

# Szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszer *in vitro* mikrobiológiai vizsgálata

Doktori értekezés

**Dr. Szász Máté Sándor**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



- Programvezető: Dr. Nagy Károly egyetemi tanár, PhD
- Témavezető: Dr. Szabó Dóra egyetemi docens,  
az MTA doktora, PhD
- Hivatalos bírálók: Dr. Tekes Kornélia egyetemi tanár,  
az MTA doktora, PhD  
Dr. Kónya József egyetemi docens, PhD
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. med. habil. Cseh Károly egyetemi tanár,  
az MTA doktora, PhD
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ludwig Endre egyetemi tanár, PhD  
Dr. Kriván Gergely egyetemi docens, PhD

Budapest  
2015

# 1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	1
2. Az értekezésben szereplő rövidítések jegyzéke .....	5
3. Bevezetés.....	9
4. Irodalmi áttekintés.....	11
4.1. Idegen testek és azokkal összefüggő fertőzések .....	11
4.1.1. Ortopédiai protézisek .....	11
4.1.2. Vénás kanülök .....	12
4.1.3. Hasúri katéterek .....	15
4.1.4. Állandó húgyúti katéterek, nephrostomák .....	16
4.1.5. Műbillentyűk.....	17
4.2. Bio film képző mikroorganizmusok .....	18
4.3. Protézis fertőzések epidemiológiája .....	20
4.3.1. Kórokozó spektrum .....	20
4.3.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i> helye a nozokomiális infekciókban.....	20
4.3.3. Bio film képző <i>Staphylococcus epidermidis</i> törzsek .....	20
4.3.4. Meticillin rezisztens <i>Staphylococcus epidermidis</i> okozta infekciók .....	22
4.4. Idegen testekkel összefüggő fertőzések megelőzésének lehetőségei .....	23
4.4.1. Az ortopédiában használatos szabályozott antibiotikum felszabadítású, nem biodegradábilis rendszerek .....	23
4.4.1.1. Septopal-lánc .....	23
4.4.1.2. Polimetil-metakrilát csontcement .....	24
4.4.1.3. Cilinderek .....	25
4.4.1.4. Antibakteriális felületek.....	25
4.4.2. Az ortopédiában használatos szabályozott antibiotikum felszabadítású, biodegradábilis rendszerek .....	25
4.4.2.1. Antibiotikummal impregnált csontgraftok .....	25
4.4.2.2. Csontképző polimerek: biokerámiák, bioüvegek .....	26

4.4.2.3. Biodegradábilis, egyéb hordozók .....	26
4.4.2.4. Kompozit rendszerek .....	27
4.4.3. Nem ortopédiai vonatkozások .....	28
4.4.4. A szabályozott gyógyszer felszabadítású rendszerekben használt antibiotikumok típusai .....	28
4.4.4.1. Penicillinek, cefalosporinok .....	29
4.4.4.2. Karbapenemek .....	30
4.4.4.3. Fluorokinolonok .....	30
4.4.4.4. Gentamicin, tobramycin, amikacin.....	31
4.4.4.5. Vancomycin, teicoplanin .....	31
4.4.4.6. Daptomycin.....	32
4.4.4.7. Linezolid .....	33
5. Kutatási munkánk célkitűzései.....	34
6. Anyag és módszer .....	35
6.1. Adatok összesítése .....	35
6.2. Mikrobiológiai minták feldolgozása .....	35
6.3. Baktérium törzsek .....	36
6.4. A baktérium csíraszámának meghatározása .....	36
6.4.1. Hígítási módszer.....	36
6.4.2. Optikai denzitáson alapuló módszer .....	38
6.5. Különböző antibiotikumok minimális gátló koncentrációjának meghatározása mikrodilúciós módszerrel .....	38
6.6. Különböző tápoldatok vancomycin koncentrációjának meghatározása biológiai módszerrel.....	39
6.7. <i>Staphylococcus epidermidis</i> növekedési kinetikájának vizsgálata .....	39
6.8. Viaszkorongok antibakteriális hatásának vizsgálata .....	40
6.9. Viaszkorongok antibiotikum leadásának vizsgálata szilárd táptalajon .....	40
6.10. Viaszkorongok antibiotikum leadásának vizsgálata folyékony közegben .....	41
6.11. Biofilm képzés fenotípusos vizsgálata.....	42

6.12. A minimális biofilm gátló koncentráció meghatározása .....	42
6.13. Frakcionált biofilm gátló koncentráció és a frakcionált gátló koncentráció index meghatározása.....	43
6.14. Statisztikai számítások .....	45
7. <i>Eredmények</i> .....	46
7.1. A posztoperatív protézisfertőzések kórokozó spektrumának retrospektív epidemiológiai vizsgálata .....	46
7.2. Minimális gátló koncentráció meghatározása .....	48
7.3. Különböző tápoldatok vancomycin koncentrációjának meghatározása .....	49
7.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i> növekedési kinetikájának vizsgálata .....	50
7.5. Viaszkorongok antibakteriális hatásának vizsgálata .....	54
7.6. Viaszkorongok vancomycin leadásának vizsgálata szilárd táptalajon .....	59
7.7. Viaszkorongok vancomycin leadásának vizsgálata folyékony közegben .....	61
7.8. Biofilm képzés fenotípusos vizsgálata.....	63
7.9. Minimális biofilm képzést gátló koncentráció meghatározása.....	64
7.10. A frakcionált biofilm gátló koncentráció és frakcionált gátló koncentráció index meghatározása.....	66
7.11. Eredmények összefoglalása .....	69
8. <i>Megbeszélés</i> .....	71
8.1. A kórokozó spektrum retrospektív epidemiológiai vizsgálata .....	71
8.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i> növekedési kinetikájának összehasonlítása különböző tápoldatokban.....	74
8.3. Két eltérő összetételű, különböző vancomycin tartalmú, szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszer vizsgálata.....	75
8.3.1. A rendszer összetevői .....	75
8.3.2. A rendszer antibakteriális hatásának idő függvényében történő vizsgálata .	79
8.3.3. A rendszer antibiotikum leadási dinamikájának meghatározása .....	79

8.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> törzsek vizsgálata.....	81
8.4.1. Biofilm képzés igazolása .....	81
8.4.2. Biofilm képzést gátló antibiotikum kombinációk meghatározása .....	81
9. Következtetések.....	84
10. Összefoglalás .....	86
11. Summary.....	87
12. Irodalmi hivatkozások jegyzéke.....	88
13. Saját publikációk jegyzéke.....	115
14. Köszönetnyilvánítás.....	116
15. Az értekezésben szereplő táblázatok jegyzéke .....	117
16. Az értekezésben szereplő ábrák jegyzéke.....	118

## 2. Az értekezésben szereplő rövidítések jegyzéke

A<sub>1-x</sub>: A jelzésű antibiotikum hígítási sora

Aae: autolysin-adhesin

Aap: autolysin-adhesin precursor

ADS: Antibiotic Delivery System, szabályozott antibiotikum-felszabadítású rendszer

ATCC: American Type Culture Collection

AtIE: accompanied transposon insertion

B<sub>1-y</sub>: B jelzésű antibiotikum hígítási sora

Bap: biofilm associated protein

BHI: brain-heart-infusion, agy-szív pép

BSI: bloodstream infection, véráram fertőzés

CAPD: continuous ambulatory peritoneal dialysis, folyamatos ambuláns peritoneális dialízis

CFU: colony forming unit, telepképző egység

CFU<sub>T</sub>: telepképző egységek száma az adott időpontban

CFU<sub>hT</sub>: telepképző egységek száma az adott időpontban, hígított oldatban

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CNS: Coagulase-negative *Staphylococcus*, koaguláz-negatív *Staphylococcus*

CRP: C-reactive protein, C-reaktív protein

CTX-M: cefotaxim rezisztens müncheni törzs

CVC: central venule catheter, centrális vénás katéter

CWTA: cell-wall teichoic acid, sejtfallban elhelyezkedő teichol-sav

DDS: Drug Delivery System, szabályozott gyógyszer-felszabadítású rendszer

DPJI: deep-prosthetic joint infection, mélyre terjedő ízületi protézis fertőzés

Ebp: elastin binding protein, elasztin kötő fehérje

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

ESBL: extended spectrum beta-lactamase, kiterjedt spektrumú béta-laktamáz

ESGNI: European Study Group on Nosocomial Infections

Fbe: fibrinogen binding protein, fibrinogén kötő fehérje

FBIC: frakcionált biofilm gátló koncentráció

FIC-index: frakcionált gátló koncentráció index

GLM: General Linear Model, lineáris regressziós modell

HD: hemodialízis

INICC: International Nosocomial Infection Control Consortium

inf: infúzió

inj: injekció

iv: intravénás

LSD: least significant difference

MH: Müller-Hinton táptalaj

MBIC: minimal biofilm inhibitory concentration, minimális biofilm gátló koncentráció

MBIC<sub>50</sub>: Az a minimális biofilm gátló koncentráció, amely gátolja a baktériumok 50 %-ának biofilm képzését

MBIC<sub>90</sub>: Az a minimális biofilm gátló koncentráció, amely gátolja a baktériumok 90 %-ának biofilm képzését

MHEK-ML: Magyar Honvédség Egészségügyi Központ Mikrobiológiai Laboratórium

MIC: minimal inhibitory concentration, minimális gátló koncentráció

MIC<sub>50</sub>: Az a minimális gátló koncentráció, amely gátolja a baktériumok 50 %-ának növekedését

MIC<sub>90</sub>: Az a minimális gátló koncentráció, amely gátolja a baktériumok 90 %-ának növekedését

MRSA: methycillin resistant *Staphylococcus aureus*, meticillin rezisztens *Staphylococcus aureus*

MRSE: methycillin resistant *Staphylococcus epidermidis*, meticillin rezisztens *Staphylococcus epidermidis*

MSSA: methycillin susceptible *Staphylococcus aureus*, meticillin érzékeny *Staphylococcus aureus*

MSSE: methycillin susceptible *Staphylococcus epidermidis*, meticillin érzékeny *Staphylococcus epidermidis*

MUMC: Maastricht University Medical Centre, Maastrichti Egyetem, Orvostudományi Központ

NCCLS: National Committee Of Clinical Laboratory Standard

ND: no data, nincs adat

NHSN: National Healthcare Safety Network  
NNIS: National Nosocomial Infections Surveillance  
NSSR: Nemzeti Nozokomiáli Surveillance Rendszer  
OEK: Országos Epidemiológiai Központ  
OD: optical density, optikai denzitás  
OTKA: Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok  
PBS: phosphate-buffer-saline, foszfátpuffer oldat  
PCN: percutan nephrostoma  
PD: peritoneális dialízis  
PIA: polysaccharide intercellular adhesin  
PJ: prosthetic joint, ízületi protézis  
PJI: prosthetic joint infection - protézis fertőzések  
PMMA: poly-methyl-metacrylate, polimetil-metakrilát  
PNAG: poly-N-acetyl-1,6-glucoseamin  
PROC: procalcitonin, prokalcitonin  
PSA: capsular polysaccharide adhesin  
PV: prosthetic valve, műbillentyű  
PVC: peripheral venous catheter, perifériás vénás kanül  
PVE: prosthetic valve endocarditis, műbillentyű endocarditis  
REIPI: Spanish Network for Research in Infectious Diseases  
SE-GYI: Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézet  
SE-KMDL: Semmelweis Egyetem Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Laboratórium  
SENTRY: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, SENTRY Antimikrobiális Surveillance Program  
SE-OK: Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinika  
spp: több faj  
SSI: surgical site infection, műtéti sebfertőzés  
T0: kezdő időpont  
T24: a kezdő időponttól számított 24 óra  
TEP: totál endoprotézis  
TG: thyoglycollate, tioglikolát táptalaj  
TKC: Time-Killing Curve, baktérium ölési görbe



TSB: tryptic soy broth, tripszines szója tápoldat

UC: urinary catheter, húgyúti katéter

VISA: vancomycin intermediate susceptible *Staphylococcus aureus*, vancomycinre mérsékelten érzékeny *Staphylococcus aureus*

WBC: white blood cell, fehérvérsejt

### 3. Bevezetés

Az orvosi gyakorlatban a testidegen anyagok beültetése speciális problémákat vet fel. Legyen az ortopéd műtétek során beültetésre kerülő protézis, az invazív kardiológiában használatos mechanikus műbillentyű, művese kezelése során centrális vénába bevezetett műanyag kanül (centrális vénás katéter, CVC) vagy a perifériás vénába szúrt kanül (perifériás vénás kanül, PVC) (pl.: Branül, B Braun Hungary Ltd., Hungary), ezzel a tevékenységgel ideális felszín hozunk létre a mikrobák szaporodására. Kanülök esetén folyamatos behatolási kaput nyitunk a kórokozók számára, hiszen az érbe bevezetett műanyag cső közlekedik a külvilággal. Mély szövetek közé történő, testidegen felület beültetésekor (pl. ortopédiai protézisek) infekciós szövődményként letokolt folyamat jöhet létre, majd a környező szövetekben szeptikus folyamat alakulhat ki. Sok esetben elegendő kevés csíraszámú baktérium a folyamat elindításához. A legfontosabb idegen felületeket és a hozzájuk köthető véráram fertőzések gyakoriságát az 1. táblázat tartalmazza (1-10).

Az intakt csontszövet rossz vérellátású területnek számít. Az ide került baktériumok (hematogén szórás vagy intraoperatív bevitel részeként) az immunrendszer sejtjei elől elbújva akadálytalanul képesek szaporodni és osteomyelitist okozni. Az ortopédiai protézisek felszínén elszaporodó kórokozók a környező csontszövetben szintén osteomyelitist hozhatnak létre. Az osteomyelitis kórokozóinak összefoglaló listája a 2. táblázatban látható (11).

Az idegen felületeken (műanyagok, kerámiák, orvosi fémek) telepeket képző baktériumok kialakíthatják saját, az immunrendszer számára áthatolhatatlan védelmi rendszerüket, amelyet biofilmnek hívunk. A baktériumok ezt követően az idegen felületről a vér-és nyirokkeringés segítségével távoli szervekbe juthatnak, úgynevezett szeptikus metasztázisokat hozhatnak létre, illetve szövődményeként véráram fertőzés (bloodstream infection, BSI) alakulhat ki.

**1. táblázat: Véráramfertőzések gyakorisága**

Idegentest	NHSN 2006-2008	INICC 2004-2009
Centrális vénás katéter (CVC)	1,8 %	6,5 %
Húgyúti katéter (UC)	4,0 %	5,9 %
Perifériás vénás kanül (PVC)	49,6 %	
Műbillentyű (PV)	49,1 %	
Ízületi protézisek (PJ)	1,0 %	

**2. táblázat: Osteomyelitis leggyakoribb kórokozói korcsoportok és prediszponáló tényezők szerint**

Korcsoport szerint	
Újszülöttkor	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterobacter</i> spp., A és B csoportú <i>Streptococcus</i> spp.
Gyermekek	<i>S. aureus</i> , <i>Enterobacter</i> spp., B csoportú <i>Streptococcus</i> spp., <i>Haemophilus influenzae</i>
Felnőttkor	<i>S. aureus</i>
Prediszponáló tényezők szerint	
Intravénás droghasználók	<i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Candida</i> spp.
Immunkompromitáltak	<i>S. aureus</i> , <i>Bartonella henselae</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Mycobacterium avium</i> complex, <i>Candida albicans</i>
Húgyúti fertőzés	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i> spp.,
Gerincműtét	<i>S. aureus</i> , koaguláz-negatív <i>Staphylococcus</i> (CNS), aerob Gram-negatív <i>Bacillus</i> ok
Nozokomiális fertőzés, diabétesz, trófikus zavar, trauma, sebfertőzés	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Candida</i> spp. Polimikrobiális: <i>S. aureus</i> , CNS, <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., Gram-negatív <i>Bacillus</i> ok, anaerobok

## 4. Irodalmi áttekintés

### 4.1. Idegen testek és azokkal összefüggő fertőzések

#### 4.1.1. Ortopédiai protézisek

Az ortopéd gyakorlatban a protézis fertőzés (prosthetic joint infection, PJI) leggyakoribb oka a szervezetben lappangó infekciós folyamatok reaktiválódása. A műtét elvégzése előtt ezért kötelező a szervezet kivizsgálása (góctalanítás). A krónikus pyelonephritis, tonsillitis, a fogágy megbetegedései, a sebek pyogén folyamatai, a gastrointestinális traktus infekciói (pl.: epehólyag gyulladás), az endocarditises góc illetve a dentogingivális beavatkozások és az endoszkópos vizsgálatok baktériumokat szórhatnak a keringésbe, amelyek megtapadhatnak a beültetett protézis felszínén és környező csontszövetben osteomyelitis hozhatnak létre (12-22). Az osteomyelitises gócból leszakadó szepszikus metasztázisok több szerv abscessusát okozhatják (23).

A PJI-k másik oka a protézis beültetés során bevitt nozokomiális flóra kolonizációja. A műtési terület nem megfelelő izolálása miatt a beteg bőréről fakultatív patogén kórokozók kerülhetnek a műtési területre. Nem elhanyagolható az epidurális érzéstelenítéssel bevitt fertőzés lehetősége sem. A műtét során az operációban részt evő személyzet is juttathat be baktériumokat, ezért a gondos bemosakodás és steril eszközök használata ellenére, elenyésző számban ugyan, de napjainkban is számolnunk kell az ilyen jellegű fertőzésekkel. A személyzet baktérium hordozásának rendszeres ellenőrzése a foglalkozás-egészségügy feladata (pl.: *Staphylococcus aureus* szűrése orr és torok váladékból).

A posztoperatív sebfertőzés a műtét utáni halálozás egyik legfőbb oka (24, 25). A beültetés során a velőűr kitakarítása közben sérülnek a csontot ellátó kis erek. A széles körben protézis rögzítésére alkalmazott, hő termelő szintetikus cement (akrilátok) lokális nekrozist okoz, majd a protézist hematoma veszi körül. E tényezők együttese előnyös feltételt teremt arra, hogy a műtét során bekerült baktériumok hetek múltán gennyesedést okozzanak. A felsorolt tényezőkhöz kapcsolódik, hogy bizonyos baktériumok (pl.

*Staphylococcusok*) könnyen kötődnek a csontcementhez (26). Az itt elhelyezkedő mikrobák a keringő ellenanyagoktól elzártak, illetve a parenterálisan adott antibiotikumok sem érik el ezt a területet. A fellépő infekció során, hasonlóan a tályogokhoz, a protézis területe mintegy izolálódik a szervezettől, letokolt folyamat veszi kezdetét. A fertőzött protézis jelenlétének két következmény lehet:

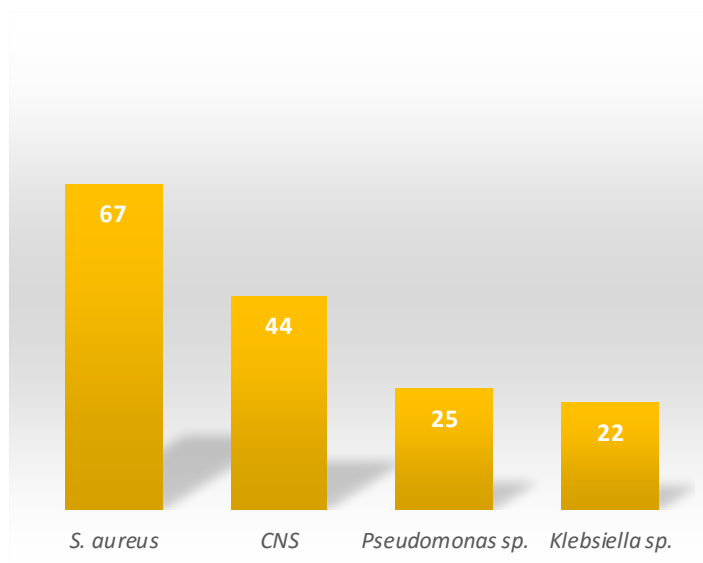
- A baktériumok szaporodásához biztosított közeg jelenléte fenntartja az állandó véráram fertőzés lehetőségét (hasonlóan a kanülszepszis kialakulásához).
- A beültetett mesterséges ízület hónapok múlva funkcióját veszti, létre jön a protézis szeptikus kilazulása, ami további reoperációkat tesz szükségessé.

A fent említett folyamatok együttes hatásának következtében a beteg könnyen intenzív osztályra kerülhet, ahol fennáll a további nozokomiális szepszis lehetősége.

#### **4.1.2. Vénás kanülök**

A vénás kanülök behelyezése során kialakult nozokomiális infekciók teszik ki az orvosi tevékenységhez kötött fertőzések jórésztét (1, 27-31). A bőr flórája (apatogén és patogén) a szűrőcsatornán keresztül megtelepszik a véna falának sérülése miatt kicsapódott fibrinrögben, állandó infekciós gócot képezve a szervezet számára. A centrális kanüloknél ezért gyakran fordul elő kanülszepszis. Azoknál a betegeknél, akiknél a kanült kemoterápiás gyógyszerek bevitelére használják, a katéter-szepszis nagyobb arányú, mint a parenterális táplálás céljából beültetett kanült viselők körében (32-35). A kvalitatív bakteriológiai meghatározás szerint akkor áll fenn CVC szeptikémia, ha a katétevégről és a perifériás vénából vett vérből ugyanaz a mikroorganizmus tenyészthető ki, anélkül, hogy az adott kórokozó más fellelhető forrásból származhatna (36, 37). A szeptikémia diagnózisa leginkább retrospektív és gyakran klinikai kritériumokon – fehérvérsejt szám (WBC), C-reaktív protein (CRP) és prokalcitonin (PCT) szint - alapszik. A PVC-eket 3-4 naponta kell cserélni. Ennek ellenére sokszor találkozunk 1 hete behelyezett perifériás kanüllel. CVC cseréjét átlagosan három hetente kell elvégezni, de a csere időpontja bizonyos esetekben függhet kanül és a beültetési eljárás típusától (36). Hemodializált betegeknél tartós kanül esetén a szakszerű kanülapólas mellett csak szövődmény (infekció, kanül trombózis) esetén van szükség cserére.

