



상온에서 보관한 반코마이신 함유 항생제 시멘트의 메티실린 내성 포도상구균에 대한 항균력 조사

박세진, 조용운, 이석원, 우희연*, 임상은*

성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 정형외과학교실, *진단검사의학교실

In Vitro Study Evaluating the Antimicrobial Activity of Vancomycin-Impregnated Cement Stored at Room Temperature in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Se-Jin Park, Yongun Cho, Seok Won Lee, Hee-Yeon Woo*, Sang Eun Lim*

Departments of Orthopedic Surgery and *Laboratory Medicine, Kangbuk Samsung Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Treatment of diabetic foot infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) remains challenging. Applying vancomycin-impregnated cement is one of the best methods of treatment. Vancomycin-impregnated cement has been used worldwide; however, to date, there is a limited number of studies regarding its use. We evaluated the duration of antimicrobial activity of vancomycin-impregnated cement stored at room temperature after manufacturing.

Materials and Methods: The vancomycin-impregnated cement was manufactured by mixing 1 g of vancomycin with 40 g of polymer and adding 17.90 g of liquid monomer. The cement dough was shaped into flat cylinders with diameter and height of 6 mm and 2 mm, respectively. Another cement of the same shape without mixing vancomycin was prepared as the negative control. All manufactured cements were sterilized with ethylene oxide gas and stored at room temperature. Each cement was placed on Mueller Hinton agar plate lawned with standard MRSA strain. Standard vancomycin disk and gentamicin disk were placed together. After 24 hours, the diameter of inhibition zone was measured, and if the diameter was less than 15 mm, vancomycin-impregnated cement was regarded as a loss of antimicrobial activity. The study was repeated every 2 weeks until vancomycin-impregnated cements lost their antimicrobial activity.

Results: Vancomycin-impregnated cement stored for a duration of 16 weeks created a 14 mm inhibition zone, while vancomycin disk created a 15 mm inhibition zone. Vancomycin-impregnated cement stored for a duration of 17 weeks created 7 mm and 9 mm inhibition zones, while vancomycin disk created 16 mm and 15 mm inhibition zones, respectively.

Conclusion: We found a decrease of antimicrobial activity in vancomycin-impregnated cements after 16 weeks. After 17 weeks, they showed definite loss of antimicrobial activity. Therefore, we recommend not using vancomycin-impregnated cement spacers that has been stored for more than 16 weeks at room temperature.

Key Words: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Diabetic foot, Vancomycin-impregnated cement

서론

Received November 13, 2017 Revised December 14, 2017 Accepted January 6, 2018

Corresponding Author: Se-Jin Park

Department of Orthopedic Surgery, Kangbuk Samsung Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, 29 Saemunan-ro, Jongno-gu, Seoul 03181, Korea
Tel: 82-2-2001-2168, Fax: 82-2-2001-2176, E-mail: qortn97@naver.com
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3941-1857>

Financial support: None.

Conflict of interest: None.

2011년도 한국인의 당뇨병 유병률은 7.7%로 OECD 국가 평균이 6.9%인 것에 비해 높은 수준이다.¹⁾ Shaw 등²⁾은 2010년 미국의 당뇨병 유병률은 10.3%였지만 2030년에는 12.0%까지 증가할 것으로 예상했고 한국의 경우 7.9%에서 9.0%까지 증가할 것으로 예상

Copyright ©2018 Korean Foot and Ankle Society. All rights reserved.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

했다. 이처럼 당뇨병은 한국을 포함한 전 세계 국가에서 가장 많은 만성 질환 중의 하나이며 유병률은 지속적으로 증가하고 있다.

당뇨병 환자 중 20%는 일생 동안 족부의 합병증이 발생하며,³⁾ 이 가운데 20%~60%에서는 특별한 치료가 필요하다.^{4,5)} 당뇨병성 족부 궤양 환자에게 발생하는 감염은 포도상구균에 의한 감염이 가장 많으며,³⁾ 최근에는 항생제 남용 및 과다사용으로 메티실린 저항성 포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)에 의한 감염이 증가하는 추세이다.⁶⁾

