlemlendi (sırası ile RR=1.5 (%95 CI[0.3, 5.9]), RR=1[0.6, 1.66]).

Histopatolojik değerlendirmede kontrol grubunda

yer alan altı deneğin tibia örneklerinde kemik iliği rimerizasyonu nedeniyle hasarlanmış olan defekt bölgesi ve bu alanda yeni kemik yapıyla uyumlu olarak osteoblastik aktivitede artış göze çarptı. Kompakt kemikte Havers kanalları, iç ve dış sirkumferensiyel kemik lamelleri, periost ve kemik iliği normal olarak izlendi (Şekil 1). Diğer gruplarda infeksiyon bulgusu olarak kemik iliğinde polimorfonükleer lökosit (PNL) infiltrasyonu ve periost kalınlaşması gözlemlendi (Şekil 2). Buna ek olarak bazı deneklerde, kemik iliğinde fibroblastların ve bağ dokusu liflerinin yoğun olarak bulunduğu belirlendi (Şekil 3). Beşinci gruptaki bir denekte, kemik onarımı alanındaki osteoklast aktivitesinde yoğun artış dikkati çekti. Her iki grupta da yabancı cisim varlığının, tibiadaki infeksiyon bulgularının şiddetini etkilemediği gözlemlendi (hematojen modeller için RR= 1[0.44, 2.22], post-travmatik modeller için RR=1[0.6, 1.66]).

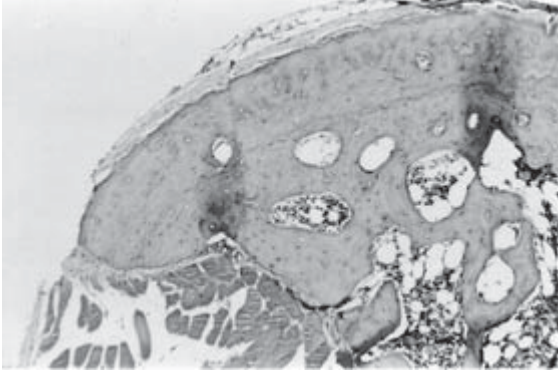
Tibia dışındaki organların herhangi birine ait mikroskopik infeksiyon bulgusu (vaskülarizasyonda artış ve yaygın lökosit infiltrasyonu) sistemik tutulum olarak kabul edildi. Bu bulgulara en sık böbrekte, ikinci sıklıkta ise akciğerde rastlandı. Yabancı cisim uygulanmasının, *S. aureus* un diğer organlarda infeksiyon odakları yapma olasılığını değiştirmediği gözlemlendi. (hematojen modeller için RR= 1.33 (%95 CI[0.5, 3.55]), post-travmatik modeller için RR= 1[0.2, 4.95]).

TARTIŞMA

Osteomyelitlerin çoğu bakteriyel kökenli olup iki ana grupta incelenirler. Birinci grup daha çok çocuklarda görülen ve hematojen yayılım ile oluşan osteomyelitler (hematojen osteomyelit); ikinci grup ise daha çok erişkinlerde rastlanan ve lokal travma (açık kırık, cerrahi uygulama) sonrası bulaşma sonucu oluşan osteomyelitlerdir (post-travmatik osteomyelit⁹). Her iki grubun infeksiyon sürecinde kişinin bağışıklık sistemine ve

Tablo I
Deney Gruplarındaki Makroskopik, Mikrobiyolojik ve Histopatolojik Bulgular

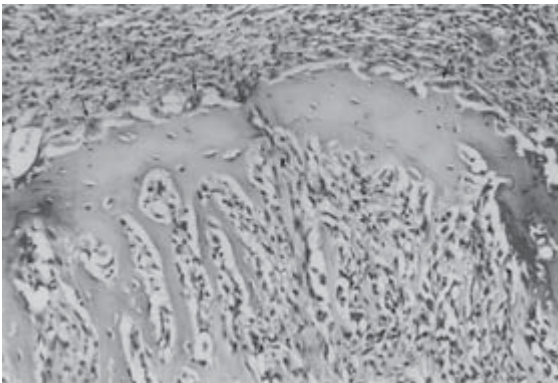
Gruplar	Ödem, Apse, Fistül	Kemikte Üreme	PNL İnfiltrasyonu Periost Kalınlaşması	Sistemik Tutulum
Kontrol	Yok	Yok	Yok	Yok
Hematojen 1	3 (%50)	3 (%50)	4 (%66.7)	4 (%66.7)
Hematojen 2	4 (%66.7)	4 (%66.7)	4 (%66.7)	3 (%50)
Post-travmatik 1	4 (%66.7)	5 (%83.3)	5 (%83.3)	2 (%33.3)
Post-travmatik 2	4 (%66.7)	5 (%83.3)	5 (%83.3)	2 (%33.3)



Şekil 1: Kontrol grubuna ait ışık mikrografta, kemik onarımı alanı (K), kemik iliği (Ki), periost (P) ve havers kanalları izleniyor. Hematoksilen eozin x 100.