A katéter-infekció és a katéter-kolonizáció közti különbség specificitásának növelésére Maki és kollégái egy szemikvantitatív módszert dolgoztak ki a katétervég vizsgálatához, mely a kanül agar lemezen való átgörgetésével történik (38, 39). Ezzel a módszerrel megkülönböztethető a katéter-kolonizáció a katéter-infekciótól. Vizsgálatainkban, ha a katétervég leoltása 15 vagy több kolóniaformáló egység jelenlétét igazolta, abban az esetben a bakterémia kockázat 16 % volt. 15-nél kevesebb kolóniaformáló egység esetén a betegeknél nem fordult elő bakterémia. Az amerikai National Nosocomial Infections Surveillance / National Healthcare Safety Network (NNIS/NHSN) és az European Study Group on Nosocomial Infections (ESGNI) számos nagy kórházban végzett vizsgálata (pl: SENTRY) alapján leggyakrabban *S. aureus* és *Staphylococcus epidermidis* okoz szeptikémiát, de előfordul *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, béta-hemolizáló *Streptococcus* spp. és *Candida* spp. okozta kanülszeepszis (1, 27-29, 40, 41). Egyes kórházakban kifejezetten a Gram-negatív törzsek előretörése tapasztalható (42, 43). A centrálisan behelyezett kanülok átlagban 20-22 %-a fertőzött, míg ez az eredmény a perifériás kanülok esetében 15-18 % (44, 45). CVC alkalmazása esetén egyéb infekciós szövődmények is kialakulhatnak (46). A kilépési hely, vagy az alagút fertőződése tályog kialakulásához vezethet és ritkán a környező csontok (pl: kulcscsont) osteomyelitise is létrejöhet (47). Magyarországon az uralkodó klinikai gyakorlat szerint kevés hemokultúrást vizsgálatot végeznek, éppen ezért nehéz megítélni a hazai CVC szeptikémiás esetek epidemiológiáját (48). Az Nemzeti Nozokomiális Surveillance Rendszer (NNSR) 2011-es adatai alapján 72 %-ban regisztráltak CVC-hez köthető primer szeptikémiát (2008-as adatokhoz képest majdnem 20 %-os növekedés!) (30, 31). Minden más esetben szekunder volt a szeepszis oka (pl. CVC jelenlétével párhuzamosan pneumónia vagy húgyúti fertőzés volt a primer góc a szervezetben) (49). A primer BSI-ket és következésképpen a halálozást döntően *S. aureus* és *S. epidermidis* okozta. (1. ábra).



**1. ábra:** Primer véráramfertőzések halálozási adatai a NNSR 2011. évi jelentése alapján, kórokozók szerint (31)

Hemodialízis (HD) kezelés esetében hosszabb-rövidebb időre szintén centrális vénás kanül kerül beültetésre. Dialízis kanülok két fajtája ismeretes: ideiglenes (pl: két- és háromlumenű) és tartós (tunnelizált) (pl: Tesio®, Medcomp Inc., USA). Tunnelizált kanül hosszabban fut a subcutan szövetek között, amíg eléri a v. jugularis internát. Irodalmi adatok alapján Tesio® kanül alkalmazása esetén sokkal kevesebb infekciós szövődményre számíthatunk, mint az ideiglenes kanülok beültetését követően (50, 51). Mind az ideiglenes, mind a tartós kanülok esetén, a katétervesztés vezető oka az infekció, (52). Mivel a bevezetett kanül műanyag, ezért gyakran képződik a felületén biofilm, amely a kanül megtartása esetén fenntartja az infekciós folyamatot (53-57). HD kezelt paciensekben a következő kanüllasszociált, szeptikus szövődményekkel számolhatunk (54, 58-60):

- Szepszis
- Infektív endocarditis (IE)
- Osteomyelitis (OM)
- Szeptikus arthritis
- Szeptikus tüdőembólia
- Spinális - epidurális tályog

A hemodializált betegek CVC-hez kapcsolódó szeptikus folyamatainak hátterében akár 85 %-ban állhatnak Gram-pozitív kórokozók (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*). Egyes források szerint a meticillin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) a szeptikémiás esetek majdnem 1/3-áért felelős lehet (54, 61-66).

### 4.1.3. Hasúri katéterek

Peritoneális dialízis (PD) esetén a hasüreggel közlekedő Tenckhoff-katétert vezetnek be, amin ozmotikusan aktív oldatot engednek a hasüregbe, hogy a hashártyán (mint félig átteresztő hártán) keresztül filtrálódjanak ki az eltávolításra szánt anyagok. A dialízis kezelés említett típusát folyamatos ambuláns peritoneális dialízisnek (CAPD) hívjuk. A peritoneális dialízis egyik legsúlyosabb szövődménye a bakteriális peritonitis (65, 66). A hashártyagyulladás kezelést követően gyakran recidivál, ezáltal szükség lehet a Tenckhoff-katéter kivételére és a hemodialízisre történő áttérésre. CAPD-s betegekben *S. epidermidis* okoz leggyakrabban bakteriális peritonitist, második helyen *S. aureus* által okozott infekció áll (67). Gram-pozitívok patogének közül gyakran izolálnak még *Viridans Streptococcusokat*, *Enterococcusokat* és egyéb *Streptococcus spp.* törzseket is (68). Gram-negatívok közül első helyen az *E. coli* áll. Kis százalékban találkozhatunk gombák (főleg *Candida* fajok) által okozott hashártyagyulladással is (69, 70).

Tenckhoff-katéter, a Tesio® katéterhez hasonlóan alagúton (tunnelen), a bőr alatti szöveteken keresztül vezetődik át a hasüregig. Bakteriális fertőzés esetén tunnelgyulladás - a hasúri katéter bőralatti részén kialakuló gyulladás – alakul ki, ami gyakran a külső nyílás (exit site) infekciójához társul (71). A műanyag felületen megtelepedő kórokozók biofilmet termelnek, amely a szeptikus folyamat fenntartásáért, illetve relapszusáért felelős (72, 73). Tünetei gennyes váladékozás, a katéter lefutása mentén bőrpír és nyomási fájdalom. Az elváltozás ultrahang vizsgálattal követhető. A bakteriológiai leoltást antibiotikus kúra követi a kilépő nyílás megfelelő ellátásával (sebészi beavatkozás, kötözés).



#### 4.1.4. Állandó húgyúti katéterek, nephrostomák

A húgyhólyagba vezetett műanyag-szilikon csövek felszínén a mikroorganizmusok biofilmet hozhatnak létre, mintegy állandó forrását képezve az aszcendáló húgyúti fertőzéseknek. A kórokozók eljuthatnak a hólyagig, illetve elszaporodhatnak a vizeletgyűjtő zsákban. Az anus nyílás közelsége miatt az állandó katétert viselő nők fokozottabban ki vannak téve a bélbaktériumok okozta húgyúti fertőzéseknek. A katéter kolonizációjában akár több species is részt vehet, ez húgyúti szepszis forrása lehet. Húgyúti katéter viseléshez köthető infekciókat főleg Gram-negatív baktériumok okoznak (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*). *E. faecalis* és *Enterococcus faecium* jelenléte a mikrobiológiai mintában kontaminációra utalhat. *S. epidermidis* okozta katéterinfekció háttérben leggyakrabban a kórokozó biofilm képző tulajdonsága áll. Tartós katéter viselésénél nem ritka 2-4 species egyidejű jelenléte (nozokomiális, multirezisztens törzsek: *Serratia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Citrobacter spp.*) (74-78).

Percutan nephrostoma (PCN) beültetése az uréterek vagy a húgyhólyag szintjében kialakuló vizeletelvezetési akadály miatt történik. Az akadály létrejöhet külső tényező (pl. has-kismedencei térfoglalás okozta kompresszió), vagy belső obstrukció (pl. uréterkő) által. A PCN bevezetésének legfőbb indikációja a vesemedencében kialakuló, sokszor befertőződött vizeletet tartalmazó, tárgulat. Ez, ha tartósan fennáll, veseparenchyma léziót okoz és következményként inaktív zsákvese alakulhat ki. PCN bevezetésével megóvható a megmaradt veseállomány és hosszútávon biztosítható a vizeletelfolyás. A PCN beültetést követő infekciós szövődmények epidemiológiájáról kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. Tartós nephrostoma viselésének gyakori szövődménye a pyelonephritis, melynek incidenciája esetriportok és néhány kórházi felmérés alapján 19-21 %-ra tehető (79-82). A PCN-hez köthető pyelonephritis komplikált húgyúti fertőzésnek számít, amit a PCN műanyagfelszínén képződő biofilm súlyosbbit. Az infekciók mögött leggyakrabban *E. coli* okozta infekció áll, de a többi Gram-negatív kórokozó aránya is nagyobb, mint a nem komplikált esetekben. A Gram-pozitív kórokozók közül biofilm képző *S. aureus*, *S. epidermidis* és *Enterococcus spp.* törzseket több alkalommal izoláltak PCN felületéről, ezen felül egy esetriport beszámolt biofilm képző MRSA okozta kolonizációról is (83).

#### 4.1.5. Műbillentyűk

A műbillentyű beültetésen átesett betegek szervezetében lappangó infekciós gócok állandó lehetőséget teremtenek a billentyű felületén megtapadó bakteriális vegetációk kialakulásának. Nagy esetszámú, prospektív vizsgálat eredményei alapján a műbillentyűs betegek közel 50 %-ánál igazoltak vegetációt (4). A betegség incidenciája 20-30 % (84). A műbillentyű felületén megtapadó kórokozók fajtái átfedést mutatnak a CVC-hez köthető infekciók kórokozóival, ez a korreláció a HD kezelésben részesülő betegek esetében kifejezettebb (85-87). Külföldön folytatott epidemiológiai vizsgálatok eredményei szerint többségében a Gram-pozitív baktériumok - főleg *Staphylococcus* spp. és az *Enterococcus* spp. törzsek - okoznak műbillentyű endocarditist (4, 84, 88, 89). Néhány esetben beszámoltak *Propionibacterium* és *Candida* fajok által okozott infekciókról is (90, 91).

## 4.2. Biofilm képző mikroorganizmusok

Vénás katéterek, állandó húgyúti eszközök, valamint minden olyan felület, ami a kórházban fekvő beteg nyálkahártyájával huzamosabb ideig érintkezik, lehetőséget teremt arra, hogy a biofilm képző törzsek a szervezetbe jussanak. A protézis beültetésén átesett páciensek esetében a baktériumok származhatnak az állandó húgyúti katéterről, a perifériás és centrális vénás kanülről, adott esetben a lélegeztetéshez használt tubusról is. Megtelepedésük megnehezíti mind a lokális, mind a szisztémás antibiotikum terápiát. A bizonyos baktériumok képesek fenotípusukat megváltoztatni, úgynevezett sessilis konformációt vesznek fel. Nem minden kórokozó képes erre: a klasszikus járványok okozói (*Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*) planktonikus életre specializálódtak (folyadékban szabadon lebegő forma). A protézis asszociált fertőzéseket okozó törzsek képesek adhéziós faktorokat termelni, amelyekkel kitapadnak az idegen felületre (92-95). Bizonyos esetekben a protézis környékén szubterápiás dózisban dúsuló antibiotikum stimulálja a bakteriális biofilm kialakulását (96). Először reverzibilis kapcsolat jön létre a mikroba és a felület között. A mikroorganizmusok olyan géneket expresszálnak (pl. *S. epidermidis* esetében az *ica* gének), amelyek speciális adhéziós faktorokat kódolnak (94). Emellett a kórokozó rendelkezik a rá jellemző struktúrákkal (pl. sejtfa receptorok) amelyek kötik a fibronektint és a fibrinogént. Ezen faktorok összességéként létrejön az a speciális kötődés, ami fenotípusváltozást idéz elő a mikroorganizmusban: lassul az anyagcseréje, lassan szaporodik, ehhez a csökkent oxigén és tápanyag ellátottság is hozzájárul. A sejtfa szintézisben szerepet játszó fehérjék down-regulálódnak, majd beágyazódik a megtermelt glyocalyxba, először mikrokolóniákat, majd kiterjedt telepeket létrehozva.

A biofilm lehet monobakteriális. Ebben az esetben a génexpresszió a maximális túlélést szolgálja. Az egyetlen species kihasznál minden rendelkezésére álló erőforrást. Polimikrobiális esetben a különböző kórokozók eltérő szabályok szerint alakítják ki a közös biofilmet. A lényeg, hogy mindegyik species ideális feltételt teremtsen magának. Ez tükröződik az elhelyezkedésben is: a több oxigént igénylők felül, közel a felszínhez, a fakultatív anaerobok a film alján telepsznek meg. A baktériumsejtek emellett kiépítik saját kommunikációs hálózatukat is, így jeleket küldenek egymásnak a biofilmen túli állapotokról, a tápanyag ellátottságról és a szervezet védekezőképességéről (97).

A kórokozó adhéziós faktora mellett szót kell ejteni a szervezet és a protézis szerepéről is. A protézis rögzítéséhez polimetil-metakrilát (poly-methyl-metacrilate, PMMA) csontcementet használnak. A baktérium által termelt glycocalyx ligandként kötődik a megszilárdult PMMA „receptor” felületére (98). A csontcement avascularis felszínnek tekinthető. Az itt megtelepedő kórokozók a keringő ellenanyagoktól elzártak, az optimális kötődés miatt kevesebb mikroba is elég a fertőzéshez. A szervezet extracelluláris mátrixa gazdag fibronektinben, az erekből kilépő plazma pedig plazma glikoproteint tartalmaz. Ezen anyagok szintén segítséget nyújtanak a baktériumok kolonizációjához (94, 99).

### 4.3. Protézis fertőzések epidemiológiája

#### 4.3.1. Kórokozó spektrum

Az elmúlt 15 évben különböző országokban, több egészségügyi intézményt érintő vizsgálatot végeztek a protézis asszociált fertőzések kórokozó spektrumának meghatározására. Európai országokban végzett kutatás szerint többségében a Gram-pozitív baktériumok által okozott gennyes folyamatok miatt történt a beültetett protézisek cseréje. A legtöbb vizsgálat a 2003-2011 közötti éveket öleli fel. Az ezen időintervallum alatt gyűjtött adatok elemzése során többségében *Staphylococcus*ok által okozott szeptikus folyamatok, illetve a Gram-negatív baktériumok okozta PJI-k számának előretörése volt észlelhető, és ez a tendencia napjainkban is tapasztalható (100-103).

#### 4.3.2. *Staphylococcus epidermidis* helye a nozokomiális infekciókban

A *S. epidermidis*, ellentétben a *S. aureusszal*, eredendően nem tartották nozokomiális patogénnek. Az 1950-es évektől a gyakoribbá váló szívműtétek (főleg szívbillentyű beültetések) miatt azonban egyre több helyről jelentettek koaguláz-negatív *Staphylococcus* spp. (CNS) fertőzéseket. A szaporodó infekciókhoz hozzájárult a vénás kanülök, katéterek és liquorshuntók használata is. A CNS fertőzések aránya az 1980-as évek elejétől az 1990-es évek közepéig fokozatos, majd 2000 után az USA és Európa kórházaiban ugrásszerűen növekedést mutatott. A folyamat eredményeként a Gram-pozitív baktériumok - ezen belül a *S. epidermidis* - dominánssá váltak az idegen felületekhez (CVC, műbillentyűk, ortopédiai protézisek) köthető kórházi fertőzésekben (94, 104, 105).

#### 4.3.3. Biofilm képző *Staphylococcus epidermidis* törzsek

A testbe ültetett idegen felületek a *S. epidermidis* „receptoraiként” szolgálnak, különösen igaz ez a PMMA felületek esetén. A ligandszerű kötődésben nagy szerepet játszanak a baktérium virulencia faktorai (3. táblázat). Az idegen felületen (műanyagok, kerámia,

fémek) a biofilm képződés két lépésben zajlik. A baktérium először kitapad az idegen felületre, ahol sejt aggregátumokat hoz létre, majd ezek a kolónia szigetek többszintes szerkezetté állnak össze. A kitapadásban és az infekció iniciális fázisában egy adhezin (capsular polysaccharide adhesin, PSA), illetve bizonyos esetekben az *atlE* gén által kódolt autolizin protein játsza a legfontosabb szerepet. Második lépésben a sejt aggregátumok között rendkívül erős, sejt-sejt közötti kapcsolat jön létre. A sejt-sejt kötések kialakításban az *icaADBC* lókuszon kódolt PIA (polysaccharide intercellular adhesin) és a PNAG (poly-N-acetyl-1,6-glucoseamin) a legfontosabb faktor (94, 106-108).

**3. táblázat:** *S. epidermidis* biofilm képzésért felelős virulencia faktorai

virulencia faktor	szerkezet	gén	funkció
AtlE	fehérje	<i>atlE</i>	autolizin / adhezin, kitapadásért felelős faktor, mátrix protein
Aae	fehérje	<i>aae</i>	autolizin / adhezin
CWTA	glikoprotein	<i>tar / tag</i>	teicholsav, sejt-falkomponens
SdrF	fehérje	<i>sdrF</i>	kollagén kötő fehérje
SdrG (Fbe)	fehérje	<i>sdrG (fbe)</i>	fibrinogén kötő fehérje
SdrH	fehérje	<i>sdrH</i>	adhéziós faktor
Ebp	fehérje	<i>ebp</i>	elasztin kötő fehérje
PIA / PNAG	fehérje	<i>icaA, icaD, icaB, icaC</i>	poliszacharid kötő fehérje, sejt-sejt kötődés ill. anti-IgA, antifagociter és antikomplement funkció
Bap/Bhp	fehérje	<i>bap / bhp</i>	intercelluláris adhezin
Aap	fehérje	<i>aap</i>	intercelluláris adhezin prekurzor, proteolízis után aktív

#### 4.3.4. Meticillin rezisztens *Staphylococcus epidermidis* okozta infekciók

A kiterjedt béta-laktám antibiotikum használat hozzájárult a meticillin rezisztens *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) törzsek elterjedéséhez. A meticillin rezisztens törzsek invazivitása a meticillin érzékeny (methicillin susceptible *Staphylococcus epidermidis*, MSSE) törzsekét meghaladja, ezért sok esetben az ortopédiai protézisek környékén, a mélyebb szövetek felé terjedő infekciók (deep-prosthetic joint infections, DPJI) elsősorú kóroki tényezőjeként szerepel (109, 110). Az MRSE törzsek a béta-laktám antibiotikumok többségére rezisztensek és egyes törzsek csökkent érzékenységet mutatnak a glikopeptidekkel szemben (111). Több tanulmány igazolta, hogy az MRSE törzsekkel szembeni aminoglikozid rezisztencia az 1990-es években ugrásszerűen nőtt, Nyugat-Európában jelenleg átlagosan 60 % felett van. Az USA-ban 1992 és 2004 között NNIS által feldolgozott surveillance adatok alapján a *S. epidermidis* klinikai izolátumok 89,1 %-a bizonyult meticillin rezisztensnek (111, 112).

Az MRSE ellen jelenleg a vancomycin az első választandó antibiotikum, azonban a glikopeptidekkel szembeni csökkent érzékenység miatt számos közlemény a daptomycint részesíti előnyben (113, 114).

#### *4.4. Idegen testekkel összefüggő fertőzések megelőzésének lehetőségei*

A beültetett eszközök (protézisek, érpótlók, kanülök) felszíne ideális lehetőséget jelent a baktériumok növekedésének. Ezeken a területeken a szisztémás terápiás eszközök sokszor nem penetrálnak megfelelően. A gyógyászatban már évek óta használnak szabályozott gyógyszer felszabadítású rendszereket (DDS, Drug Delivery System), melyekhez hatóanyagként antibiotikumot kötnek. A szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszerek (ADS, Antibiotic Delivery System) jól használhatóak lokális infekciók megelőzésére, illetve terápiásan is bevethetőek egy-egy góc szanálására (115). Az ADS-ek két csoportra oszthatóak: nem biodegradábilis és biodegradábilis rendszerekre. A biodegradábilis rendszerek közös jellemzője, hogy a beültetést követően nincs szükség az eltávolításukra, jelentősen csökkentve ezzel az infekció kockázatát. Az antibiotikum leadást követően a hordozóanyagot a szervezet elbontja (pl. makrofágok) és/vagy az inaktív DDS beépül a csontszövetbe. Az utóbbi esetben az infekciós gócból adódó szövethiány helyén új csontszövet épül, így ezek a rendszerek csontpótlásra is használhatóak.