당뇨병성 족부 궤양에서 발생한 감염은 일반적으로 광범위한 변연절제술 및 전신적 항생제 사용으로 치료하지만³⁾ 당뇨병성 말초혈관질환을 흔히 동반하고 있는 당뇨병성 족부 궤양 환자들에게서 감염의 치료가 쉽지 않은 것이 사실이며, 잘 낫지 않는 감염의 치료를 위해 변연절제술 및 항생제 시멘트(antibiotics-impregnated cement)를 적용하는 방법을 사용하기도 한다.⁷⁻⁹⁾

항생제 시멘트는 사용할 때마다 매번 새로 만드는 경우가 대부분이지만 제조에 상대적으로 시간이 오래 걸리고 매번 무균 상태에서 제조하는 것이 불편하기 때문에 다량으로 만든 후 ethylene oxide (EO) 가스 살균 소독하여 무균 상태로 보관하다 사용하면 쉽고 편하게 사용할 수 있는 훌륭한 감염 치료제가 될 수 있다. 또한, 매번 만들어 사용하는 것보다 비용을 절반 이상으로 줄일 수 있으며 시간을 단축하는 효과가 크다.¹⁰⁾

이에 저자들은 미리 만들어 EO 가스 소독 후에 상온 보관한 vancomycin 함유 항생제 시멘트의 표준 MRSA strain에 대한 항균력이 보관 기간에 따라 감소하는지를 실험을 통해 알아보하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 항생제 시멘트 제조, 살균 및 보관

본 실험은 본원 IRB 심사에서 면제를 인증 받았다. Vancomycin-impregnated cement를 제조하기 위해 상용화되어 있는 골 시멘트 (Depuy CMW 3 Gentamicin; DePuy Synthes, Raynham, MA, USA)의 40 g 골 시멘트 분말(gentamicin sulfate 4.22 w/w%, polymethyl methacrylate [PMMA] 83.88 w/w%, benzoyl peroxide 1.90 w/w%, barium sulphate 10.00 w/w%)을 플라스틱 용기에 담은 뒤 vancomycin 1 vial (Vancorin Inj. 1 g; CJ Healthcare, Seoul, Korea)을 체로 걸러 균일하게 섞어 주었다. 이후 17.90 g의 골 시멘트 용액(methyl methacrylate 97.50 w/w%, N,N-dimethyl-p-toluidine 2.50 w/w%, hydroquinone 75 ppm)을 첨가하여 적당한 강도가 되도록 저었다. 적당히 굳은 vancomycin-impregnated cement를 지름 6 mm, 두께 2 mm의 원판형태로 제조하여 단단하게 굳혔다. Vancomycin의 경우 열에 대한 안정성이 확인되기 때문에¹¹⁾ EO 가스 살균 소독(100% ethylene oxide, 55°C, 1시간, Steri-Vac 8XL; 3M, Maplewood, MN, USA)을 시행한 뒤 직사광선 및 빛이 닿지 않는 실온(24°C)에서 보관한 후 실험에 사용하였다(Fig. 1).

대조군으로 사용될 gentamicin-impregnated cement를 제조하기 위해 상용화되어 있는 40 g의 골 시멘트 분말에 17.90 g의 골 시멘트 용액을 첨가하여 실험군과 동일한 크기로 제조하여 EO 가스 살균 소독 후 동일한 환경에서 보관하여 실험에 사용하였다.

실험은 미리 제작한 두 종류의 항생제 함유 시멘트를 상온에서 동일한 환경하에 보관하다가 제조일로부터 2주 간격으로 두 개씩 꺼내어 종류별로 하나씩 배지에 올려 총 두 세트로 진행하였으며 16주의 시멘트는 제조 후 16주 동안 상온에서 보관한 시멘트를 의미한다.

2. 항균 실험

본원에서 제조한 골 시멘트의 항균기능 유지 여부를 확인하기 위해 표준 MRSA (American Tissue Culture Company [ATCC] no. 700699; Microbiology, St. Cloud, MN, USA) strain을 사용하여, 디스크를 이용한 디스크 확산법(disk diffusion method)을 시행한 후 제조한 항생제 골 시멘트의 항균력 결과를 비교하였다.

디스크 확산법은 CLSI M100-S23; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement 지침¹²⁾을 따랐다. 0.5~0.52 McFarland에 맞춘 MRSA ATCC 700699 균액을 Mueller Hinton agar (MHA) 배지에 바르고 1~3분 동안 말린 다음, 항생제 시멘트, vancomycin disk, gentamicin disk를 사이 거리가 24 mm 이상 유지되게 하여 배지 표면 위에 올려 놓았다.