Şekil 2: Kemik iliğinde (Ki) polimorfonükleer lökosit infiltrasyonunun çok belirgin olarak izlendiği mikrografta, periost kalınlaşması (P) ve periost çevresinde yer alan granülasyon dokusu (G) da görülüyor. Hematoksilen eozin x 100.



Şekil 3: Kemik onarımı alanının (K) daha büyük büyütmadaki mikrografında, bu alanın kemik iliği tarafındaki osteoklastik aktivite (oklar) ve kemik iliğindeki (Ki) çok miktarda bağ dokusu elemanı izleniyor. Hematoksilen eozin x 200.

mikroorganizmanın virülansına bağlı birçok faktör rol oynar. Bu nedenle gerek deneysel gerekse klinik çalışmalarda metodolojik bir yol izlenmesi gereklidir. İnsanlarda, hastalığın ne zaman başladığını bilmek ve değişkenlere müdahale edebilmek şansı olmadığı için kontrollü çalışmalar yapmak olası değildir. Bu durumda hayvan deneyleri, osteomyelit patogenezi ve tedavisinin incelenemediği en güvenilir yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Biz de çalışmamızda, osteomyelite karşı insan bağışıklık sistemindekine benzer cevaplar verdiği¹⁰ gözlenmiş olan inbred fındık faresi türünü kullandık.

Her iki osteomyelit tipinde de en fazla karşılaşılan mikroorganizma *S. aureus*' tur^{1,9}. Kemikğin ekstraselüler matriks moleküllerini tanıyarak adezyon sağlayan yüzey proteinleri yardımı ile *S. aureus*, tedaviye dirençli ve kronikleşen infeksiyonlara neden olmaktadır¹¹. Tedavi amaçlı hayvan deneylerinde, fazla sayıda infekte denek sağlayabilmek için uygulanan canlı bakteri sayısının 10^6 ve 10^8 gibi yüksek tutulması önerilmekle birlikte patogenezi üzerine yapılacak çalışmalarda deneğin savunma mekanizmalarını tamamen ortadan kaldırmamak için daha az sayıda canlı bakteri içeren süspansiyonların kullanılması önerilmektedir³. Biz de yabancı cisim uygulanmasının lokal ve sistemik olarak patogenezi nasıl etkilediğini araştırdığımız bu çalışmamızda hem hematojen hem de post-travmatik osteomyelit gruplarına 2×10^5 canlı MRSA inoküle edecek şekilde hazırlanan süspansiyonlar kullandık.

Günümüze kadar birçok hematojen ve post-travmatik hayvan osteomyelit modeli tanımlanmıştır. Fakat insanda oluşan osteomyelit patogenezi tamamen taklit eden bir hayvan modeli oluşturmak olası değildir. Günümüzde kabul gören metodlara bakıldığında deneysel osteomyelit oluşturabilmek için öncelikle lokal kemik hasarı yapmak gerektiği ve bunun için mekanik^{10,12} ya da şimik^{4,13} yöntemlerin uygulandığı görülmektedir. İnfeksiyon ortamına eklenecek yabancı cisimlerin fibrinojen ve fibronektin gibi adeziv moleküller tarafından kaplanarak mikrobiyal yerleşmeyi kolaylaştıran ortamlar oluşturduğu yayınlanmış olmakla birlikte^{5,6} bu işlemin infeksiyonu artırıp artırmadığı tartışmalıdır. İnvitro¹⁴ çalışmalarda metal kullanımının infeksiyon riskini arttırmadığı, invivo çalışmalarda ise kullanılan hayvan modeline bağlı olarak sonuçların değişebileceği savunulmuştur¹². Biz MRSA ile oluşturduğumuz hematojen ve post-

travmatik osteomyelit modellerinde yabancı cisim varlığının infeksiyon olasılığını ve şiddetini arttırmadığını gördük. Kemikte yapılan işlem sırasında medüller kanalın kan akımı bozulmakta ve oluşan kan pıhtıları bakteri için iyi bir yatak görevi yapmaktadır. Damarlanması bozulmuş olan bu ortamda bakteriler, konağın bağışıklık sisteminden kendilerini koruyabilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda bakteri yerleşmesini tetikleyen asıl faktörün lokal kemik hasarı olduğunu ve yabancı cisim varlığının bu süreci değiştirmedığı kanaatine vardık.