#### **4.4.1. Az ortopédiában használatos szabályozott antibiotikum felszabadítású, nem biodegradábilis rendszerek**

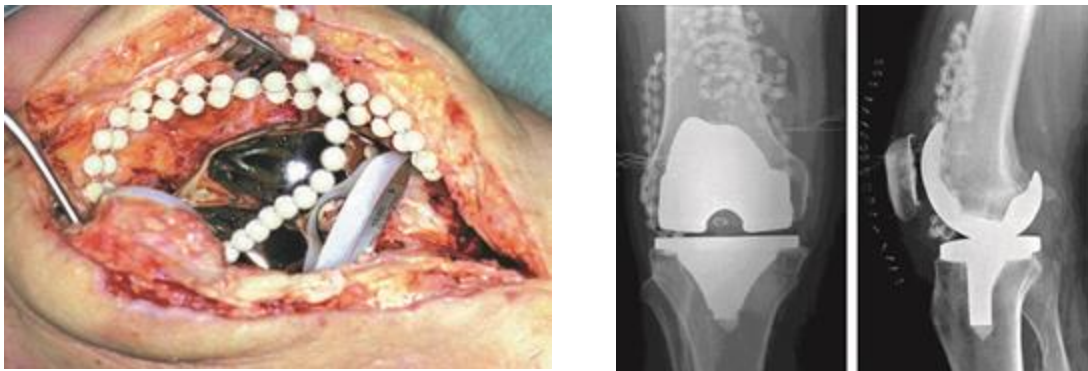
##### **4.4.1.1. Septopal-lánc**

A gentamicint tartalmazó polimetil-metakrilát golyócskákból álló Septopal-láncokat (116-118) az 1970-es években vezették be (Refobacin-Palacos®) (Biomet Inc., Sweden), hogy megelőzzék az ortopédiai beavatkozások (protézis beültetés, osteomyelitises góc szanálása) után fellépő infekciós szövődményeket. Az 1980-as évektől tobramycinnel töltött golyócskákból álló láncok antibiotikum leadását is vizsgálták (118, 119). Daniëlle Neut és munkatársai 2010-ben több cég által az eredeti Septopal-lánc továbbfejlesztett változatait tesztelte (120). A jelenleg használt hordozó



rendszerek az eredeti modellhez képest sokkal tovább biztosítanak egyenletes, minimális gátló koncentráció (MIC) értéket meghaladó antibiotikum szintet lokálisan. Az alkalmazás lényege, hogy a kikapart, előzőleg gyulladással szennyezett csontüregbe, illetve a krónikus folyamatként kialakult Brodie-tályog üregébe gentamicint tartalmazó golyócskákból összeállított láncot ültetnek, ami hetekig adagolja az aminoglikozidot.

A kereskedelemben meghatározott nagyságú (7 mm) PMMA gyöngyöket forgalmaznak (2. ábra). Ezen felül léteznek nem kereskedelmi készítmények, melyeket sebészek állítanak össze (121).



2. ábra: Septopal-lánc (122)

#### 4.4.1.2. Polimetil-metakrilát csontcement

A protézisek beültetésekor ragasztó és tömítőanyagként polimetil-metakrilát csontcementet töltenek a metaphysis üregébe a protézis szára köré (123-126). Az antibiotikummal impregnált csontcementet Európában több, mint 3 évtizede alkalmazzák (127-129). Először Bucholz és Engelbrecht alkalmazott antibiotikummal kevert csontcementet csípőprotézis szeptikus folyamatainak megelőzése céljából az 1970-es években (Refobacin - Palacos ©, Biomet Inc., Sweden) (127, 130, 131). Néhány évvel később Klekamp és munkatársai egységenként 1 g vancomycint és 1,2 g tobramycint Simplex-P® cement (Styker Global Headquarters, USA) részecskékkkel keverték össze (132). Az általuk kiadott közlemények alapján az antibiotikummal elegyített csontcement hatásossága függ a cement típusától és a molekulák közti kémiai kötéstől. Az

antibiotikummal történő impregnáláshoz napjainkban tobramycint, gentamicint és vancomycint használnak (24, 132-135).

#### **4.4.1.3. Cilinderek**

A mikrocilinderek alkalmazását a protézis körül kialakuló osteomyelitis kezelésére dolgozták ki. Lényege, hogy többfajta antibiotikum és csontörlemény egyvelegét kis cilinderekbe helyezték. Állatkísérletek során ezeket a cilindereket ültették a kitakarított osteomyelitises góc üregébe. Bár a tesztek során a rendszer egyenletes hatóanyag leadását detektálták, a módszernek klinikai kipróbálására ezidáig nem került sor (136-138).

#### **4.4.1.4. Antibakteriális felületek**

A protézis asszociált fertőzések egyik újfajta megelőzési módja, ha a protézis felületét antibakteriális anyagokkal vonjuk be. Régóta ismert az ezüst baktericid hatása. Legújabb kutatások eredményei alapján a fém felületéhez kovalensen antibiotikum molekulákat kötnek. Antoci és munkatársai 2008-ban titánium felülethez vancomycint kötöttek, majd ezt követően *S. epidermidis* törzsek biofilm képző képességét vizsgálták dúsító táptalaj segítségével. A kísérletsorozat szerint a felülethez kötött antibiotikum már a planktonikus fázisban meggátolta a baktériumok növekedését (139-143).

### **4.4.2. Az ortopédiában használatos szabályozott antibiotikum felszabadítású, biodegradábilis rendszerek**

#### **4.4.2.1. Antibiotikummal impregnált csontgraftok**

Számos közlemény számol be antibiotikummal impregnált csontgraftok alkalmazásáról. Buttaró és munkatársai 1997-2000 között 29, korábban csípőprotézis beültetésén átesett páciens szeptikus szövődmenyét kezelték vancomycines csontgrafttal

(144). Chen és munkatársai 1996 és 2001 között 18 tibia osteomyelitises beteget kezelt antibiotikummal impregnált csontgraftal. Első fázisban gentamicines Septopal-láncot ültettek a kitakarított csontüregbe. Akiknél a preoperatív időszakban MRSA infekciót igazoltak, azoknál második fázisban a primer DDS eltávolítása után került beültetésre a vancomycinrel impregnált csontgraft. A graftot a crista iliaca anterior vagy posterior superior területéről vették. A beültetést követően kiegészítésként egy hétig parenterális antibiotikum terápiát is alkalmaztak. A csontgraft beültetése után hat héttel 18-ból 13 páciens esetében röntgen vizsgálattal is igazolható csontegyesülés jött létre (145).

#### **4.4.2.2. Csontképző polimerek: biokerámiák, bioüvegek**

A biopolimerek jellemzője, hogy az osteogenesis (csontképződést) elősegítő vegyületeket (kalcium-foszfát, trikálcium-foszfát, kalcium-szulfát, hidroxipatit, szilikát, borát) is tartalmaznak. A polimert képező anyagok erősen kötődnek a csont és lágyszövetekhez, és elősegítik az új csontszövet képződését az infekció miatt kialakult üreg helyén. Antibiotikumként tobramycint és vancomycint kötnek a polimer molekulákhoz (146-152).

#### **4.4.2.3. Biodegradábilis, egyéb hordozók**

Újabb típusú vegyületeknek számítanak a szerves poliészter (polylactid) és kollagén polimerek, amelyeket kifejezetten ampicillin, gentamicin és tobramycin antibiotikumokhoz fejlesztettek ki (153-156). 2008-ban Brin és munkatársai injektálható, gentamicin tartalmú, szerves észter alapú rendszert dolgoztak ki osteomyelitis kezelésére (157).

#### 4.4.2.4. Kompozit rendszerek

Napjainkban szerves (polyglycol, polylactid, polycaprolacton) és szervetlen (trikalcium-foszfát, hidroxipapatit) vegyületek hibridjéből álló DDS-ekkel kísérleteznek, ötvözve a gyorsan lebomló, biodegradábilis anyagok és az oszteogenezist elősegítő vegyületek tulajdonságait. Állatmodellekben a hibrid rendszerek egyes típusának alkalmazása ígéretesnek tűnik (151, 158-162).

Az ortopédiában napjainkban használt, illetve kifejlesztés alatt álló szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszerek áttekintő listáját a 4. táblázat tartalmazza.

#### 4. táblázat: Alkalmazott és fejlesztés alatt álló DDS-ek az ortopédiában

DDS	Antibiotikum	<i>In vitro</i> tesztekhez használt baktérium
<b>Nem biodegradábilis rendszerek</b>		
Septopal-lánc	gentamicin	<i>S. aureus</i>
PMMA csontcement	vancomycin, tobramycin, gentamicin	<i>S. aureus</i>
Mikrocilinderek	benzilpenicillin, dicloxacillin, netilmicin, clindamycin, cefalotin, vancomycin, ciprofloxacín, rifampicin,	<i>S. aureus</i>
Antibakteriális felületek	ezüst/ vancomycin	<i>S. epidermidis</i>
<b>Biodegradábilis rendszerek</b>		
Csontgraftok	vancomycin	<i>S. aureus</i> , MRSA
Biokerámiák	gentamicin, moxifloxacin, vancomycin, tobramycin	<i>S. aureus</i> , MRSA
Bioüvegek	vancomycin, ceftriaxon	<i>S. aureus</i> , MRSA
Szerves poliészterek, kollagének, glikolok, glikolsavak	gentamicin, tobramycin, ampicillin, cefoperazon, cefazolin	<i>S. aureus</i>
Kompozit rendszerek	teicoplanin, ciprofloxacín, gatifloxacin	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. milleri</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>P. aeruginosa</i>

### 4.4.3. Nem ortopédiai vonatkozások

Az elmúlt 10 évben számos közlemény beszámol centrális vénás kanülhöz köthető véráramfertőzés megelőzésének lehetőségeiről (163-169). Ezen eljárások lényege, hogy a vénás katéterek felületét antiszeptikus - antibakteriális anyagok kombinációjával vonják be (ezüst, platina illetve clorhexidine) Irodalmi adatok ismeretében az így kapott antibakteriális bevonatú katéterfelszínhez a következő antibiotikumokat kötik: ciprofloxacín, sulfadiazin és rifampicin-minociklin. A katéter felszínéhez tapadó trombus táptalajként szolgálhat a baktériumoknak, ezért a vénás katéterek felszínéhez valamilyen heparint tartalmazó antitrombotikus anyagot is kötnek. Az új technika főleg a tunnelizált, HD katéterek esetében jelenthet nagy előnyt (170).

Rendszeres HD kezelésben részesülő betegek esetében a katéter asszociált fertőzések megelőzésére úgynevezett antimicrobial lock technikát alkalmaznak (59). Ennek lényege, hogy a kezelés után antibiotikum és véralvadásgátló keverékét fecskendezik a katéter lumenébe, majd 6-12 óráig bent tartják. Általában vancomycin-heparin vagy vancomycin-ciprofloxacín-heparin keverékét használják.

Húgyúti fertőzések megelőzése céljából több munkacsoport antibiotikummal bevont húgyúti katéterek kifejlesztését és tesztelését tűzte ki célul (171-173). A felhasznált antibiotikumok terén különbséget tesznek ideiglenes vagy állandó húgyúti katéterek alapján (*norfloxacin vs. gentamicin*).

### 4.4.4. A szabályozott gyógyszer felszabadítású rendszerekben használt antibiotikumok típusai

Az antibiotikumok felhasználásának legfőbb problémája az alkalmazott hatóanyag ellen kifejlődött rezisztencia. Egyes esetben a kórokozó maga rendelkezik természetes rezisztenciával (pl. az *Enterococcusok* természetes rezisztenciája cefalosporinok ellen) (174). A baktériumok között a horizontális génátvitel következtében az adott antibiotikumra érzékeny törzs kaphat rezisztencia géneket (plazmidok által kódolt rezisztencia). Szubterápiás, a MIC értéket el nem érő antibiotikum koncentráció előmozdítója lehet a rezisztencia kialakulásának (175). Néhány életben maradó baktérium elég ahhoz, hogy osztódás segítségével átadja a

rezisztencia génjeit az utódainak. A terápiás hatás elmúltával a mikrobák újból szaporodásnak indulnak, de ekkor már új fegyvereiket, a rezisztencia géneket használják az ismételt antibiotikum terápia ellen.

Az antibiotikum rezisztencia kérdése mellett a technikai alkalmazhatóság is lényegi szempont. A hatóanyagoknak ki kell tartania a rendszerünkben, huzamosabb ideig kell biztosítania a MIC értéket. E szempont szerint a vegyület nem lehet bomlékony és a hordozó anyag sem inaktívalhatja (176, 177). Mivel az antibiotikumnak lokálisan kell elérnie magas koncentrációt, ezért elsősorban a környező szervekre kifejtett hatását kell vizsgálni (feltételezzük, hogy a hatóanyag nem jut ki a szisztémás keringésbe). Ilyen hatás lehet pl. a csontvelő toxicitás.

#### 4.4.4.1. Penicillinek, cefalosporinok

A kutatók először a legkönnyebben elérhető és legkézenfekvőbb vegyületekkel próbálkoztak. Schierholz és munkatársai 1997-ben poliuretán rendszerrel végeztek szabályozott antibiotikum felszabadulásos vizsgálatokat, a vizsgálatokhoz flucloxacillint használtak. (178, 179). Az ortopédiában használatos DDS-ek esetében a penicillin a *Staphylococcus* törzsek elleni rezisztencia elterjedtsége miatt nem terjedt el. A penicillinek farmakokinetikai tulajdonságai vitatottak (137, 180, 181). Az antibiotikumot hő segítségével kötik a csontcement felületéhez. Vizsgálatok során a penicillin molekula hőhatására bomlékonynak bizonyult. Gram-negatív baktériumok okozta PJI-k esetén főleg *E. coli*, *Proteus sp.*, *K. pneumoniae* és *P. aeruginosa* megjelenésével kell számolnunk (102). A spektrum alapján az oxymino-cefalosporinok felhasználása tűnik kézenfekvőnek (pl. anti-*Pseudomonas* cefalosporinok - cefepim), melyeket az 1980-as években kezdtek széles körben alkalmazni a klinikumban. Több *in vitro* kísérlet is beszámol cefepimmal impregnált DDS vizsgálatáról, azonban egy 2014-ben publikált, antibiotikumok kioldódását vizsgáló tanulmány alapján a béta-laktámok kiáramlása messze elmarad a gentamicin és vancomycinhez képest (182). Más cefalosporinokkal (pl. cefuroxim) is végeztek vizsgálatokat az 1990-es években, alkalmazásuk azonban nem terjedt el (177). Terápiás gátat szabhat továbbá az említett fizikai jellemzőkön kívül a Gram-negatívok béta-laktamáz termelése. 1985-ben Németországban egy *K. pneumoniae* törzs által termelt enzimet szubsztrátspektruma alapján kiterjedt spektrumú béta-

laktamáznak (ESBL) neveztek el (183, 184). Az ESBL termelő törzsek hidrolizálják a Gram-negatív ellenes penicillin származékokat, az első, második, harmadik és negyedik generációs cefalosporinokat és a monobaktámokat is. Aktivitásuk *in vitro* különböző enzim gátlószerekkel - klavulánsav, tazobaktám, szulbaktám - jól gátolható. Ma már több mint 400 különböző ESBL enzim ismert. Ezek az enzimek világszerte jelen vannak, elsősorban plazmid által kódoltak. Főleg az *Enterobacteriaceae* család tagjai között elterjedtek, de *P. aeruginosa* törzsekben is megfigyelték őket.

#### 4.4.4.2. Karbapenemek

A karbapenemek sikerrel alkalmazhatóak a legtöbb Gram-negatív kórokozó ellen. Az ESBL-termelő, multirezisztens *Enterobacteriaceae* törzsek elterjedésével, a Gram-negatív baktériumok okozta súlyos fertőzések kezelésére elsősorban karbapenemeket használnak. Ortopédiában az *Enterobacteriaceae* törzsek közül főleg *E. coli* és *P. aeruginosa* okozta PJI-kkel számolhatunk. A karbapenem meticillin érzékeny *Staphylococcus aureus* (MSSA) és MSSE törzsek ellen is sikerrel használható. Az epidemiológiai adatok alapján azonban a karbapenem antibiotikumok önálló alkalmazása nem javasolt a terjedő MRSA fertőzések miatt. Napjainkban számos vizsgálat egyértelműen bizonyította a karbapenem rezisztens törzsek szelektálódását (185). Vancomycinnel történő kombinálása azonban új terápiás lehetőségeket teremt, mivel ez a kombináció a kórokozó spektrumot majdnem 100 %-ban lefedi. Újabb kutatások meropenem alkalmazásáról számolnak be (185, 186). Imipenemmel impregnált PMMA csontcementtel végzett kioldódási vizsgálatok során az antibiotikum MIC értéket meghaladó koncentrációban jelent meg a rendszerben, azonban ez 24 órán túl nem volt fenntartható (181).

#### 4.4.4.3. Fluorokinolonok

Egyes állatkísérletek során mesterségesen előidézett osteomyelitises góc szanálására a ciprofloxacín alkalmasnak bizonyult (160, 187). Ez azzal magyarázható, hogy a ciprofloxacín a rossz vérellátású és a szervezettől elzárt szövetekbe (ilyen a

csontszövet is) a béta-laktámoknál könnyebben penetrál. Felhasználhatóságának a korábban ismertett kórokozó spektrum szab gátat, mivel ez az antibiotikum sem alkalmazható MRSA infekciók esetén. Gram-negatívok okozta PJI esetén számolhatunk ESBL termelő törzsekkel, ahol a béta-laktám rezisztencia gyakran plazmid által kódolt fluorokinolon rezisztenciával (PMQR) párosul (188, 189).

#### 4.4.4.4. Gentamicin, tobramycin, amikacin

Az első, ortopédiában használatos DDS rendszerek gentamicin felhasználásával készültek, később tobramycint használtak (24, 134, 190). Az aminoglikozidok stabil molekulák előnyös farmakokinetikai tulajdonságaik miatt az *in vitro* vizsgálatok a kioldódás során tartósan magas koncentrációt írtak le a fertőzött szöveteket modellező tápoldatban (120, 134, 182, 191, 192). Újabb antibiotikumok kipróbálásakor az aminoglikozidok tulajdonságait kell figyelembe venni (193). Évtizedek óta a klinikai gyakorlatba sikerrel bevezetett gentamicin és tobramycin tartalmú DDS-ek alkalmazhatóságának az előretörő antibiotikum rezisztencia szab gátat. Újabb fejlesztésű antibiotikus graftok impregnálása amikacinnal történik. Az amikacin szélesebb hatást fejt ki Gram-negatívokkal szemben (194). Egyes kioldódási vizsgálatok az amikacinnak a korábban tesztelt aminoglikozidokhoz hasonló tulajdonságait igazolták (26, 180, 195-198).

*S. epidermidis* okozta PJI esetében a biofilm képzés miatt bizonyos antibiotikumokkal szembeni rezisztencia akár 30 %-al is nőhet (cefamandole, cefazolin, imipenem, ampicillin), illetve a PMMA felszínen képződő biofilm gátolhatja az antibiotikumok kioldódását. Amikacin és vancomycin esetében 15 % körüli rezisztencia növekedés tapasztalható (26, 199, 200).

#### 4.4.4.5. Vancomycin, teicoplanin

Figyelembe véve a PJI-kből izolált leggyakoribb kórokozókat, a kialakuló osteomyelitises góc szanálására a glikopeptid antibiotikumok tűnnek a legoptimálisabb választásnak. A vancomycin és teicoplanin ortopédiai felhasználásáról számos



szakirodalmi közlés látott már napvilágot (24, 134, 145, 196, 201-204). A vancomycin és teicoplanin legfőbb előnye, hogy béta-laktamást termelő *S. aureus* és *S. epidermidis* törzsek ellen első választandó szer. A Hellmark és munkatársai által publikált tanulmányban vizsgált *S. epidermidis* törzsek 91 %-a bizonyult multirezisztensnek, azonban vancomycinre, linezolidra és tigeciklinre érzékenyek maradtak (114, 205). Mindkét molekula stabil, hő hatására nem bomlik. A vancomycin a peptidoglikán sejtfall szintézisét eggyel korábbi lépésben gátolja, mint a béta-laktámok: nem engedi az UDP-N-acetil-glukozamin-pentapeptid kialakulását, ezzel meggátolja a peptidoglikán sejtfall harántkötéseinek létrejöttét (baktericid hatás). Emellett mindkét vegyület gátolja a mikroba aktív transzport rendszerét és a nukleinsav szintézist (bakteriosztatikus hatás). Mellékhatásaikban nem csontvelő károsítók. Szisztémás alkalmazásuk esetén a ritkán előforduló leukopénia miatt szérumszint monitorozás ajánlott, lokális felhasználásuk esetén ez nem szükséges. *In vitro* kísérletek (kioldódási vizsgálatok) során a teicoplanin erősebb szernek bizonyult a vancomycinhez képest (202). Egyes közlemények a teicoplanin alkalmazásáról számolnak be a legújabb fejlesztésű biodegradábilis rendszerekben (151, 161, 206). Glikopeptid antibiotikumok fosfomicinnel történt kombinálása gátolta a biofilm kialakulását, önálló alkalmazásuk esetén azonban a gátló hatás elmaradt (207, 208).

#### 4.4.4.6. Daptomycin

A világ több pontjáról izolált VISA (pl. Japán, 1997), és vancomycinre rezisztens MRSA (pl. USA) törzsek miatt több munkacsoport ciklikus lipopeptid antibiotikumok ortopédiában történő felhasználásával kísérletezik. 2011-ben publikált összehasonlító vizsgálat eredményei alapján a daptomycin, a teicoplanin és a vancomycin antibakteriális hatása között nem mutatkozott szignifikáns különbség. Kioldódási tesztek során azonban a daptomycin vancomycinhez képest gyengébb koncentrációt ért el (202).

#### **4.4.4.7. Linezolid**

A 2000-es évek első évtizedében a világ számos kórházából jelentettek csökkent glikopeptid érzékenységű Gram-pozitív törzsek okozta PJI-ket (209). Egyes klinikai vizsgálatok ezért a linezolidot sok esetben a vancomycin és teicoplanin alternatívájaként ajánlják meticillin rezisztens törzsek okozta infekciók esetében. Más kutatások a linezolid vancomycinnel megegyező hatásereőségét igazolták, azonban szisztémás alkalmazását a glikopeptidekhez képest kevesebb páciens tolerálta (210-212). A szer polylactide alapú, lokális antibiotikum felszabadítású rendszerekben való alkalmazása kísérleti fázisban van. (213, 214).