실험은 vancomycin-impregnated cement 두 세트, gentamicin-impregnated cement 두 세트로 진행하였으며 MRSA의 배양 평가 및 양성 대조군 평가를 위하여 항생제 감수성 검사에서 사용하는 vancomycin disk를 이용하였고 음성대조군 평가를 위하여 gentamicin disk를 이용하여 두 개의 disk 모두를 vancomycin-impregnated cement와 gentamicin-impregnated cement 옆에 위치



Figure 1. The antibiotics-impregnated cements were manufactured as a disk form 6 mm diameter and 2 mm height.

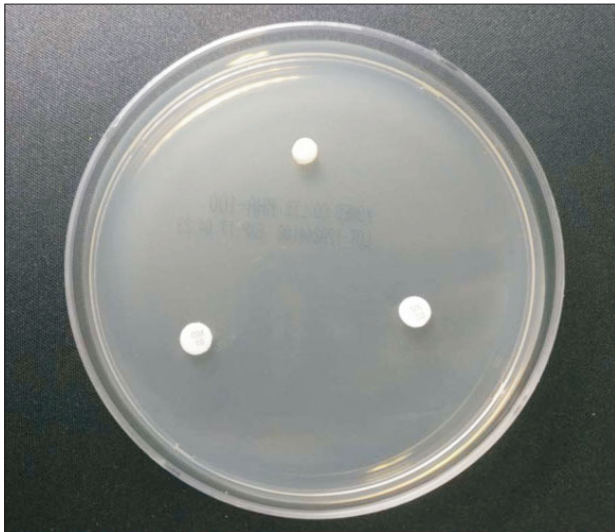


Figure 2. The vancomycin-impregnated cement and the gentamicin-impregnated cement were placed on Mueller Hinton agar plate lawned with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Commercially available vancomycin disk and gentamicin disk were placed on the same plate. Each cement and disk was placed with at least 24 mm distance.

시켰다(Fig. 2). 이후 $36.5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humidity $75\% \pm 3\%$, CO_2 5%의 환경에서 24시간 배양한 후 각각의 시멘트 및 디스크가 생성한 억제대의 지름을 측정하였다. 디스크의 억제대 지름이 15 mm 이상이면 항균력이 있는 양성으로 판독하였고,¹²⁾ 항생제 시멘트에 대한 항균기능 유지 평가는 제조한 날로부터 2주 간격으로 시행하였으며 총 두 세트로 평가하였다. 생성된 억제대의 지름이 15 mm 미만일 때 항균력이 없다고 간주하고 실험을 종료하였다.

결 과

17주 동안 vancomycin이 포함된 항생제 시멘트와 vancomycin이 포함되지 않은 항생제 시멘트를 MHA 배지에 올린 뒤 배양 24 시간 후에 생성되는 억제대의 지름을 측정하고 양성 대조군 및 음성 대조군과 비교하였다.

Vancomycin이 포함되지 않고 gentamicin만 포함된 항생제 시멘트는 17주 동안 모든 배지에서 억제대를 생성하지 않았고 gentamicin disk 역시 억제대를 생성하지 않아 MRSA에 대한 항균력이 없음을 알 수 있었으며, vancomycin disk에서는 지속적으로 항균력이 유지됨을 확인하였다(Fig. 3).

반면, vancomycin이 포함된 항생제 시멘트로 형성된 억제대의 지름은 14주까지 15 mm 이상으로 항균력이 유지되었지만 16주째 두 개 중 한 개의 배지에서 14 mm의 억제대를 보여 항균력이 감소됨을 확인하였고, 이후 추가적으로 시행한 17주째 배지에서는 두 개의 배지에서 각각 9 mm, 7 mm의 억제대를 보여 두 배지에서 모두 항균력이 감소됨을 확인할 수 있었다(Table 1, Fig. 4, 5).