Kemiğe yerleştirilen yabancı cisimlerin bakteri adezyonu için bir yatak oluşturacağı vurgulanmış ve sistemik yayılımı engelleyebileceği savlanmıştır¹⁵. Özellikle antibiyotik tedavilerinin etkinliklerinin çalışıldığı akut osteomyelit modellerinde tedaviye verilen cevabı etkileyebilecek sekonder organ tutulumlarının ortaya konması çalışmaların standardizasyonunu sağlayacaktır. Bu yayılımın, kullanılan modele bağlı olabileceğini düşünerek çalışmamızda hem hematogen hem de post-travmatik osteomyelit modellerinde yabancı cisim eklenmesinin diğer organlarda infeksiyon odakları oluşması üzerine etkilerini araştırdık ve gruplar arasında bir değişiklik olmadığını gözledik. Günümüze kadar sekonder organ tutulumları bakteri suşlarının IV olarak uygulandığı yöntemlerde araştırılmış³ ve intramedüller bakteri inokulasyonunun yapıldığı yöntemlerde, diğer organlarda gelişen infeksiyon odakları incelenmemiştir. Bu çalışmadaki post-travmatik osteomyelit modeli oluşturulan deneklerin diğer organlarında histopatolojik olarak infeksiyon odakları saptanması, lokal uygulanan bakterilerin kemiğin venöz dolaşımı ile sistemik dolaşıma katılarak bakteriyemi yapabildiğini düşündürmüştür. Tanımlanmış olan post-travmatik osteomyelit modellerinin, hastalığın patogenezi aydınlatmak için daha ayrıntılı gözden geçirilmesi gerektiğini düşünürüz.

Bu çalışmada, fındık farelerinde MRSA ile oluşturulan hematogen ve post-travmatik osteomyelitin, ortamda bulunan yabancı cisimlerden bağımsız olarak geliştiği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Mader JT. Animal models of osteomyelitis. Am J Med 1985; 78(suppl 6B): 213-7.
2. Norden CW. Lessons learned from animal models of osteomyelitis. Reviews of Infectious Disease 1988; 10(1): 103-10.
3. Hienz AS, Sakamoto H, Flock JI, Mörner AC, Reinholt FP, Heimdahl A, Nord CE. Development and characterization of a new model of hematogenous osteomyelitis in the rat. J Infect Dis 1995; 171: 1230-6.
4. Rissing JP, Buxton TB, Weinstein RS, Shockley SK. Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. Infect Immun 1985; 47(3): 581-6.
5. Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew PD, Schumacher-Perdreau F, Peters G, Waldvogel FA. Fibronectin, fibrinogen and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. J Infect Dis 1988; 158: 693-701.
6. Lambe DW, Ferguson KP, Mayberry-Carson KJ, Tober-Meyer B, Costerton JW. Foreign-body-associated experimental osteomyelitis induced with *Bacteroides fragilis* and *Staphylococcus epidermidis* in rabbits. Clin Orthop 1991; 266: 285-94.
7. Yamamoto M. An experimental study on pseudomonas osteomyelitis with special reference to the production of experimental osteomyelitis in mice. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi 1979; 53(7): 777-92.
8. Saunders BD, Trapp RG. Comparing two independent proportions. Basic and clinical Biostatistics. Connecticut: Prentice-Hall, 1990, p. 146-9.
9. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. N Engl J Med 1997; 336(14): 999-1007.
10. Yoon KS, Fitzgerald RH, Sud Jr S, Song Z, Wooley PH. Experimental acute hematogenous osteomyelitis in mice. Influence of staphylococcus aureus infection on T-cell immunity. J Orthop Res 1999; 17: 382-91.
11. Ryden C, Yacoub AI, Maxe I, Wendel M, Heinegard D, Oldberg A, Franzen A, Ljungh A, Rubin K. Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* from patients with osteomyelitis. Eur J Biochem 1989; 184: 331-6.
12. Darouiche RO, Landon GC, Patti JM, Nguyen LL, Fernau RC, McDevitt D, Greene C, Foster T, Klima M. Role of *Staphylococcus aureus* surface adhesins in orthopaedic device infections: are results model-dependent? J Med Microbiol 1997; 46: 75-9.
13. Norden CW. Experimental osteomyelitis. A description of the model. J Infect Dis 1970; 122: 410-8.
14. Gristina AG, Rovers GD. An invitro study of the effects of metal used in internal fixation on bacterial growth. J Bone Joint Surg (Proceedings) 1963; 45 A: 1104.
15. Spagnolo N, Greco F, Rossi A, Ciolli L, Teti A, Posteraro P. Chronic staphylococcal osteomyelitis: a new experimental rat model. Infect Immun 1993; 61(12): 5225-30.