## 5. Kutatási munkánk célkitűzései

A tézisben szereplő kutatási munka célkitűzéseit a következőkben határoztuk meg:

- Célunk volt a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján 2001 és 2011 között regisztrált, protézisekhez kapcsolódó, posztoperatív fertőzések kórokozó spektrumának retrospektív epidemiológiai vizsgálata.
- További célunk volt a *S. epidermidis* növekedési kinetikájának összehasonlítása különböző tápoldatokban.
- Célkitűzésinkben szerepelt két eltérő összetételű, különböző vancomycin tartalmú, szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszer *S. epidermidis* törzsre kifejtett antibakteriális hatásának, az idő függvényében történő vizsgálata.
- További célkitűzésünk volt két eltérő összetételű, különböző vancomycin tartalmú, szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszer antibiotikum leadási dinamikájának meghatározása.
- Célunk volt továbbá *P. aeruginosa* törzsek biofilm képző képességének a vizsgálata.
- Végül célul tűztük ki *P. aeruginosa* törzsekkel szemben hatékony, biofilm képzést gátló antibiotikum kombinációk meghatározását.

## 6. Anyag és módszer

### 6.1. Adatok összesítése

A Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján (SE-OK) a szepikus műtétek és a posztoperatív sebfertőzések klinikai adatait számítógépes adatbázisból (MedSol, International System House KFT, Hungary) összesítettük. Az adatfeldolgozás további részét képezte a betegek kórlapjainak áttekintése. A betegadatokhoz kapcsolódó tenyésztési eredmények regisztrálása a Semmelweis Egyetem Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Laboratóriumában (SE-KMDL) a MedWorkS (GlobeNet KFT, Hungary) rendszer MedBakter modul segítségével történt.

### 6.2. Mikrobiológiai minták feldolgozása

Az epidemiológiai vizsgálathoz 2001 és 2011 között, a SE-OK-ról összegyűjtött klinikai minták szállítása transzport médiumban (Amies Agar Gel, 108C, Copan Diagnostics Inc, USA) történt a SE-KMDL-be. A mintákat Tryptic Soy Brothban (TSB) (BioRad Hungary Ltd, Hungary) dúsító táptalajba oltottuk, 24 órán át 37 °C-on termosztátban inkubáltuk, majd 24 óra elteltével, dúsítás Müller-Hinton (MH) (BioRad Hungary Ltd, Hungary) táptalajra és véres agarra szélesztettük. A beoltott táptalajokat 24 órára termosztátba helyeztük, majd az inkubálási periódus után történt a tenyészetek identifikálása. Az identifikált törzseket sorozatszámmal láttuk el a következőképpen: izolálás helye, évszám és sorszám (pl: Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikájáról 2006. évben izolált 112. számú törzs – SE-OK 06112).

A DDS mikrobiológiai vizsgálatához és a biofilm képzés vizsgálatához felhasznált szilárd, véresagaron egy éjszaka alatt kitenyésztett baktériumokat (*S. epidermidis* ATCC 35984, LGC Standards GmbH, Germany, illetve *P. aeruginosa* klinikai izolátum törzsei, Állami Egészségügyi Központ Mikrobiológiai Laboratórium) tápoldatos csövekben szuszpendáltuk, majd a csöveket vortexeltük, és a fagyasztás előtt egy óra hosszat 37 °C-on állni hagytuk. A baktérium törzsek tárolása 20 % glicerint tartalmazó TSB-ben történt -80 °C-on.

### 6.3. *Baktérium törzsek*

A szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszerünk hatóanyag leadás vizsgálatához és a növekedési kinetika meghatározásához *S. epidermidis* ATCC 35984 (LGC Standards GmbH, Germany) béta-laktámra érzékeny, illetve béta-laktamáz pozitív, meticillin rezisztens törzsét használtuk fel. Kontroll törzsként *Bacillus subtilis* ATCC 6633 törzsét alkalmaztuk (Becton-Dickinson, USA).

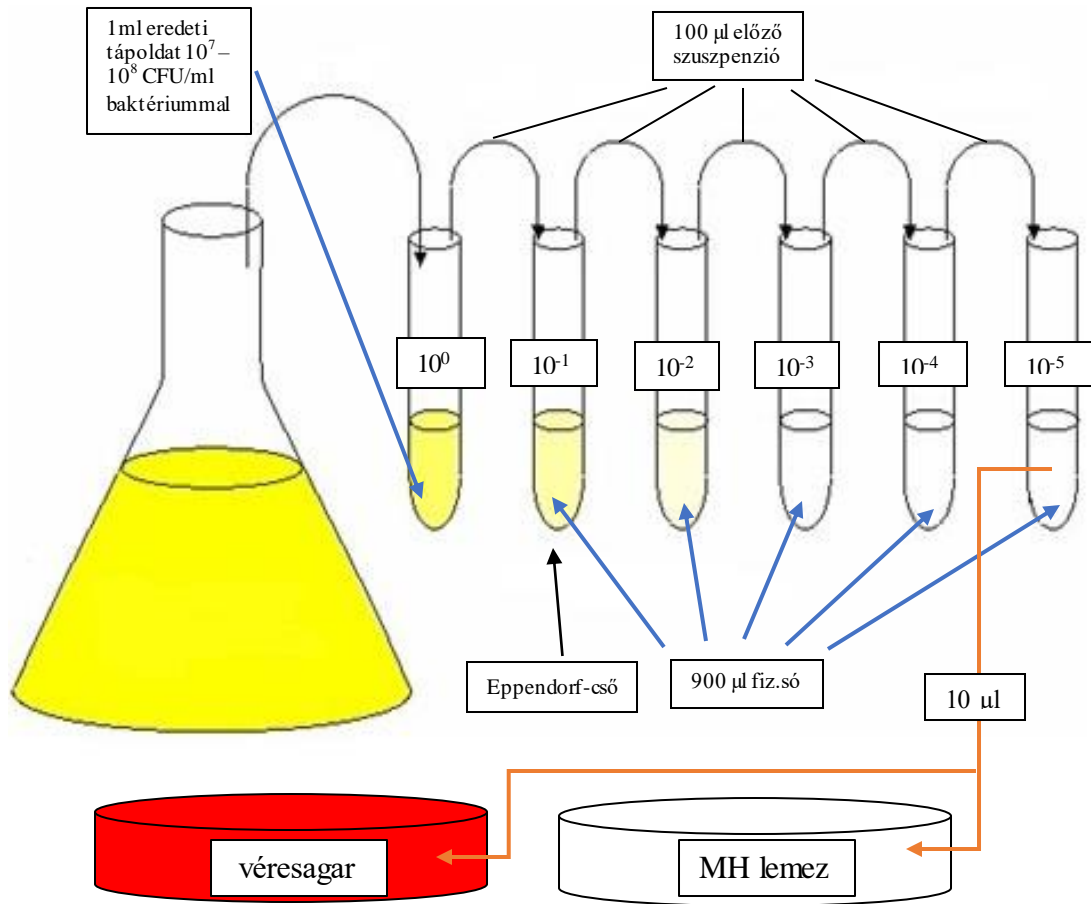
A biofilm képzés fenotípusos vizsgálatához pozitív kontroll törzsként *S. aureus* ATCC 12600 (LGC Standards GmbH, Germany) törzsét, negatív kontrollként *S. epidermidis* ATCC 12228 (LGC Standards GmbH, Germany) törzsét használtuk.

A biofilm képzés fenotípusos vizsgálatához és biofilm képzést gátló, hatékony antibiotikum kombinációk meghatározásához 60 különböző klinikai mintából izolált *P. aeruginosa* törzset használtunk fel, melyek a Magyar Honvédség Egészségügyi Központ Mikrobiológiai Laboratóriumából (MHEK-ML) származtak. A klinikai minták a következők voltak: orrváladék, trachea aspirátum, vizelet, széklet, sebváladék, ascites, illetve hemokultúra.

### 6.4. *A baktérium csíraszámának meghatározása*

#### 6.4.1. **Hígítási módszer**

A tápoldatok csíraszámának az idő függvényében mért dinamikus csökkenését hígítási módszerrel demonstráltuk. A kiinduló baktériummennyiséget tartalmazó tápoldatokból hígítási sorokat készítettünk Eppendorf-csövekben a következő módon: 100 µl eredeti szuszpenzióhoz mindig 900 µl fiziológiás sóoldatot adtunk. A hígítást ötször ismételtük meg, így a legutolsó dilúció mértéke 5 nagyságrend. Párhuzamosan 10 µl szuszpenziót vettünk ki minden rendszerből a kezdeti időpontban ( $T_0$ ), illetve 2, 4, 6, 12 és 24 óra elteltével ( $T_2$ ,  $T_4$ ,  $T_6$ ,  $T_{12}$ ,  $T_{24}$ ), amelyekből véres és MH agaron tenyészetet (pázsitot) készítettünk (3. ábra).



**3. ábra:** Csíraszám meghatározása hígítási módszerrel

A tenyészeteket 24 órára 37 °C-on, normál légterű termosztátba helyeztük. Az inkubálást követően a táptalajokon a telepeket megszámoltuk. A kapott telepképző egységek számából ( $CFU_{hT}$ ) hígítási egyenlet alapján megadtuk az eredeti tápoldatban, az adott időpontban található baktériumok számát ( $CFU_T$ ):

$$\frac{x}{\frac{10^5}{100}} = y$$

ahol  $x$  az eredeti, tömény tápoldat csíraszámát az adott időpontban ( $CFU_T$ ), illetve  $y$  a hígítás után a szilárd táptalajon megszámolt telepképző egységek száma az adott időpontban ( $CFU_{hT}$ ).

#### 6.4.2. Optikai denzitáson alapuló módszer

A tápoldatok kiindulási csíraszámának beállítása McFarland-mérő (BD PhoenixSpec, Becton-Dickinson, USA) készülék denzitometriás elvei alapján történt (215, 216). 0,5 McFarland egység felelt meg  $10^7$  és  $10^8$  CFU/ml (colony forming unit/ml) közötti baktérium mennyiségnek. TSB dúsító oldatból pipettával  $\mu$ l nagyságrendű szuszpenziót adott térfogatú fiziológiás sóoldatot tartalmazó kémcsőbe mértünk. A kémcső lemerése McFarland készülékkel történt, majd a baktérium tartalmát egészen 0,5-ös érték eléréséig módosítottuk. A kapott szuszpenziót fotométerrel (PR3100, BioRad Hungary Ltd, Hungary) OD (optikai denzitás) = 0,3 mellett, 578 nm hullámhosszon hitelesítettük.

A viaszkorongok hatóanyagleadás vizsgálatához szükséges kezdő csíraszám beállítását, előzőleg elkészített CFU/OD<sub>578</sub> kalibrációs görbék segítségével, szintén denzitometriás módszerrel végeztük.

#### 6.5. *Különböző antibiotikumok minimális gátló koncentrációjának meghatározása mikrodilúciós módszerrel*

A Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) és a National Committee Of Clinical Laboratory Standard (NCCLS) ajánlásainak megfelelően (217) kationnal kiegészített MH levest (BioRad Hungary Ltd, Hungary) mértünk a mikrotitráló lemez vájulatába 0,1 ml végtérfogatban a piperacillin/tazobaktám, ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, gentamicin, amikacin, netilmicin, tobramycin, ciprofloxacín, levofloxacín, clarithromycin (porampulla, Sigma-Aldrich Ltd., Hungary) MIC értékeinek meghatározásához. A hígítási sorozatot úgy terveztük meg, hogy a kiinduló koncentráció a várható MIC-értéknél 3-4-szer nagyobb, illetve a sorozat utolsó hígításának koncentrációja a várható legkisebb MIC-értéknél 3-4-szer kisebb legyen.

## 6.6. *Különböző tápoldatok vancomycin koncentrációjának meghatározása biológiai módszerrel*

Különböző tápoldatokban eltérő időpontokban észlelhető az antibiotikum koncentrációkat papírkorong módszerrel határoztuk meg. Vancomycin (1 grammos porampulla, Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA) csökkenő hígítási sorozatát tartalmazó BHI (brain-heart-infusion), TG (tioglikolát), MH leves II (BioRad Hungary Ltd, Hungary) és fiziológias sóoldatokat állítottunk be. Ezzel párhuzamosan *S. epidermidis* ATCC 35984 törzsből (LGC Standards GmbH, Germany) baktérium pázsítot készítettünk. A tenyészet közepére helyezett szűrőpapírkorongra az antibiotikus dilúciókból rendre 5 µl-et cseppentettünk. A tenyészeteket 37°C-on, normál légterű termosztátban 24 órán keresztül inkubáltuk, majd másnap leolvastuk a szűrőpapírkorong körül kialakult gátlási zóna méretét. Ezt követően a vancomycin csökkenő hígítási sorához hozzárendeltük az adott koncentráción létre jövő gátlási zónák átmérőjét, majd elkészítettük az összefüggéshez tartozó kalibrációs görbét.

## 6.7. *Staphylococcus epidermidis* növekedési kinetikájának vizsgálata

A baktérium növekedési kinetika méréséhez a következő rendszereket készítettük el. Üveg kémcsövekbe egyenként 10 - 10 ml BHI, TG, MH leves és fiziológias sóoldatot mértünk, majd mindegyikbe vancomycin 0,125 - 8 µg/ml tova futó hígított mennyiségét kevertük. Minden tápoldatba 0,5 McFarland egységnyi,  $10^7$  -  $10^8$  CFU/ml baktériumot inokuláltunk. A kapott rendszereket 37 °C-on normál légterű inkubátorba helyeztük ( $T_0$ ), majd 2, 4, 6, 12 és 24 óra elteltével 10 µl szuszpenziót vettünk ki a minden rendszerből ( $T_2$ ,  $T_4$ ,  $T_6$ ,  $T_{12}$ ,  $T_{24}$ ). A kivett egységnyi szuszpenziókból hígítási sorokat készítettünk öt nagyságrend mértékben. A maximálisan hígított szuszpenziókból MH szilárd táptalajokon baktérium pázsítot készítettünk. A tenyészeteket 24 órára 37 °C-on, normál légterű termosztátba helyeztük. Az inkubálást követően a táptalajokon a telepeket megszámoltuk. Pozitív növekedési kontrollként hatóanyagmentes, baktériummal beoltott BHI, MH leves II tápoldatokat és kontroll fiziológias sóoldatot használtunk.



## 6.8. Viaszkorongok antibakteriális hatásának vizsgálata

A viaszkorongok *S. epidermidis* kifejtett baktériumölő képességét (idővel arányos baktérium ölési görbe, time-kill curve, TKC) *in vitro* módon, a növekedési kinetikához hasonlóan vizsgáltuk.

Módszerünkhöz használt négyféle Wax1 viaszkorong (Cera alba : Precirol® : Vaselinum album 45 : 45 : 10 arányú elegye) és négyféle Wax2 viaszkorong (Cera alba : Precirol® 50 : 50 arányú elegye) vancomycin tartalma rendre 0,5, 1, 2 és 4 mg volt, így összesen 2x4 félé, korong alakú viaszos-vancomycines rendszer állt rendelkezésünkre.

BHI-be 0,5 McFarland egységnyi,  $10^7$  -  $10^8$  CFU/ml *S. epidermidis* (ATCC 35984) baktériumot inokuláltunk, majd Wax1 és Wax2 viaszkorongokat elhelyeztük a tápoldatokban. A rendszer összeállításától ( $T_0$ ) számított meghatározott időpontokban (2, 4, 6, 24 és 48 óra múlva), normál légterű termosztátban 37 °C-on történt inkubálást követően mindegyik oldatunkból öt nagyságrend mértékben hígítási sorozatot készítettünk, majd 10 µl mennyiséget oltottunk MH lemezre (pázsit készítés). Az így elkészített kultúrákat 24 óráig 37 °C-on, normál légterű termosztátban inkubáltuk, majd az inkubálási idő elteltével telepszámlálást végeztünk. A telepek számából következtettünk a csíraszám változására.

Pozitív növekedési kontrollként korongmentes - ezáltal hatóanyagmentes - baktériummal beoltott BHI tápoldatot használtunk.

## 6.9. Viaszkorongok antibiotikum leadásának vizsgálata szilárd táptalajon

A DDS baktériumölő képességét szilárd táptalajon az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok analógiájaként, Wax1 és Wax2 viaszkorongok körül kialakuló gátlási zónák mértékével jellemeztük. Az *in vitro* vizsgálathoz az előbbieken megadott összetételű Wax1 és Wax2 viaszkorongok 0,5, 1, 2 és 4 mg vancomycint tartalmazó változatait használtuk fel.

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatokból vett elv alapján (Bauer-Kirby módszer) az antibiotikum impregnált viaszkorongokat a frissen szélesztett *S. epidermidis* tenyészetek közepébe helyeztük (218). A tenyészeteket 24 órára 36 °C-on termosztátba helyeztük. Másnapra a viaszkorongok a vancomycin tartalomtól és a viaszűrűségétől függően eltérő nagyságú gátlási zónát hoztak létre. Az inkubáció kezdetétől számított 24, 48, 96 és 144 óra múlva olvastuk le a gátlási zónák átmérőjét, majd ezt követően 3 naponta további leolvasást terveztünk. A gátlási zóna szélességét mm-ben adtuk meg (vonalzó). Abban az esetben, ha nem egyenletes (nem szabályos) a gátlási zóna, akkor a legnagyobb átmérő mentén mért értéket vettük alapul.

### *6.10. Viaszkorongok antibiotikum leadásának vizsgálata folyékony közegben*

A viaszkorongok antibiotikum leadásának dilúciós módszerrel történt vizsgálata során ismételtén, az előzőekben megadott összetételű, Wax1 és Wax2 viaszkorongok 0,5, 1, 2 és 4 mg vancomycint tartalmazó változatait használtuk fel.

Wax1 és Wax2 viaszkorongokból a folyékony táptalajba kioldódó antibiotikum mennyiségét a következő módon mértük: a rendszer összeállításától ( $T_0$ ) számított meghatározott időpontokban (1, 2, 4, 6, 24, 48 és 72 óra múlva) az oldatokból egységnyi mennyiségeket *B. subtilis* ATCC 6633 törzséből (Becton-Dickinson, USA) készített pázsitra helyezett szűrőpapírkorongokra cseppentettük. 24 órás, 37°C hőmérsékleten történt inkubálást követően megmértük a szűrőpapír korong körül létrejött gátlási zóna méretét. Ezt követően a gátlási zónák átmérőinek és az antibiotikum koncentrációk között összefüggést analizáltuk.

### *6.11. Biofilm képzés fenotípusos vizsgálata*

A vizsgálathoz Beenken K.E és munkatársai által kidolgozott metodika szerint TSB-t (Sigma-Aldrich, UK) és 0,25 % glükóz tartalmú TSB-t (g25-TSB) használtunk (219). A glükózzal kiegészített oldat elkészítését követően (10 ml TSB-be 140 µl 1 M-os glükóz) a vizsgálandó törzsek szintenyészetéből 3-3 ml TSB-be és g25-TSB-be oltottunk, majd az így kapott szuszpenziókat 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk.

Másnap minden szuszpenzióból 200-szoros hígítást végeztünk TSB és g25-TSB oldat felhasználásával, majd minden mintából 200-200 µl-t vittünk fel 96 lyukú mikrotiter lemez (polystyrene microtiter plate, PMP) (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest) mélyedéseibe. Mintánként két párhuzamost készítettünk. A lemezeket 37 °C-on, normál légterű termosztátban inkubáltuk 24 órán át. Ezt követően 8 csatornás pipetta segítségével minden mélyedést kétszer foszfát-pufferrel oldattal (PBS, Sigma-Aldrich Ltd., Budapest) átmostuk. A mosás után a kitapadt sejteket 200 µl etanollal fixáltuk 5 percig. Az etanol leszívását követően 8 csatornás pipettával 100 µl 0,1 %-os safranint vittünk fel a lemeze mélyedéseibe és 2 percig festettük a képződött biofilmet, majd ismét PBS-sel mostuk a mélyedéseket kétszer egymás után. A biofilm kvantitatív becsléséhez először 100-100 µl abszolút etanolt adtunk a mélyedésekbe, és a lemezeket 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután pipettával minden mélyedésből 50 µl-t steril mikrotiter lemezre vittünk át. Végül 492 nm-en PR3100 spektrofotométeren (BioRad Hungary Ltd, Hungary) olvastuk le az abszorbancia értékeket.