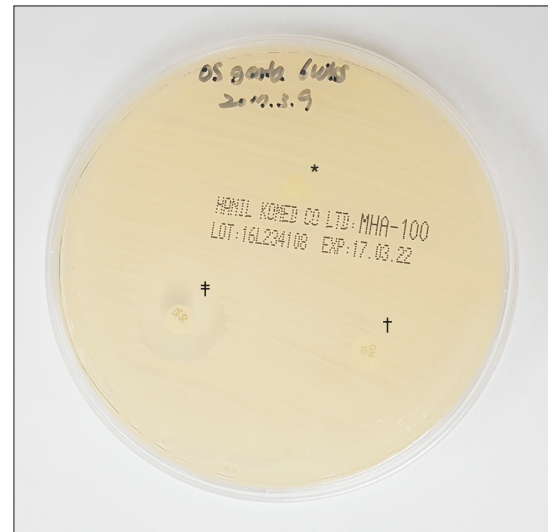


Figure 3. In every agar plate, the gentamicin-impregnated cements (*) and gentamicin disks (†) as negative control didn't create inhibition zones while vancomycin disks (*) as positive control created inhibition zones after 24 hours incubation which were larger than 15 mm wide.

고 찰

국내 당뇨병 환자가 꾸준히 증가함에 따라 어떤 형태로든 당뇨병성 족부 병변을 가지고 있는 환자가 최소 수십만 명에 이르렀을 것으로 추정되고 있다. 이 가운데 당뇨병성 족부 궤양 및 감염은 당뇨병에 의한 합병증 중에서 가장 흔한 입원 치료의 원인이 되고 있으며, 정형외과 영역에서는 대표적인 난치성 질환 중 하나로 알려져 있다.

당뇨병성 족부 궤양의 감염 균주로는 포도상구균이 가장 흔한 것으로 보고되고 있으며, 복합 감염 및 내성 균주의 발현이 사회적으로 문제가 되고 있다. 특히 MRSA 감염을 동반한 당뇨병성 족부 궤양은 당뇨병 이환율의 증가 및 항생제 남용으로 점차 증가하고 있으며 일반적인 수술적 변연절제술 및 전신적 항생제에 저항성을 보이는 경우가 흔하다.

당뇨병 족부 궤양 및 감염 환자의 경우 대부분은 말초혈관질환을 동반하고 있기 때문에 충분한 혈류 공급이 되지 않아 상처 치유에 지장을 초래할 뿐만 아니라, 전신적 항생제를 사용하더라도 적절한 치료 농도의 유지에 실패하여 감염이 조절되지 않는 경우가 많다. 이러한 이유로 인해 당뇨병성 족부 궤양 및 감염은 비외상성 하지 절단의 가장 흔한 원인이 되고 있다. 이러한 MRSA 감염을 해결하기 위해 vancomycin 함유 항생제 시멘트를 적용하는 방법을 흔히 사용한다. 항생제 시멘트를 사용하면 항생제의 전신적 농도는 낮게 유지하면서 병변 쪽의 농도는 치료 농도 이상으로 유지 가능하여 당뇨병성 말초혈관질환으로 인한 혈액순환 장애로 인해 전신적인 항생제가 병변으로 침투하지 못하는 경우뿐만 아니라, 신기능 장애 등으로 전신적인 고농도 항생제 사용이 불가능한 경우

Table 1. The Inhibition Zone Diameter Depending on the Storage Periods

	Weeks									
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	17
VA antibead1	19	18	15	18	15	19	18	16	14	7
VA control1	19	18	18	19	19	19	19	18	15	16
GM control1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VA antibead2	19	18	18	18	15	16	16	16	16	9
VA control2	19	18	18	19	19	19	19	20	16	15
GM control2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GM antibead1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VA control1	20	19	19	19	20	19	19	20	18	19
GM control1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GM antibead2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VA control2	19	20	20	19	20	19	18	18	19	18
GM control2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

VA antibead: vancomycin–impregnated cement, VA control: vancomycin disk, GM control: gentamicin disk, GM antibead: gentamicin–impregnated cement.

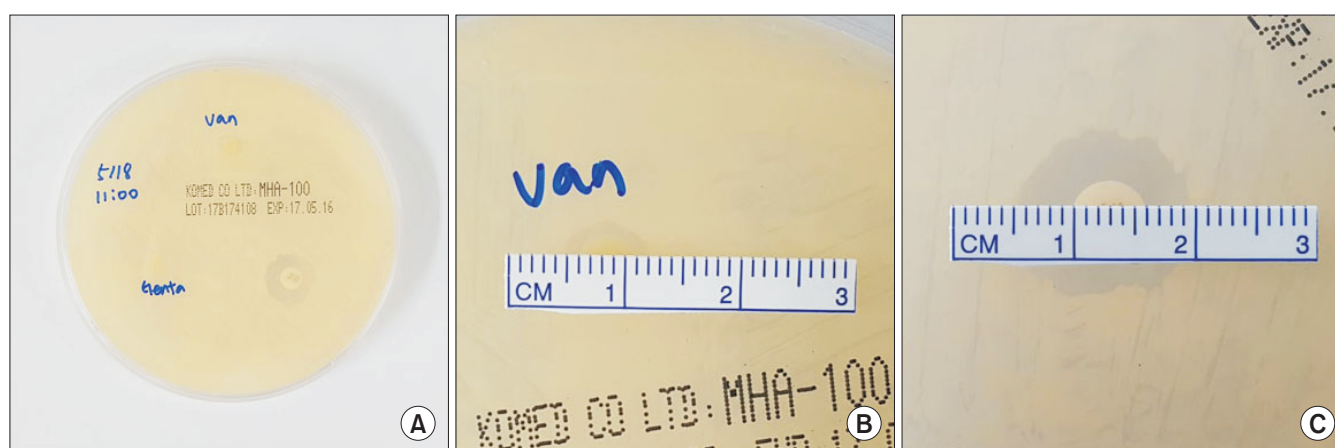


Figure 4. The vancomycin–impregnated cement, vancomycin disk and gentamicin disk were placed on the Mueller Hinton agar plate lawned with methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* (A) and incubated for 24 hours. The vancomycin–impregnated cement stored for 17 weeks (B) created 7 mm inhibition zone while vancomycin disk as positive control (C) created 16 mm inhibition zone after 24 hours incubation.

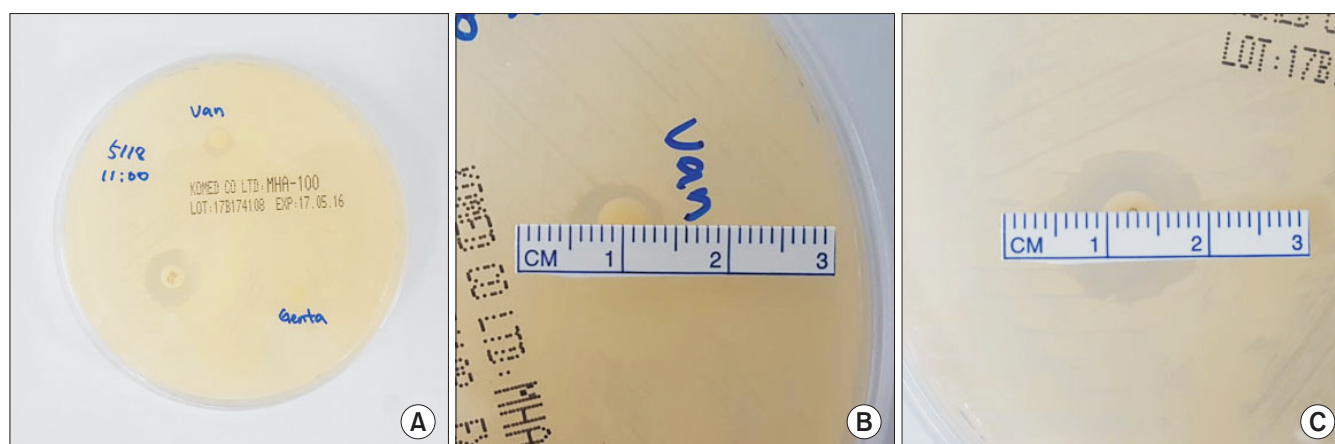


Figure 5. The vancomycin–impregnated cement, vancomycin disk and gentamicin disk were placed on the Mueller Hinton agar plate lawned with methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* (A) and incubated for 24 hours. The vancomycin–impregnated cement stored for 17 weeks (B) created 9 mm inhibition zone while vancomycin disk as positive control (C) created 15 mm inhibition zone after 24 hours incubation.