### *6.12. A minimális biofilm gátló koncentráció meghatározása*

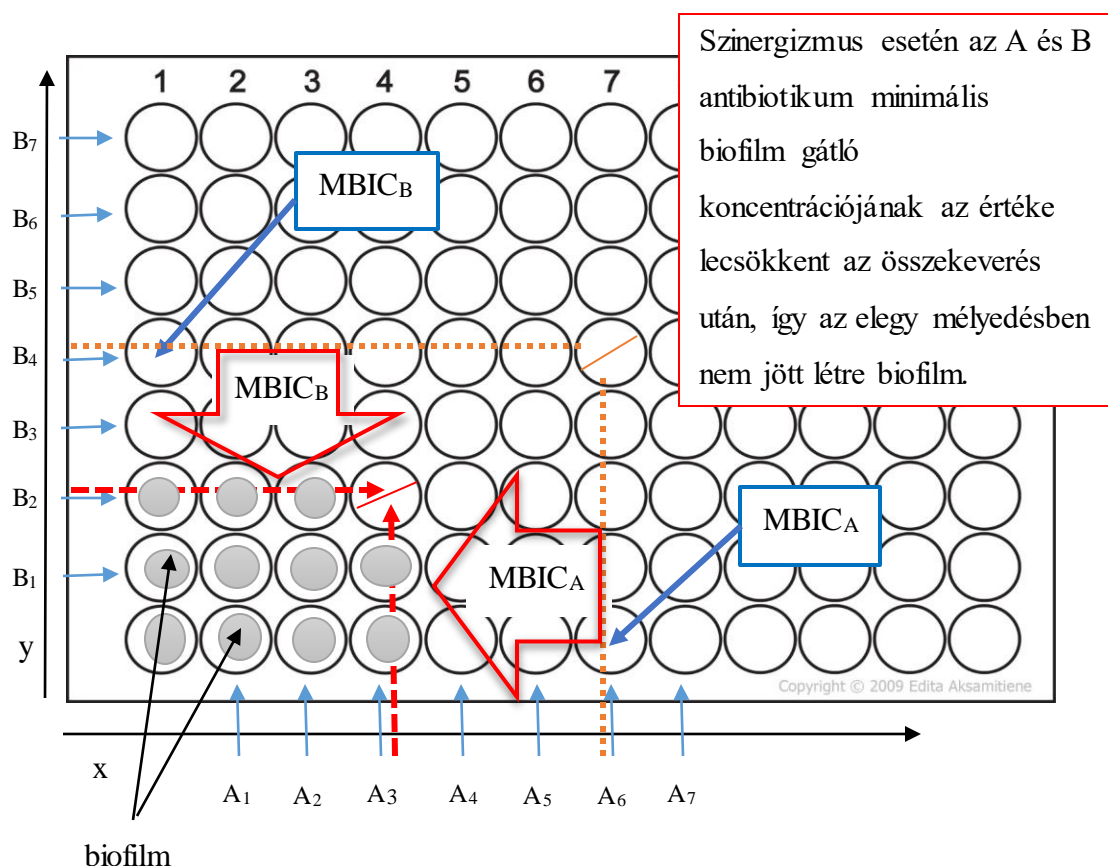
A minimális biofilm gátló koncentráció (MBIC) meghatározásához szintén a mikrodilúciós módszert használtuk, majd a mikrotiter lemez mélyedéseiben lévő antibiotikus oldatokban a fenotípusos vizsgálatnál ismertett módon inokuláltuk a baktériumokat, majd inkubálást, fixálást és festést követően megvizsgáltuk a biofilm képzést.

### 6.13. Frakcionált biofilm gátló koncentráció és a frakcionált gátló koncentráció index meghatározása

A frakcionált biofilm gátló koncentráció (FBIC) és frakcionált gátló koncentráció index (FIC-index) meghatározásához 12féle antibiotikumból (piperacillin/tazobaktám, ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, gentamicin, amikacin, netilmicin, tobramycin, ciprofloxacín, levofloxacín, chlorithromycin (porampulla, Sigma-Aldrich Ltd., Hungary) minden esetben kiválasztottunk kettőt (A és B), melyekből a CLSI ajánlása alapján hígítási sorozatot készítettünk ( $A_{1-x}$ ,  $B_{1-y}$ ) legalább a fél MIC értéktől kétszeres MIC értékig 50 µl MH leves tápoldatban 96 lyukú mikrotiter lemez (polystyrene microtiter plate, PMP) (Sigma-Aldrich Ltd., Budapest) mélyedéseibe az X és Y tengelynek megfelelően (a lemez hosszabb és rövidebb oldala) (4. ábra).

Ezt követően az egymásnak megfelelő dilúciók szerint a lemez köztes mélyedéseibe összeállítottuk az A és B antibiotikum kombinációját. 100 µl tápoldatban *P. aeruginosa* kezdő csíraszámát  $5 \times 10^5$  CFU/ml-nek határoztuk meg, majd ezeket a szuszpenziókat hozzáadtuk a mikrotiter lemez vájulataiban lévő antibiotikumot tartalmazó MH leves tápoldatokhoz. A mikrotiter lemezeket ezt követően normál légterű termosztátban, egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk.

Másnap a lemezek mélyedéseiben a fenotípusos vizsgálatnál ismertett módon safraninos festést végeztünk. Ha az antibiotikum kombináció nem gátolta a baktériumok biofilm képzését, eredményként jól látható filmréteg jött létre. Kontrollként a mikrotiter lemezek sarkaiba mindkét antibiotikum legnagyobb koncentrációjú oldatát állítottuk be.



**4. ábra:** Kétféle antibiotikum szinerfizmusának meghatározása

A  $\Sigma$ FBIC (FIC-index) kiszámítása a következőképpen történt:

$FBICA = MBICA(c) / MBICA(a)$  és  $FBICB = MBICB(c) / MBICB(a)$ , majd

$\Sigma FBIC = FBICA + FBICB$

Magyarázat: A, B: a kétféle antibiotikum; (c), (a): a megfelelő antibiotikum kombinációban (combination), illetve önmagában (alone).

A  $\Sigma$ FBIC (FIC-index) lehetséges értéke alapján az antibiotikum kombináció a következő hatást fejtheti ki: szinerfizta ( $\Sigma FBIC \leq 0,5$ ); részlegesen szinerfizta ( $0,5 < \Sigma FBIC \leq 1$ ); indifferens ( $1 < \Sigma FBIC \leq 4$ ); antagonistista ( $4 < \Sigma FBIC$ )

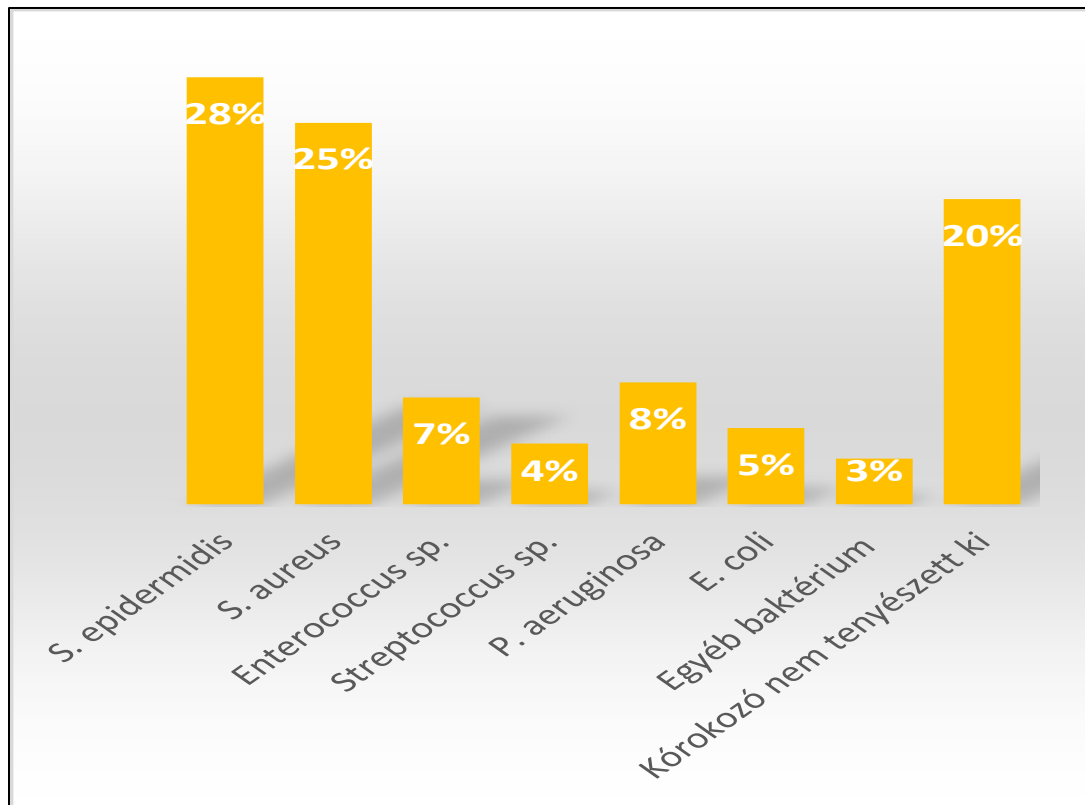
#### 6.14. Statisztikai számítások

A tápoldatokban és a fiziológias sóoldatban tapasztalt baktérium ölési görbéket korrelációs együttható kiszámításával hasonlítottuk össze. Az ölési görbék kinetikájának vizsgálatakor a statisztikai analízishez többszörös lineáris regressziós modellt (General Linear Model, GLM) használtuk. Minden csoportot Fischer-féle teszt (least significant difference, LSD) teszt segítségével hasonlítottuk össze. Mind két esetben  $p \leq 0,05$  eltérés szignifikáns volt. A viaszkorongok által kifejtett, folyékony közegben tapasztalt baktériumölő képesség és az egyes tápoldatokban, illetve a fiziológias sóoldatban tapasztalt csíraszám csökkenés összehasonlításához kétmintás t-próbát használtunk  $p \leq 0,05$ , szignifikáns). A vancomycin leadás vizsgálatakor a hatóanyag felszabadítás mértékét a kiindulási értékhez képest szintén GLM segítségével analizáltuk ( $p \leq 0,05$ , szignifikáns). A vancomycin csúcskoncentrációk összehasonlítását kétszemponos varianciaanalízissel (ANOVA-teszt) végeztük, ahol  $p \leq 0,05$ , szignifikáns volt.

## 7. Eredmények

### *7.1. A posztoperatív protézisfertőzések kórokozó spektrumának retrospektív epidemiológiai vizsgálata*

Az epidemiológiai vizsgálat szempontjából fontos adatokat Microsoft Office Excel (Microsoft Magyarország KFT, Hungary) táblázatban összesítettük és a program statisztikai moduljának segítségével grafikonon ábrázoltuk (5. ábra). Az epidemiológiai vizsgálat során 2001 és 2011 között összesen 221 tenyésztési eredményt vizsgáltunk meg. A protézis gennyesedések 64 %-áért Gram-pozitív törzsek voltak felelősek, ezen belül az infekciók 53 %-át Staphylococcus törzsek okozták. A legtöbb esetben *S. epidermidis* tenyésztett ki a műtéti területből és a sebváladékból (28 %) (6. ábra). *S. aureus* 25 %-ban okozott infekciót. A *P. aeruginosa*, mely általunk gyakran izolált nozokomiális kórokozó, a mi vizsgálatunkban csak 8 %-ban volt felelős az ortopédiai fertőzésekért.



**5. ábra:** A Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján 2001 és 2011 között regisztrált ortopédiai protézis fertőzések kórokozó spektruma



**6. ábra:** *S. epidermidis* tenyésztete MH és véres agaron (saját felvétel). A MH lemezagaron és a véres agar jobb felén a SE-OK 06112 jelzésű *S. epidermidis* törzs tenyésztete látható. A véres agar bal felén az *in vitro* kísérletekhez használt *S. epidermidis* ATCC 35984 számú törzs telepei láthatóak.



## 7.2. Minimális gátló koncentráció meghatározása

A 14 biofilm képző, *P. aeruginosa* klinikai izolátum a ceftazidimmal, imipenemmel és amikacinnal szemben érzékenynek bizonyult: ceftazidim MIC<sub>50</sub> = 4 µg/ml, MIC<sub>90</sub> = 32 µg/ml; imipenem MIC<sub>50</sub> = 4 µg/ml, MIC<sub>90</sub> = 16 µg/ml; amikacin MIC<sub>50</sub> = 4 µg/ml, MIC<sub>90</sub> = 32 µg/ml.

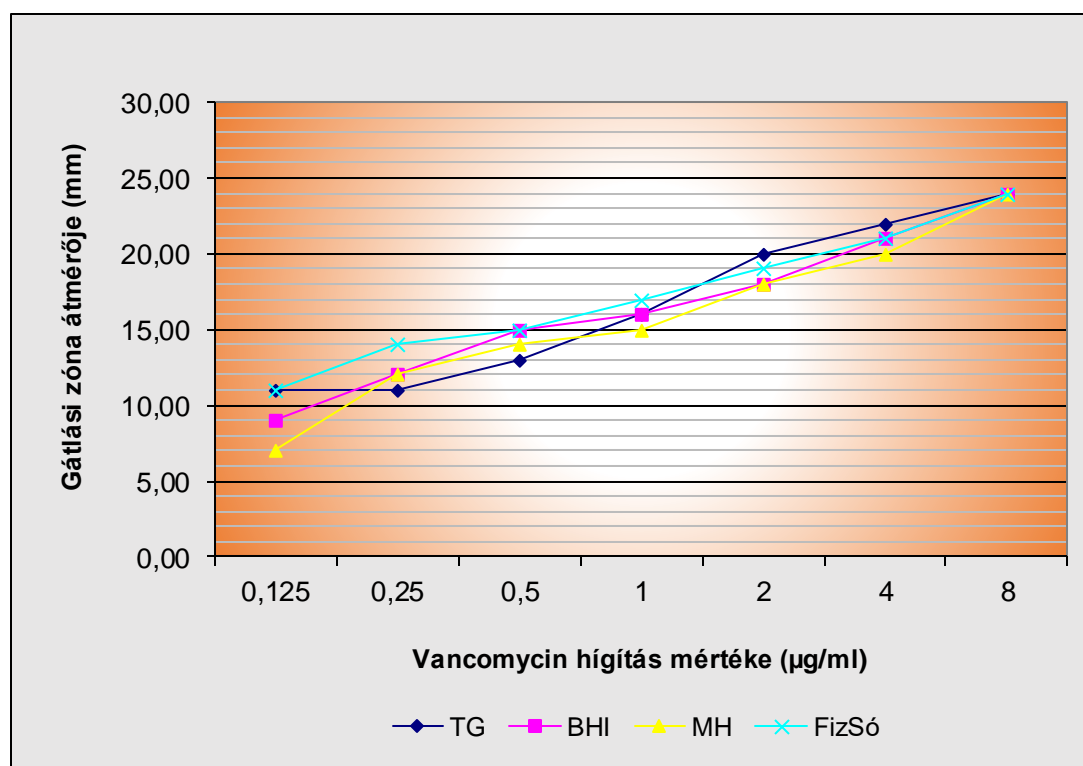
A 14 *P. aeruginosa* törzs a piperacillin/tazobaktám és a clarithromycin antibiotikumokkal szemben rezisztensnek bizonyult: piperacillin/tazobaktám MIC<sub>50</sub> = 1024 µg/ml, MIC<sub>90</sub> = 1024 µg/ml; clarithromycin MIC<sub>50</sub> = 256 µg/ml, MIC<sub>90</sub> > 1024 µg/ml. Az átlagolt MIC értékeket az 5. táblázat tartalmazza.

### 5. táblázat: MIC értékek 14 biofilm képző *P. aeruginosa* törzs esetében

Antibiotikumok	Átlag MIC (µg/ml)		
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Intervallum
Piperacillin/tazobaktám	1024	1024	128–1024
Ceftazidim	4	32	2–1024
Cefepim	8	32	2–64
Imipenem	4	16	0,5–128
Meropenem	16	32	2–64
Ciprofloxacín	256	512	8–1024
Levofloxacín	32	62	2–256
Amikacin	4	32	2–1024
Gentamicin	128	256	1–256
Tobramycin	128	512	2->1024
Netilmicin	4	>256	1->256
Clarithromycin	256	>1024	32->1024

### 7.3. Különböző tápoldatok vancomycin koncentrációjának meghatározása

A kalibrációs görbe segítségével meghatároztuk az eltérő vancomycin koncentrációkhoz tartozó gátlási zónák átmérőjét. BHI és MH leves II közegben 2 µg/ml vancomycin koncentrációhoz tartozó gátlási zóna átmérője 18 mm volt. Fiziológias sóoldat esetében 2 µg/ml vancomycin koncentráció mellett 19 mm átmérőjű gátlási zónát mértünk. TG tápoldat és fiziológias sóoldat esetén 0,125 µg/ml vancomycin koncentráció mellett a szűrőpapírkorong körül nem alakult ki gátlási zóna. BHI és MH tápoldatok esetén 0,125 µg/ml koncentráció mellett a szűrőpapírkorong körül 10 mm feletti gátlási zóna alakult ki. 0,25, 0,5 és 1 µg/ml vancomycin hígítás mellett mind a négy tápoldat esetén a szűrőpapírkorong körül 10 és 18 mm közötti átmérőjű gátlási zóna alakult ki.



7. ábra: Az eltérő vancomycin koncentrációkhoz tartozó gátlási zónák átmérőjének a vizsgálata különböző tápoldatokban

#### 7.4. *Staphylococcus epidermidis* növekedési kinetikájának vizsgálata

Különböző tápoldatokban (MH leves, BHI, TG, fiziológiás sóoldat) meghatározott vancomycin koncentráció mellett a *S. epidermidis* ATCC 35984 törzsének növekedési kinetikáját vizsgáltuk. A csíraszám változásának tízes alapú logaritmusát grafikonon az idő függvényében ábrázoltuk. Kontrollként vancomycin mentes tápoldatokat használtunk.

MH leves II. közegben 0,125 µg/ml vancomycin koncentráció mellett a csíraszám kiindulási értékről 24 óra alatt 2,30 log<sub>10</sub> CFU/ml értékig csökkent. Hasonló csökkenést észleltünk 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml és 1 µg/ml vancomycin koncentráció esetén. Vancomycin 2, 4 és 8 µg/ml koncentrációja mellett a csíraszám 24 óra alatt 2,00 log<sub>10</sub> CFU/ml érték alá csökkent. A K (kontroll) esetében a csíraszám kezdeti növekedését, majd mérsékelt csökkenését tapasztaltuk (8. ábra).

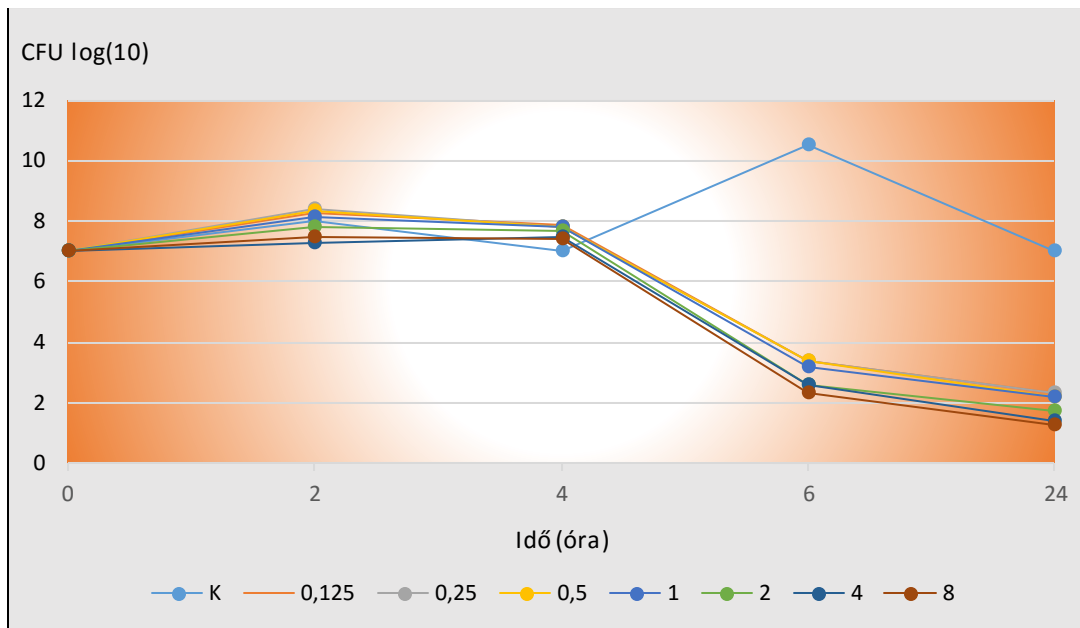
BHI-ben 0,125, 0,5 és 1 µg/ml vancomycin koncentrációnál 24 óra elteltével a csíraszám 2,00 log<sub>10</sub> CFU/ml felett maradt. 2 és 4 µg/ml vancomycin koncentráció mellett a csíraszám 24 óra elteltével 2,00 log<sub>10</sub> CFU/ml alá csökkent, míg 8 µg/ml esetén az inkubálási periódus végén az oldat csíraszám 0,95 log<sub>10</sub> CFU/ml. A kontroll oldatban a baktériumok kezdeti növekedését majd a csíraszám enyhe fokú csökkenését tapasztaltuk (9. ábra).

TG esetében 24 óra alatt a csíraszám az antibiotikum 8 µg/ml koncentrációja mellett csökkent 2,00 log<sub>10</sub> CFU/ml érték alá. Minden más koncentráció esetén 24 óra elteltével a csíraszám 2,00 log<sub>10</sub> CFU/ml felett maradt. A TG kontroll oldatában a baktériumok MH leves II kontroll oldatához hasonló növekedési kinetikáját észleltünk (10. ábra).