에도 적용할 수 있는 장점이 있다.⁷⁾ 또한 항생제를 정맥 투여 시 발생하는 통증이나 번거로움 없이 항생제 시멘트를 삽입한 채로 퇴원 후 외래에서 추적 관찰하며 치료할 수 있어 입원 기간을 단축시켜 주는 유용한 장점도 있다. 특히, 족부의 골은 피질골의 비율이 해면골의 비율보다 상대적으로 높아 전신 항생제에 대한 반응이 낮기 때문에⁹⁾ 골수염을 동반한 당뇨병성 족부 궤양 환자에게 항생제 시멘트의 사용이 효과적이다.

Nelson 등¹³⁾은 인체에서 36주 이상 적용되었던 gentamicin 함유 항생제 시멘트에서 항생 효과가 남아있는 것을 확인하였고, Salvati 등¹⁴⁾은 제조 9개월 이후에도 항생제 함유 골 시멘트에서 항생제가 회석되어 나오는 것을 확인하였다. 또한, Scharer와 Sanicola¹⁵⁾는 calcium phosphate와 calcium sulfate로 제조한 vancomycin 함유 항생제 시멘트를 생리식염수에 넣고 회석하여 6주 동안 실험한 결과 22일까지 vancomycin이 검출됨을 확인하였고, Balsamo 등¹⁶⁾은 tobramycin 함유 항생제 시멘트를 제조 후 가스 살균하여 항생물질이 12개월 이상 검출됨을 확인하였다. 하지만 선행 연구들은 정량적으로 항생물질이 검출됨을 실험한 연구이며 이미 제조하여 소독 후 상온에서 보관한 vancomycin 함유 항생제 시멘트를 군주에 직접 적용하여 배양했을 때 항균력을 가지는지 여부에 대한 연구는 아직 보고되지 않은 상태이다. 이에 본 실험에서는 vancomycin 함유 항생제 시멘트를 제조하여 상온 보관 후 직접 MRSA 배지에 적용함으로써 보관된 기간에 따른 실제적인 항균력을 확인하여 보관기간에 대한 기준을 확인해 보고자 하였다.

실험 결과 gentamicin-impregnated cement와 gentamicin disk 모두에서 실험 내내 MRSA에 대한 항균력이 없음을 확인할 수 있었고, vancomycin-impregnated cement에서는 제조 후 16주째부터 배지의 억제대가 15 mm 미만으로 나타나 제조 후 16주 이상 경과된 항생제 시멘트에서 항균력이 떨어짐을 확인할 수 있었다.

이 연구의 한계점으로는 첫째, 실험에 사용된 원판형의 항생제 골 시멘트의 모양이 실제 임상에서 사용하는 구형 또는 연주 모양과는 차이가 있다. 하지만 일반적으로 수술에 삽입하는 항생제 시멘트의 크기는 실험에서 사용된 지름 6×2 mm의 크기보다는 훨씬 더 크기 때문에 실험에 사용된 항생제 시멘트의 항균력 유지 기간보다 더 오랜 기간 사용이 가능할 것으로 추정할 수 있다. 둘째, 본 연구는 in vitro 실험으로 in vivo에서는 혈액에 의한 회석, 약리 작용 및 혈구세포와의 상호작용 등의 많은 변수가 존재하기 때문에 in vivo에서 항균력 유지 기간에 대해 설명하기에는 무리가 있다. Calhoun과 Mader¹⁷⁾는 PMMA cement의 제조사별, 항생제별로 다른 coefficient, 첨가된 항생제의 농도, 항생제 시멘트의 표면적에 따라서 확산되는 속도가 다르다고 발표했다. 따라서 본 연구 결과를 바탕으로 임상에 적용할 수 있는 연구가 시행되어야 할 것으로 판단된다. 셋째, 위에서 언급했듯이 당뇨병성 족부 궤양의 감염을 치료하기 위해 항생제 시멘트를 적용하는 방법을 사용하고 있지만 현재까지 항생제 시멘트의 제조방법에 대한 명확한 기준이

없는 것이 사실이며, 제조방법에 따라서 많은 변수가 존재할 것으로 생각된다. Shinsako 등¹⁸⁾은 항생제 시멘트를 만들 때 사용하는 PMMA의 경우 제조 시 중합 과정을 거치면서 중합체 구조를 만들게 되는데 성분비, 합성 시간에 따라 중합체 구조나 크기에 변화가 생겨 항생제 방출 및 유지에 변화가 생길 수 있다고 보고하였다. 따라서 표준화된 제조 방법에 대한 기준이 필요할 것으로 판단된다.

이번 연구는 vancomycin 함유 항생제 시멘트를 제조한 뒤 멸균 후 상온에서 보관 시 얼마나 오랜 기간 동안 항균력을 유지하는지에 대한 실험이었으며, 실험을 통해서 제조 후 16주 이상이 지난 항생제 시멘트의 항균력의 감소를 확인할 수 있었다. 본 연구 결과는 임상에서 이미 제조된 vancomycin 함유 항생제 시멘트 교체 및 폐기 시점을 정하는 데 유용한 지침을 제시할 것으로 판단된다.

결론

지름 6 mm, 두께 2 mm의 원판형 vancomycin 함유 항생제 시멘트를 제조하여 EO 가스 소독 후 상온에 실내 보관한 뒤 표준 MRSA strain을 이용하여 항균력이 지속되는 기간을 실험적으로 확인하였을 때, 보관 16주 이후부터 항균력이 감소함을 확인하였다.

REFERENCES

- Kim YJ, Chon S, Oh S, Woo JT, Kim SW, Rhee SY. Analysis of diabetes quality assessment findings and future directions for the appropriate management of diabetes in Korea. *Korean J Intern Med*. Published online March 15, 2017; doi: 10.3904/kjim.2016.136.
- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;87:4-14.
- Hartemann-Heurtier A, Senneville E. Diabetic foot osteomyelitis. *Diabetes Metab*. 2008;34:87-95.
- Berendt AR, Peters EJ, Bakker K, Embil JM, Eneroth M, Hinchliffe RJ, et al. Diabetic foot osteomyelitis: a progress report on diagnosis and a systematic review of treatment. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008;24 Suppl 1:S145-61.
- Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJ, Armstrong DG, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis*. 2012;54:e132-73.
- Wininger DA, Fass RJ. Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:2675-9.
- Roeder B, Van Gils CC, Maling S. Antibiotic beads in the treatment of diabetic pedal osteomyelitis. *J Foot Ankle Surg*. 2000;39:124-30.
- Nelson CL, McLaren SG, Skinner RA, Smeltzer MS, Thomas JR, Olsen KM. The treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of calcium sulfate

- tobramycin pellets. *J Orthop Res*. 2002;20:643-7.
9. LoGerfo FW, Coffman JD. Current concepts. Vascular and microvascular disease of the foot in diabetes. Implications for foot care. *N Engl J Med*. 1984;311:1615-9.
 10. Cunningham A, Demarest G, Rosen P, DeCoster TA. Antibiotic bead production. *Iowa Orthop J*. 2000;20:31-5.
 11. Traub WH, Leonhard B. Heat stability of the antimicrobial activity of sixty-two antibacterial agents. *J Antimicrob Chemother*. 1995;35:149-54.
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
 13. Nelson CL, Hickmon SG, Harrison BH. Elution characteristics of gentamicin-PMMA beads after implantation in humans. *Orthopedics*. 1994;17:415-6.
 14. Salvati EA, Callaghan JJ, Brause BD, Klein RF, Small RD. Reimplantation in infection. Elution of gentamicin from cement and beads. *Clin Orthop Relat Res*. 1986;(207):83-93.
 15. Scharer BM, Sanicola SM. The in vitro elution characteristics of vancomycin from calcium phosphate-calcium sulfate beads. *J Foot Ankle Surg*. 2009;48:540-2.
 16. Balsamo LH, Whiddon DR, Simpson RB. Does antibiotic elution from PMMA beads deteriorate after 1-year shelf storage? *Clin Orthop Relat Res*. 2007;462:195-9.
 17. Calhoun JH, Mader JT. Antibiotic beads in the management of surgical infections. *Am J Surg*. 1989;157:443-9.
 18. Shinsako K, Okui Y, Matsuda Y, Kunimasa J, Otsuka M. Effects of bead size and polymerization in PMMA bone cement on vancomycin release. *Biomed Mater Eng*. 2008;18:377-85.