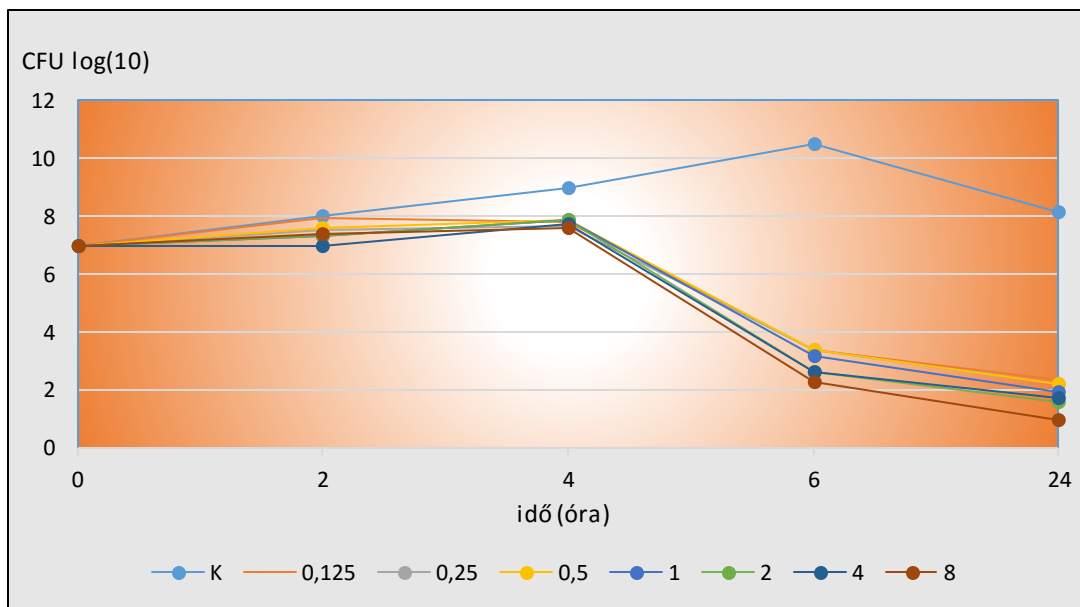
Fiziológiás sóoldatban 0,125 és 0,25 µg/ml vancomycin koncentráció esetén a csíraszám 3,00 log<sub>10</sub> CFU/ml körüli értékig csökkent. 0,5 és 1 µg/ml vancomycin koncentráció mellett a csíraszám 2,00 log<sub>10</sub> CFU/ml alá csökkent, míg 2 µg/ml antibiotikum koncentráció esetén 24 óra elteltével 2,00 log<sub>10</sub> CFU/ml koncentráció értéket mértünk. 4 µg/ml koncentráció esetén a csíraszám 1,00 log<sub>10</sub> CFU/ml alatti értékig csökkent, míg 8 µg/ml esetén 24 óra alatt az összes baktérium elpusztult a tápoldatban.

A kontroll fiziológiás sóoldat a többi kontroll oldathoz képest a csíraszám drasztikusabb csökkenését észleltük (11. ábra).

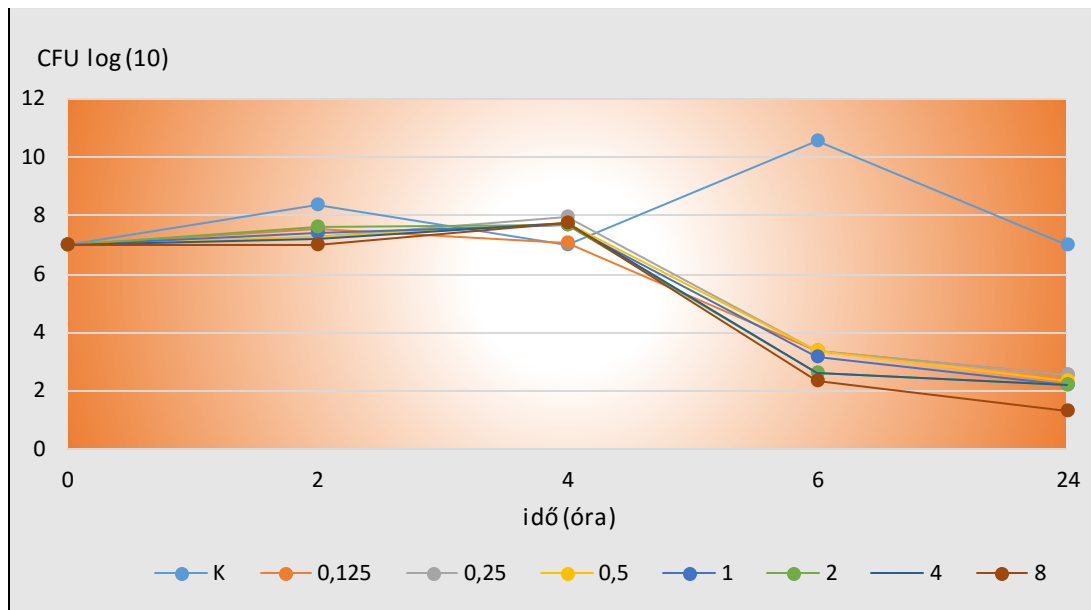
Az MH leves és TG tápoldatok csíraszám csökkentő kinetikája és a fiziológiás sóoldatban észlelt csíraszám csökkenés mértéke között pozitív, rendkívül szoros ( $r \geq 0,9$ ) korrelációt tapasztaltunk ( $r_{\text{fiz.só, MH}} = 0,96$ ,  $r_{\text{fiz.só, TG}} = 0,93$ ), míg BHI és fiziológiás sóoldat között pozitív, szoros korrelációt ( $0,75 \leq r < 0,9$ ) figyeltünk meg ( $r_{\text{fiz.só, BHI}} = 0,89$ ). MH tápoldatban 2, 4 és 8  $\mu\text{g/ml}$  vancomycin koncentráció mellett a baktériumok kezdeti növekedési fázisa elmaradt, plató fázist követően 4 óra elteltével drasztikus csíraszám csökkenést észleltünk. BHI és TG tápoldatokban a kezdeti növekedési fázis mind a hat vancomycin koncentráció esetén minimális volt, nem érte el az egy nagyságrendnyi mértéket. Fiziológiás sóoldatban a baktériumok az első 2 órában nagyobb mértékben indultak növekedésnek, mint a tápoldatok esetében, azonban a 2. és 4. óra között már észleltük a deklinációs fázist. A csíraszám csökkenés a fiziológiás sóoldatban a tápoldatokhoz képest egyenletesebbnek bizonyult. Hatóanyagmentes, kontrol BHI tápoldatban észleltük a *S. epidermidis* legintenzívebb szaporodását. Vancomycin mentes fiziológiás sóoldatban a baktériumok száma 24 óra elteltével a kiindulási csíraszám alá csökkent.



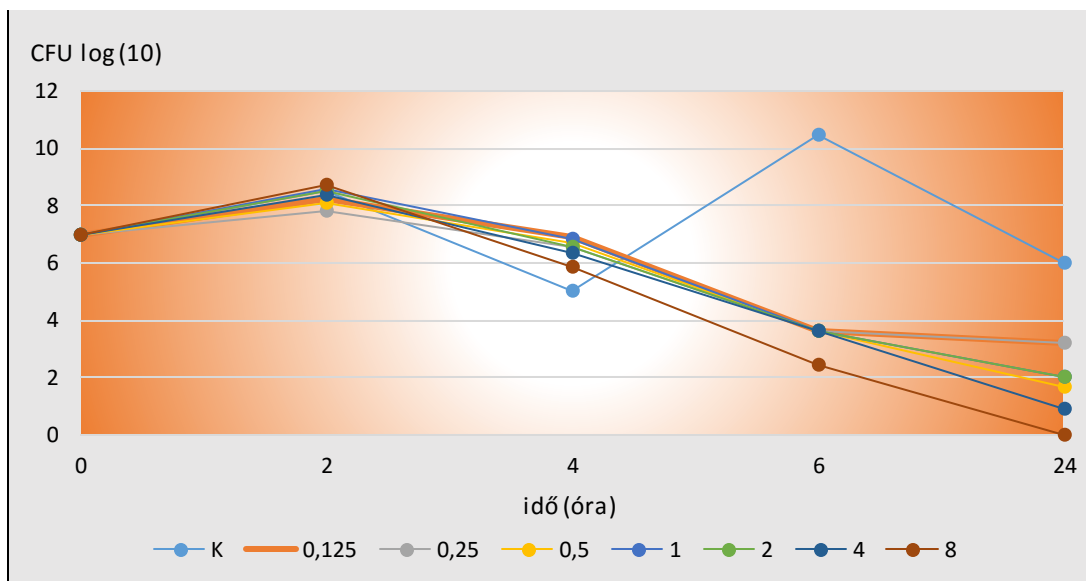
**8. ábra:** *S. epidermidis* növekedési kinetikája MH leves II tápoldatban eltérő vancomycin koncentrációk (0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml) mellett. K (kontroll) esetén az oldat nem tartalmazott antibiotikumot.



**9. ábra:** *S. epidermidis* növekedési kinetikája BHI tápoldatban eltérő vancomycin koncentrációk (0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml) mellett. K (kontroll) esetén az oldat nem tartalmazott antibiotikumot.



**10. ábra:** *S. epidermidis* növekedési kinetikája TG tápoldatban eltérő vancomycin koncentrációk (0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml) mellett. K (kontroll) esetén az oldat nem tartalmazott antibiotikumot.



**11. ábra:** *S. epidermidis* növekedési kinetikája fziológias sóoldatban eltérő vancomycin koncentrációk (0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml) mellett. K (kontroll) esetén az oldat nem tartalmazott antibiotikumot.

## 7.5. Viaszkorongok antibakteriális hatásának vizsgálata

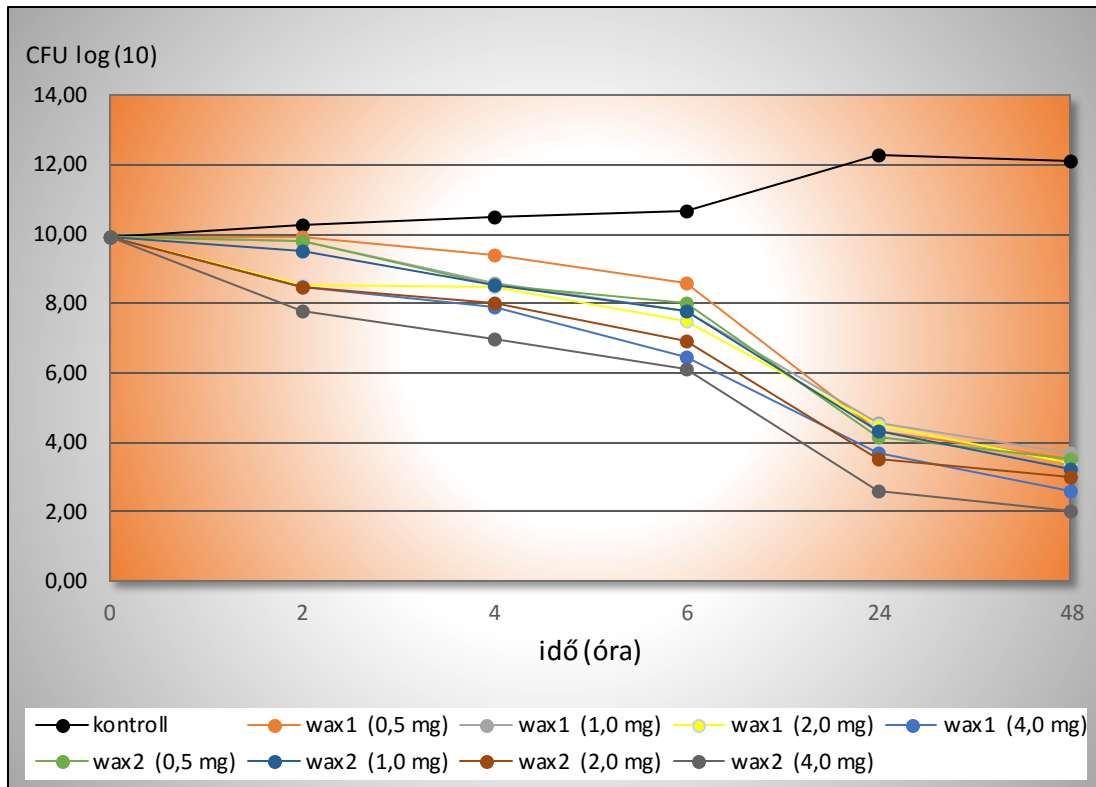
Vizsgálatunkhoz Wax1 és Wax2 viaszkorongok különböző vancomycin tartalmú változatait (0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 4 mg), és *S. epidermidis* ATCC 35984 számú törzsét használtuk fel. A növekedési kinetika leolvasása az inkubálás megkezdését követő 2, 4, 6, 24. és 48. órában történt.

0,5 mg vancomycin tartalmú Wax1 viaszkorong mellett a csíraszám a kezdeti 9,9 log<sub>10</sub> CFU/ml-ről történő csökkenését tapasztaltuk, 48 órás inkubálást követően a csíraszám 3,53 log<sub>10</sub> CFU/ml volt. 1 mg vancomycint tartalmazó Wax1 viaszkorong esetében az inkubálási periódus után 3,72 log<sub>10</sub> CFU/ml csíraszámot mértünk. 2 mg vancomycin tartalom mellett 48 óra elteltével 3,39 log<sub>10</sub> CFU/ml, míg a 4 mg vancomycin esetében 2,60 log<sub>10</sub> CFU/ml volt záró csíraszám érték.

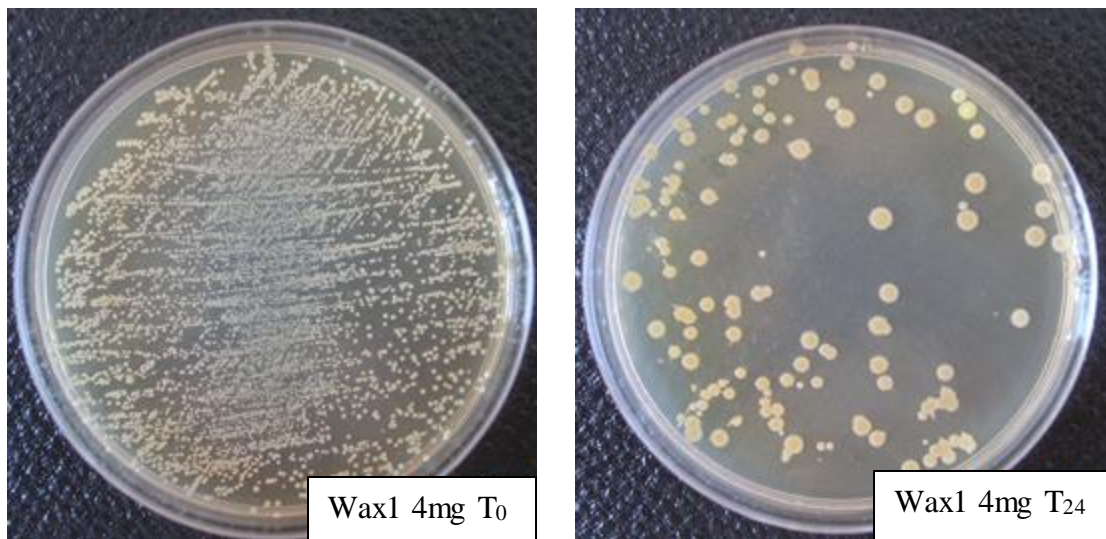
Wax2 viaszkoron eltérő antibiotikum tartalmú típusainak alkalmazása során a csíraszám csökkenés a következőképpen alakult: 0,5 mg vancomycin esetén 3,53 log<sub>10</sub> CFU/ml, 1 mg vancomycin koncentrációt esetén 3,26 log<sub>10</sub> CFU/ml, 2 mg vancomycin esetében 3,00 log<sub>10</sub> CFU/ml, 4 mg vancomycin tartalom mellett pedig 2,00 log<sub>10</sub> CFU/ml csíraszám értéket észleltünk 48 óra elteltével.

Kontrollként használt dúsító táptalajban a kezdeti 9,9 log<sub>10</sub> CFU/ml csíraszám folyamatos növekedését tapasztaltuk.

A növekedési kinetika vizsgálata alapján Wax1 és Wax2 viaszkorongok esetében a baktérium csíraszám folyamatos csökkenését észleltük BHI-ben (12. 13. és 14. ábra). A legerősebb antibakteriális hatást a Wax2 viaszkorong 4mg vancomycint tartalmazó változata fejtette ki. 2 óra elteltével a csíraszám több mint két nagyságrenddel csökkent, míg ilyen mértékű csökkenést a többi esetben nem tapasztaltunk. Wax1 viaszkorong 0,5 mg vancomycint tartalmazó változata esetében a csíraszám hat óra elteltével is 8,00 log<sub>10</sub> CFU/ml felett maradt. Kezdeti növekedési, illetve plató fázist egyik korong esetében sem figyeltünk meg.

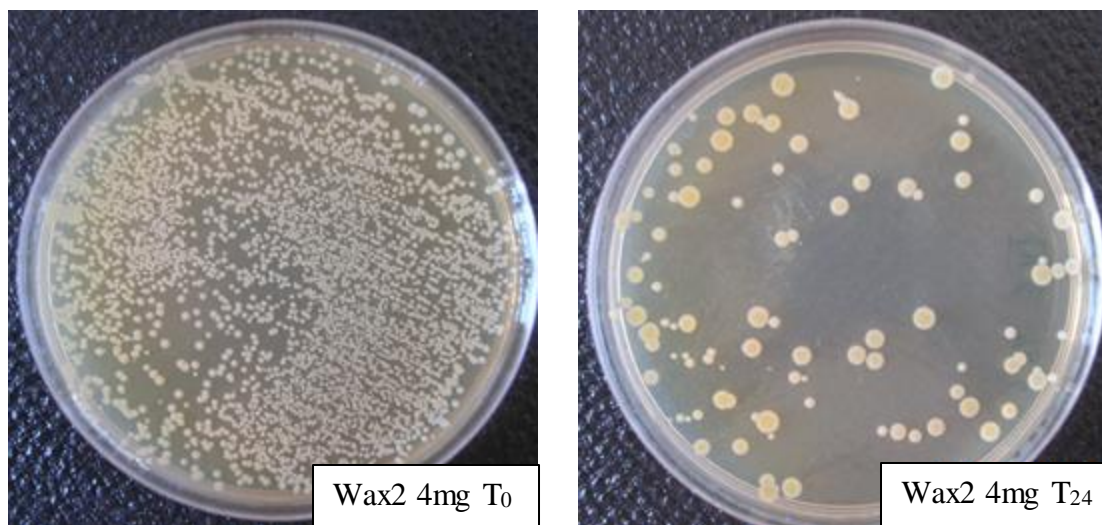


**12. ábra:** Csíraszám csökkenése eltérő vancomycin tartalmú Wax1 és Wax2 viaszkorongok esetében az idő függvényében



**13. ábra:** Telepek számának csökkenése 4mg vancomycint tartalmazó Wax1 viaszkorong esetében MH táptalajon  $10^5$  hígításnál

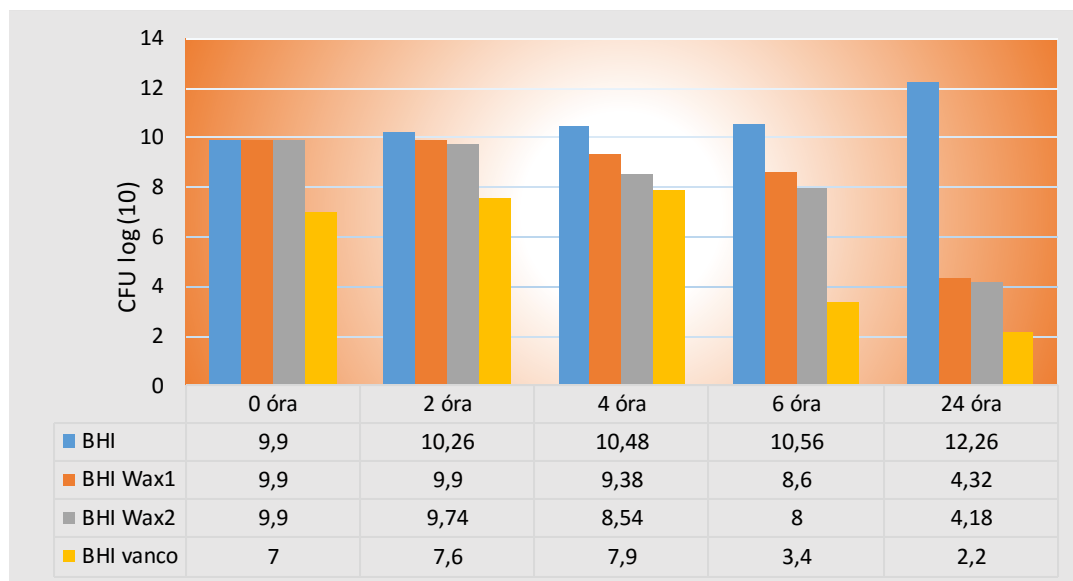




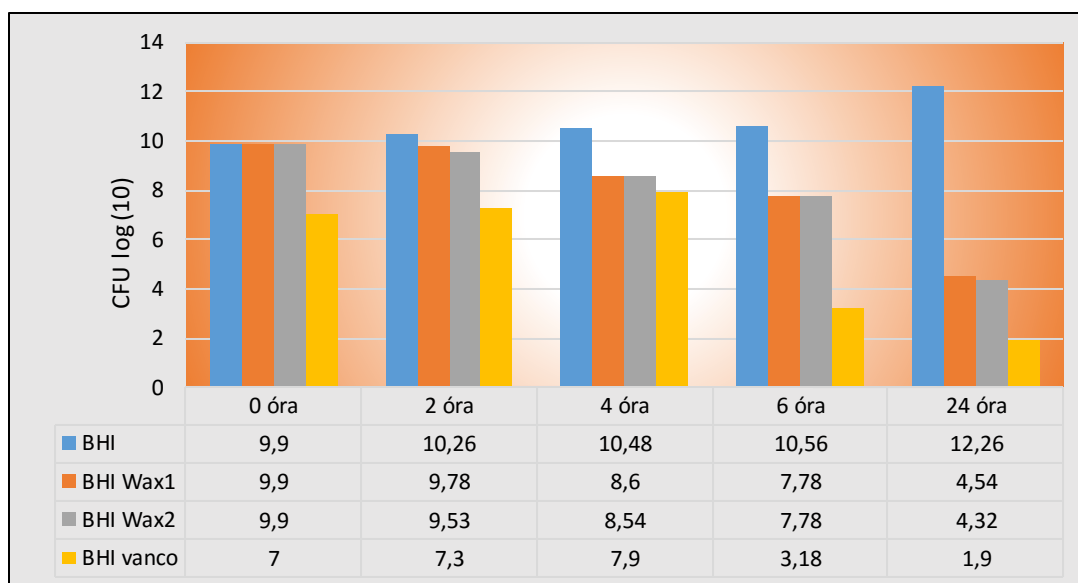
**14. ábra:** Telepek számának csökkenése 4mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong esetében MH táptalajon  $10^5$  hígításnál (saját felvétel)

Azonos vancomycin tartalmú Wax1 és Wax2 viaszkorongok baktérium ölési kinetikája, a *S. epidermidis* vancomycint nem tartalmazó BHI tápoldatban detektált növekedési kinetikája és a BHI vancomycines oldatában mért csíraszám csökkenés közötti összefüggést a 15. 16. 17. és 18. ábra mutatja. Wax2 viaszkorong 4 mg vancomycint tartalmazó változatának BHI-s oldatában 4 óra elteltével a szabad vancomycint tartalmazó oldathoz képest jelentősebb – majdnem egy nagyságrenddel nagyobb csíraszám csökkenést detektáltunk. A többi viaszkorong oldatában a szabad vancomycint tartalmazó oldatokhoz képest 4 óra elteltével magasabb csíraszámot detektáltunk. Az 1 és 2 mg vancomycint tartalmazó viaszkorongok oldata esetében 6 óra elteltével, 0,5 mg vancomycint tartalmazó változatok esetében a 24. óra elteltével következett be jelentősebb csíraszám csökkenés.

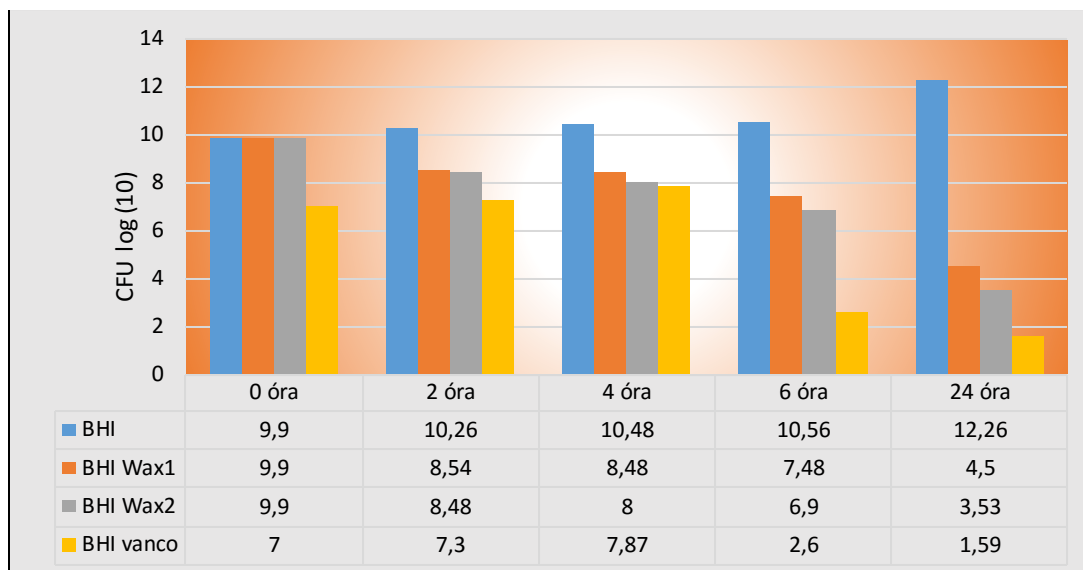
Az ölési görbe kinetikájának statisztikai analízise alapján a csíraszámváltozásban szignifikáns különbség mutatkozott a kontroll oldat és az összes viaszkorongot tartalmazó oldat között ( $p = 0,01$  minden esetben). 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong esetében a többi rendszerhez képest szignifikánsabb csíraszám csökkenést észleltünk ( $p = 0,05$ ). A többi, eltérő antibiotikum tartalmú Wax1 és Wax2 között nem volt szignifikáns különbség ( $p = 0,37$ ).



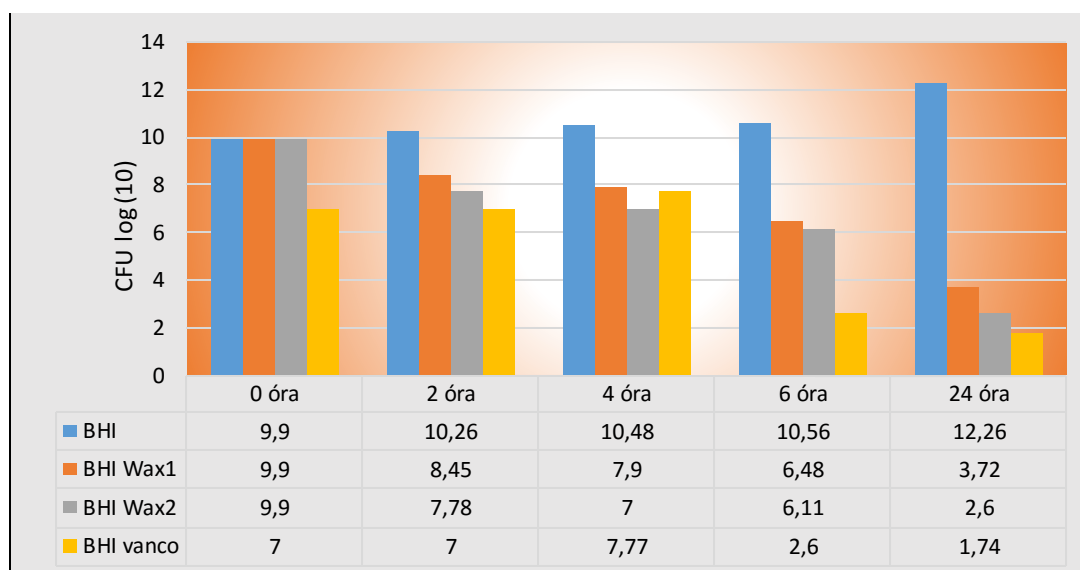
**15. ábra:** Wax1 és Wax2 viaszkorongok baktérium ölési kinetikája 0,5 mg vancomycin tartalom esetén a kontroll tápoldathoz viszonyítva. BHI: csak tápoldatot tartalmazó oldat, BHI Wax1 és BHI Wax2: viaszkorongok BHI-s oldata, BHI vanco: tápoldat vancomycines oldata



**16. ábra:** Wax1 és Wax2 viaszkorongok baktérium ölési kinetikája 1 mg vancomycin tartalom esetén a kontroll tápoldathoz viszonyítva. BHI: csak tápoldatot tartalmazó oldat, BHI Wax1 és BHI Wax2: viaszkorongok BHI-s oldata, BHI vanco: tápoldat vancomycines oldata



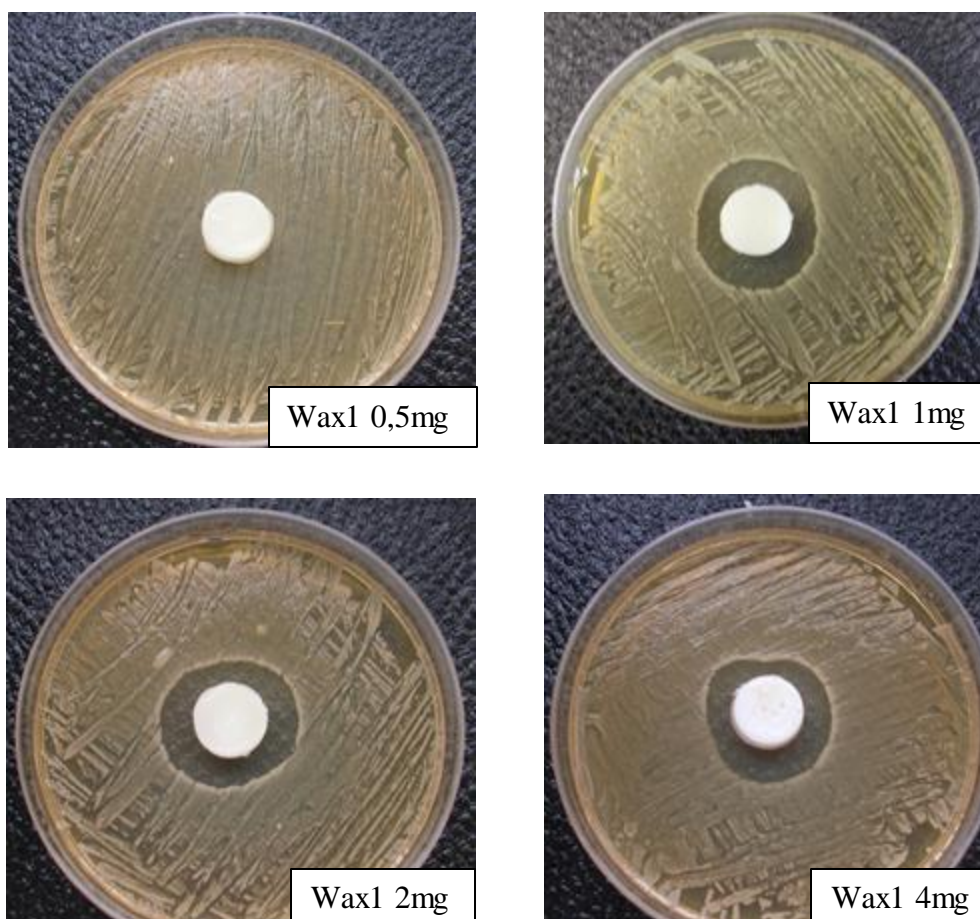
**17. ábra:** Wax1 és Wax2 viaszkorongok baktérium ölési kinetikája 2 mg vancomycin tartalom esetén a kontroll tápoldathoz viszonyítva. BHI: csak tápoldatot tartalmazó oldat, BHI Wax1 és BHI Wax2: viaszkorongok BHI-s oldata, BHI vanco: tápoldat vancomycines oldata



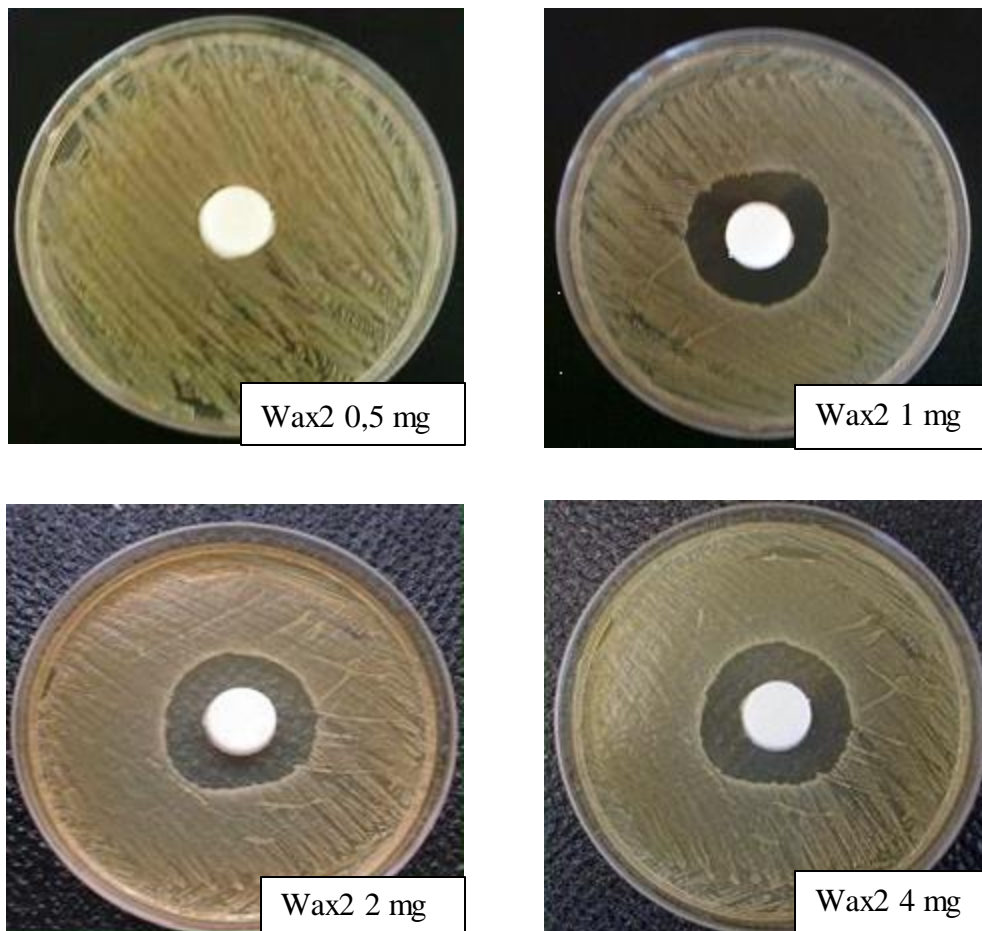
**18. ábra:** Wax1 és Wax2 viaszkorongok baktérium ölési kinetikája 4 mg vancomycin tartalom esetén a kontroll tápoldathoz viszonyítva. BHI: csak tápoldatot tartalmazó oldat, BHI Wax1 és BHI Wax2: viaszkorongok BHI-s oldata, BHI vanco: tápoldat vancomycines oldata

## 7.6. Viaszkorongok vancomycin leadásának vizsgálata szilárd táptalajon

Szilárd táptalajon a viaszkorongok a vancomycin tartalomtól és a viaszsűrűségétől függően eltérő nagyságú gátlási zónát hoztak létre. Wax1 és Wax2 típusú viaszkorongok 0,5 mg vancomycin tartalom mellett nem hoztak létre gátlási zónát. 1 mg antibiotikum tartalom esetén mind két korong típus 18 mm-nél nagyobb gátlási zónát hozott létre. 2 és 4 mg esetén a gátlási zóna meghaladta a 25 mm-t. A gátlási zónákban új telepek megjelenését (vancomycin rezisztens törzsek kisselektálódását) nem figyeltük meg. A gátlási zónák 6 napon keresztül fennmaradtak (19. és 20. ábra).



**19. ábra:** Gátlási zónák mérete 0,5, 1, 2 és 4mg vancomycint tartalmazó Wax1 viaszkorong esetében (saját felvétel)



**20. ábra:** Gátlási zónák mérete 0,5, 1, 2, és 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong esetében (saját felvétel)

## 7.7. Viaszkorongok vancomycin leadásának vizsgálata folyékony közegben

A kétféle viaszkorong inkubálása során a tápoldatban mért különböző vancomycin koncentrációk értékei a 6. táblázatban láthatóak. Általánosságban elmondható, hogy a Wax2 viaszkorongból a vancomycin kioldódás hamarabb bekövetkezett (szignifikáns különbség,  $p = 0,0134$ ). Emellett a vancomycin leadás függött a hatóanyagtartalomtól is: nagyobb vancomycin dózist tartalmazó viaszkorong esetében hamarabb észleltük az antibiotikum jelenlétét a dúsító közegben. A vancomycin koncentráció és az inkubációs idő között szignifikáns összefüggést tapasztaltunk ( $p = 0,000001$ ). A dúsító közegben 2 esetben mértünk szignifikáns vancomycin csúcskoncentrációt a Wax1 és Wax2 viaszkorongok összehasonlítása során. A csúcskoncentráció Wax1 viaszkorong 0,5mg vancomycint tartalmazó változata esetében 0,25  $\mu\text{g/ml}$ , míg Wax2 viaszkorong 4 mg vancomycint tartalmazó változata esetében 1  $\mu\text{g/ml}$  volt. Más esetben a kioldódás során mért vancomycin koncentrációk nem mutattak szignifikáns különbséget Wax1 és Wax2 esetében. ( $p = 0,0914$ ). A dúsító közegben a Wax2 viaszkorong 4 mg vancomycint tartalmazó változata esetében mért antibiotikum csúcskoncentráció szignifikáns különbséget mutatott a 0,5, 1 és 2 mg vancomycint tartalmazó korongoknál mért antibiotikum koncentrációhoz képest ( $p = 0,0184$ ). A 4 mg vancomycin tartalom a folyékony közegben a megfigyelés időintervalluma alatt egyenletesen 1  $\mu\text{g/ml}$  vancomycin koncentrációt biztosított. A 0,5, 1 és 2 mg vancomycint tartalmazó korongok között a kioldódott hatóanyag koncentrációban szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk ( $p = 0,1675$ ).

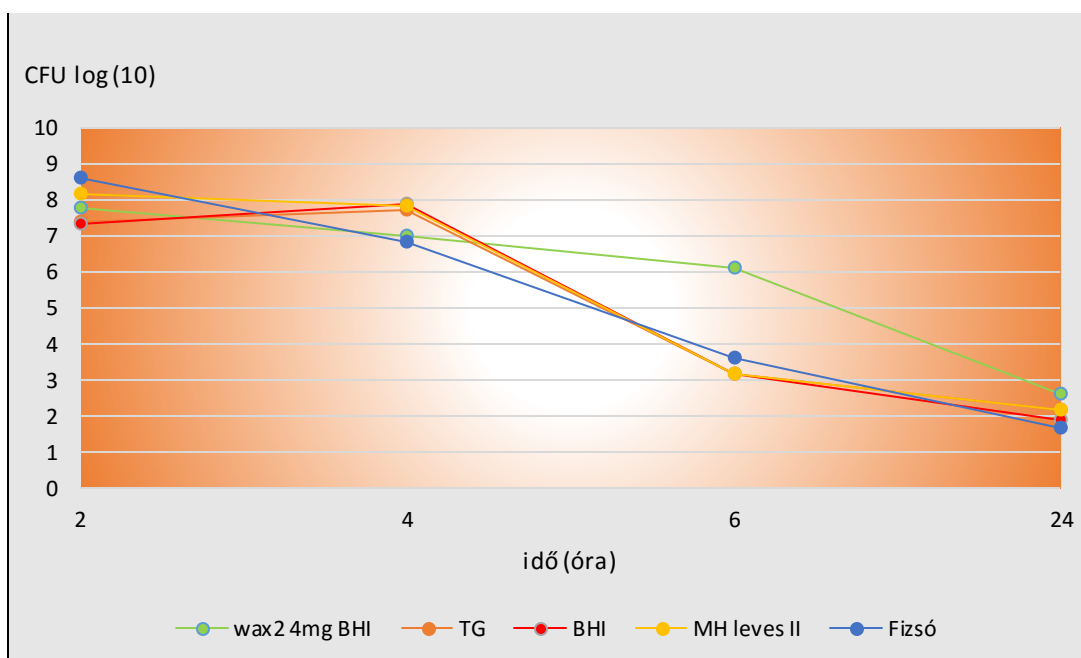
A 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong és az 1  $\mu\text{g/ml}$  vancomycin koncentrációt tartalmazó különböző tápoldatok (TG, BHI, MH leves II, fiziológiás sóoldat) *S. epidermidis* ATCC 35984 számú törzsének növekedési kinetikájára kifejtett hatásának az összehasonlítását a 21. ábra mutatja be. A viaszkorong BHI-s oldatának csíraszám csökkentő hatása és a különböző tápoldatok csíraszám csökkentős hatása között pozitív, szoros korreláció igazolódott ( $r_{\text{wax2 4mg, TG}} = 0,84$ ,  $r_{\text{wax2 4mg, BHI}} = 0,85$ ,  $r_{\text{wax2 4mg, MH}} = 0,85$ ). A viaszkorong oldata és fiziológiás sóoldat között rendkívül szoros, pozitív korrelációt figyeltünk meg ( $r_{\text{wax2 4mg, fiz.só}} = 0,91$ ). A Wax2 viaszkorong 4 mg vancomycint

tartalmazó típusának és az 1 µg/ml vancomycin koncentrációt tartalmazó különböző tápoldatok *S. epidermidis* növekedési kinetikájára kifejtett hatása között szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk ( $p_{\text{wax2 4mg, TG}} = 0,4$ ,  $p_{\text{wax2 4mg, BHI}} = 0,39$ ,  $p_{\text{wax2 4mg, MH}} = 0,56$ ,  $p_{\text{wax2 4mg, fiz.só}} = 0,39$ ).

**6. táblázat:** BHI-ben mért vancomycin koncentrációk a kioldódást követően

Inkubációs idő	Wax1 0,5 mg	Wax2 0,5 mg	Wax1 1 mg	Wax2 1 mg	Wax1 2 mg	Wax2 2 mg	Wax1 4 mg	Wax2 4 mg
1 óra	ND	ND	ND	ND	0,1	0,15	0,2	0,44
2 óra	ND	0,15	0,1	0,125	0,125	0,2	0,2	0,44
4 óra	<0,1	0,15	0,1	0,15	0,15	0,25	0,25	0,44
6 óra	0,1	0,2	0,175	0,2	0,25	0,5	0,7	0,7
24 óra	0,25	0,25	0,175	0,25	0,25	0,7	0,7	1
48 óra	0,25	0,28	0,175	0,25	0,25	0,7	0,7	1
72 óra	0,25	0,28	0,175	0,25	0,25	0,7	0,7	1

ND: no data (nincs adat)



**21. ábra:** 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong és az 1 µg/ml vancomycin koncentrációt tartalmazó különböző tápoldatok *S. epidermidis* növekedési kinetikájára kifejtett hatásának összehasonlítása

### 7.8. Biofilm képzés fenotípusos vizsgálata

A 60 klinikai *P. aeruginosa* izolátumból 14 (23.3 %) bizonyult biofilm képzőnek. A bakteriális biofilm safraninnal történt festése a 22. ábrán látható.



**22. ábra:** *P. aeruginosa* biofilm képzésének igazolása safraninos festési eljárással. A mélyedésekben lila elszíneződés jelzi a biofilm létrejöttét (Pesti Józsefné felvétele).

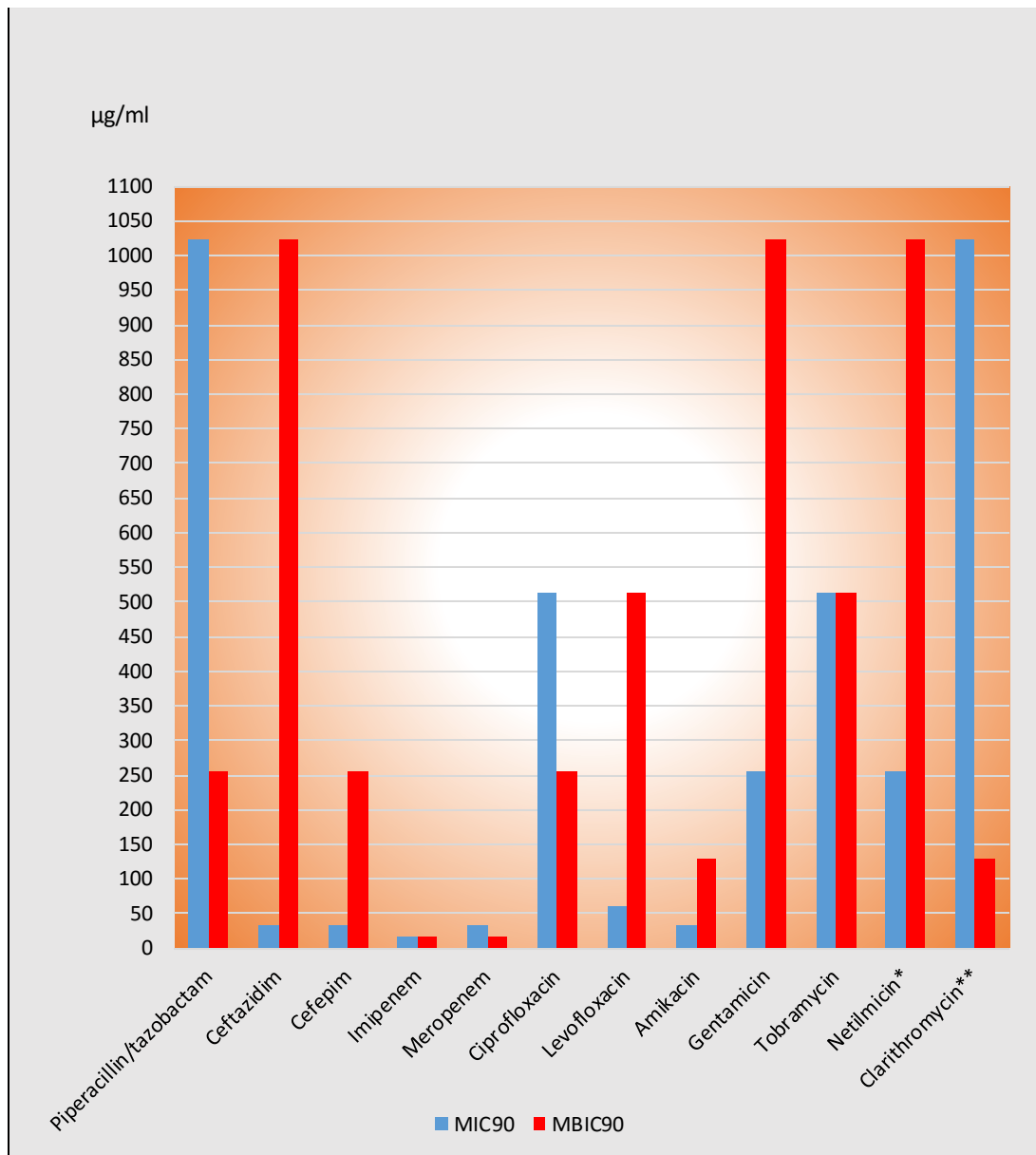


### 7.9. Minimális biofilm képzést gátló koncentráció meghatározása

A biofilm képző *P. aeruginosa* izolátumok MBIC<sub>50</sub> és a MBIC<sub>90</sub> értékeit a 7. táblázat mutatja. Három antibiotikum bizonyult effektív biofilm képzést gátló vegyületnek: meropenem, piperacillin/tazobaktám és a clarithromycin. A három említett antibiotikum esetében mértük a legalacsonyabb MBIC<sub>50</sub> értéket. Cefepim, imipenem, levofloxacin, amikacin, gentamicin és tobramycin MBIC<sub>90</sub> értéke legalább kétszerese volt a MIC<sub>50</sub>-nek, ceftazidim és netilmicin esetében a különbség 256-szoros volt. Az MBIC piperacillin/tazobaktám, ciprofloxacinn és clarithromycin esetében legalább kétszer kisebb volt MIC-nél. Piperacillin/tazobaktám esetében MBIC<sub>50</sub> 512-szer alacsonyabb volt, mint a MIC<sub>50</sub>. A MIC és MBIC értékek összehasonlítása a 21. ábrán látható.

7. táblázat: MBIC értékek 14 biofilm képző *P. aeruginosa* törzs esetében

Antibiotikumok	Átlag MBIC (µg/ml)		
	MBIC <sub>50</sub>	MBIC <sub>90</sub>	Intervallum
Piperacillin/tazobaktám	2	256	<1–1024
Ceftazidim	32	1024	8–1024
Cefepim	16	256	0,5–256
Imipenem	16	16	4–32
Meropenem	8	16	1–16
Ciprofloxacinn	16	256	<1–256
Levofloxacin	128	512	8–1024
Amikacin	32	128	8–1024
Gentamicin	128	1024	8–1024
Tobramycin	128	512	64–1024
Netilmicin	512	1024	4–1024
Clarithromycin	18	128	8–1024



\* Netilmicin esetében MIC<sub>90</sub> > 256 µg/ml

\*\* Clarithromycin esetében MIC<sub>90</sub> > 1024 µg/ml

**23. ábra:** Antibiotikumok átlag MIC és MBIC értékeinek összehasonlítása 14 biofilm képző *P. aeruginosa* törzs esetében

### 7.10. A frakcionált biofilm gátló koncentráció és frakcionált gátló koncentráció index meghatározása

Az antibiotikum kombinációkhoz tartozó FIC indexek értékeit a 8. táblázat tartalmazza. *P. aeruginosa* izolátumok közül nyolc törzs – 373, 534, 536, 639, 1248, 1462, 1554, 1560 számú – esetében tapasztaltuk a vizsgált antibiotikumok szinergizmusát (13,3 %). Néhány kivételtől eltekintve, fluorokinolonok clarithromycinnel történt kombinálása esetén a fluorokinolonok FIC index értékei alacsonyak voltak. Clarithromycin-levofloxacin kombináció szinergistának bizonyult a nyolc törzsből hat esetben (75 %). Ciprofloxacin és makrolid kombinációja szintén szinergizmust mutatott a törzsek felével szemben. Cefazidimmal történt ciprofloxacin kombináció esetén is ugyanezt az arányt tapasztaltuk. Az aminoglikozidok clarithromycinnel történt kombinálása szintén szinergista hatást igazolt. Az aminoglikozid antibiotikumokra nagyon alacsony FIC-indexek voltak jellemzőek. A nyolc biofilm képző törzs esetében az antibiotikum kombinációk hatás-megoszlása a 9. táblázatban látható. Antagonista hatás érvényesült clarithromycin-meropenem és clarithromycin-cefepim esetében a biofilm képző törzsek 62.5 % és 75 %-ában.

8. táblázat: 8 biofilm képző *P. aeruginosa* törzshöz tartozó FIC-index értékek

	Klinikai izolátumok FIC-indexei										
	373	534	536	639	1248	1462	1554	1560			
Antibiotikum kombinációk	0,07	2	0,19	9	2	2	0,19	0,08			
clarithromycin-ciprofloxacín	1,06	0,2	0,38	0,31	0,51	1	0,31	0,19			
clarithromycin-levofloxacín	0,07	2	8	9	2	2	1,06	16			
clarithromycin-meropenem	8,06	2	16	9	2	2	8,06	32,06			
clarithromycin-ceftazidim	0,31	0,13	4,13	2,06	0,04	1,13	0,06	4,06			
clarithromycin-cefepim	8,06	0,51	16	16	2	17	32,06	128,06			
clarithromycin-amikacín	2,06	8	0,25	1,06	2	1	0,19	0,19			
clarithromycin-tobramycin	2,06	0,26	0,63	2,06	0	0,26	4,02	0,09			
clarithromycin-netilmicin	4	0,51	1,13	2,06	0,02	1,25	0,06	0,56			
clarithromycin-gentamicin	4,06	0,26	16,25	8	0,07	0,26	0,31	0,31			

**9. táblázat:** Antibiotikum kombinációk effektivitásának megoszlása 8 biofilm képző *P. aeruginosa* törzs esetében

	Szinergista		Additív		Indifferens		Antagonista	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Antibiotikum kombinációk	4	50	0	x	3	37,5	1	12,5
clarithromycin-ciprofloxacín	6	75	2	25	0	x	0	x
clarithromycin-levofloxacín	1	12,5	1	12,5	3	37,5	3	37,5
clarithromycin-imipenem	0	0	0	x	3	37,5	5	62,5
clarithromycin-meropenem	4	50	0	x	3	37,5	1	12,5
clarithromycin-ceftazidim	1	12,5	0	x	1	12,5	6	75
clarithromycin-cefepim	3	37,5	2	25	2	25	1	12,5
clarithromycin-amikacin	5	62,5	0	x	3	37,5	0	x
clarithromycin-tobramycin	4	50	0	x	4	50	0	x
clarithromycin-netilmicin	5	62,5	0	x	1	12,5	2	25

n: baktérium törzsek száma

x: nem mérhető

### 7.11. Eredmények összefoglalása

1. Az epidemiológiai vizsgálatunk során igazolódott, hogy a protézis gennyeseések több mint 50 %-át *Staphylococcus* törzsek okozták. A fertőzések 28 %-áért *S. epidermidis* volt felelős, *S. aureus* 25 %-ban okozott infekciót. A *P. aeruginosa* törzseket a fertőzések 8 %-ában izoláltunk.
2. *S. epidermidis* esetén, a kalibrációs görbét figyelembe véve 18 mm átmérőjű gátlási zónához tartozó vancomycin koncentráció értéke 2 µg/ml volt MH leves II és BHI tápoldatokban. A vancomycin a *S. epidermidis*re kifejtett csíraszám csökkentő hatása mind a három tápoldat esetében jól korrelált a fiziológiás sóoldatban tapasztaltakhoz.
3. A tápoldatba helyezett, 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong esetében a többi rendszerhez képest szignifikáns csíraszám csökkenést észleltünk ( $p = 0,05$ ). A többi, eltérő antibiotikum tartalmú Wax1 és Wax2 viaszkorongok csíraszám csökkentő hatása között nem volt szignifikáns különbség ( $p = 0,37$ ). 4 óra elteltével 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong oldatában észlelt csíraszám csökkenés a többi viaszkorongos oldatban és a szabad vancomycint tartalmazó tápoldatban tapasztaltakhoz képest egy nagyságrenddel nagyobb volt.
4. Folyékony közegben (BHI) Wax2 viaszkorongból a vancomycin kioldódás hamarabb bekövetkezett (szignifikáns különbség,  $p = 0,0134$ ). A dúsító közegben 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong mellett mért antibiotikum csúcs koncentráció szignifikáns különbséget mutatott a 0,5, 1 és 2 mg vancomycint tartalmazó korongoknál mért antibiotikum koncentrációhoz képest ( $p = 0,0184$ ). A 0,5, 1 és 2 mg vancomycint tartalmazó korongok között a kioldódott hatóanyag koncentrációjában szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk ( $p = 0,1675$ ). Wax1 és Wax2 korongok MH táptalajon 0,5 mg vancomycin tartalom mellett nem hoztak létre gátlási zónát. 1 mg, 2 mg és 4 mg antibiotikum tartalom mellett mindkét típusú korong 18 mm-nél nagyobb gátlási zónát hozott létre.
5. A 60 klinikai izolátumból 14 *P. aeruginosa* törzs esetében igazoltunk biofilm képzést (23,3 %).

6. *P. aeruginosa* törzsek ceftazidim/tazobaktám kombinációval és clarithromycinnel szemben bizonyultak a legkevésbé érzékenyek: piperacillin/tazobaktám MIC<sub>50</sub> = 1024 µg/ml, MIC<sub>90</sub> = 1024 µg/ml; clarithromycin MIC<sub>50</sub> = 256 µg/ml, MIC<sub>90</sub> > 1024 µg/ml. Az MBIC piperacillin/tazobaktám és clarithromycin esetében MIC értéknél nagyságrenddel alacsonyabb volt. A 60 klinikai izolátumból 8 *P. aeruginosa* törzssel szemben tapasztaltunk a vizsgált antibiotikum kombinációk szinergizmusát (13,3 %). *P. aeruginosa* törzsekkel szemben szinergizmust tapasztaltunk clarithromycin-aminoglikozid, clarithromycin-ciprofloxacin, clarithromycin-levofloxacin és fluorokinolon-ceftazidim kombinációk esetében. Antagonista hatás érvényesült clarithromycin-meropenem és clarithromycin-cefepim kombináció alkalmazásakor.

## 8. Megbeszélés

### 8.1. A kórokozó spektrum retrospektív epidemiológiai vizsgálata

Az epidemiológiai vizsgálatunk eredményeit több európai centrum illetve klinika eredményeivel hasonlítottuk össze. A hamburgi Endo Clinic által végzett követéses vizsgálat eredményei szerint a CNS fertőzések száma duplája volt a magyarországi eseteknek (103). A németországi klinika munkacsoportja *S. aureus*-t kisebb arányban izolált (9 %) protézisekhez köthető szepszis folyamatokból. A Gram-negatív kórokozók arányában az Endo Clinic eredményeihez hasonlót tapasztaltunk.

A hazai NNSR-nek megfelelő Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) 2003-2010 közötti, 16 spanyol kórházat felölelő, multicentrumos vizsgálatának célja az volt, hogy pontosabb képet adjon a Gram-negatív baktériumok okozta PJI-k arányáról (102). Az eredményeik alapján a vizsgálat ideje alatt a Gram-pozitívok okozta PJI-k aránya 55 %-ról több mint 85 %-ra nőtt. A protézisek szepszis folyamatait 12 %-ban okozták Gram-negatív kórokozók, ezen belül az *Enterobacteriaceae* tagjainak az aránya 77 % volt. A többi Gram-negatív kórokozó okozta fertőzések háttérében nagytöbbségében *P. aeruginosa* (20 %) állt. *E. coli* infekciók aránya hasonló volt a vizsgálatunk eredményéhez, a *P. aeruginosa* okozta szepszis folyamatok aránya viszont a SE-OK-ról gyűjtött adatokhoz viszonyítva alacsonyabb volt.

Észak-Franciaországban a 2010-es évek után készült hasonló surveillance vizsgálat (101). A vizsgált évben 24 %-ban polimikrobiális PJI-t regisztráltak. Spanyolországi adatokhoz hasonlóan, polimikrobiális fertőzés esetén második kórokozóként Gram-negatív baktériumok közül a *P. aeruginosa*-t izoláltak.

Angliában 2010 és 2011 között végeztek nagy esetszámú, surveillance vizsgálatot (ECDC/SSI vizsgálat) (220). Az összegyűjtött adatok *S. aureus* vezető szerepét igazolták protézis fertőzésekben. Ez az előfordulási gyakoriság a mi munkacsoportunk és az Endo Clinic által közölt eredményekhez képest jelentősebb volt. *S. epidermidis* aránya a vizsgálatunk eredményéhez képest szintén magasabb volt, Gram-negatív okozta PJI



azonban kevesebb esetben fordult elő. Érdekes tény, hogy a szigetországban 2006-tól MRSA infekció aránya jelentősen visszaszorult.

A kiterjedt surveillance vizsgálatok eredményeihez képest a Maastricht University Medical Centre (MUMC) saját retrospektív, 28 évet felölelő vizsgálata a nemzetközi tendenciába nem illeszkedő epidemiológiai eredményekről számolt be. A vizsgálat a *P. aeruginosa* kimagasló előfordulását igazolta, emellett CNS okozta PJI-k száma rendkívül alacsony volt (122).

A célkitűzésben szereplő, saját epidemiológiai vizsgálatunk eredményeinek az európai centrumok epidemiológiai eredményeivel történő összevetését a 10. táblázat tartalmazza. Az epidemiológiai összehasonlítás korlátját az adja, hogy a 2001 és 2010 közötti intervallumban kevés európai országban folytattak hasonló vizsgálatot. Néhány ország évente végez surveillance felmérést országos szinten, így feltérképezhető az adott ország kórházaiban észlelt fertőzéses kórképek gyakorisága. Az így nyert szeptikus adatokat évente összesítik (pl: ECDC/SSI, REIPI). A hazai viszonyokat jól tükrözi, hogy számos intézmény egyáltalán nem szolgáltat adatokat az Országos Epidemiológiai Központ (OEK) által kezdeményezett éves, országos surveillance vizsgálatokhoz.

**10. táblázat: Európai centrumok és az SE-OK epidemiológiai eredményeinek összehasonlítása**

Baktérium	SE-OK	ENDO Clinic	REIPI	Dron Hospital	ECDC / SSI	MUMC
<b>Gram-pozitív</b>	<b>64%</b>	<b>72%</b>	<b>75%</b>	<b>100%*</b>	<b>87%**</b>	<b>43%**</b>
CNS	28%	55%		20%	31%	7%
<i>S. aureus</i>	25%	9%		68%	44%	35%
<i>Enterococcus</i> sp.	7%	4%		5%	12%	1%
<i>Streptococcus</i> sp.	4%	4%		7%		9%
<b>Gram-negatív</b>	<b>13%</b>	<b>5%</b>	<b>12%</b>	<b>14%*</b>		
<i>P. aeruginosa</i>	8%		2%	7%		56%
<i>Enterobacteriaceae</i>				17%		
<i>E. coli</i>	5%		3%		7%	
Egyéb, vagy kórokozó nem tenyésztett ki	23%		13%	7%	6%	11%

\*egy része polimikrobiális fertőzés

\*\**Streptococcus* sp. nélkül

## 8.2. *Staphylococcus epidermidis* növekedési kinetikájának összehasonlítása különböző tápoldatokban

A DDS hatóanyag leadás vizsgálataihoz szükség volt egy olyan folyékony közegre, ami jól modellezi a szervezetben a fiziológiás viszonyokat és tápanyagot biztosít a baktériumok számára. A *S. epidermidis* jól nő úgynevezett ínségtáptalajon (ilyen pl.: az MH). A hatóanyag leadás vizsgálat során felmerült a kérdés, hogy az alkalmazott tápoldat csökkenti-e a vancomycin hatását, illetve befolyásolja-e az antibiotikum diffúzióját a viaszos hordozórendszerből. Három dúsító táptalaj esetében a közeg nem befolyásolta a vancomycin baktériumokra gyakorolt hatását, így mind három tápoldat alkalmasnak bizonyult a szövetek közti viszonyok modellezésére. A baktériumok a megfigyelés első szakaszában mind három esetben szaporodni kezdtek, majd a szaporodó baktériumokkal szemben a vancomycin fokozatosan fejtette ki a hatását. Az antibiotikum, a fiziológiás sóoldathoz hasonló, statisztikailag is alátámasztható baktérium növekedését gátló hatását a MH leves II tápoldatban, a BHI-ben és a TG-ben egyaránt kifejtette. Tápanyag ellátottság szempontjából a BHI áll a legközelebb az élő szövetekhez, ezért az irodalmi adatok alapján ez a legelterjedtebben használt dúsító tápoldat a kioldódási vizsgálatokhoz (140, 221, 222).

### *8.3. Két eltérő összetételű, különböző vancomycin tartalmú, szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszer vizsgálata*

#### **8.3.1. A rendszer összetevői**

Az ortopédiai protézisekhez köthető infekciók megelőzésére, illetve az infekciós góc terápia lehetőségéeként kutatócsoportunk a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézetével és a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikájával közösen kezdett kifejleszteni új típusú komplex DDS-t (22. ábra). A rendszer 3 komponensből állt:

- Antibiotikum: vancomycin
- Hordozó: viasz
- Cella (mátrix): liofilizált csont



**24. ábra:** Liofilizált csont és viaszkorong (saját felvétel)

A hematogén osteomyelitis és a protézishez köthető, posztoperatív sebfertőzések esetén a parenterálisan, majd per. os. adott antibiotikumok jelentik mindennapi klinikai gyakorlatban alkalmazott bázisterápiát (11. táblázat).

**11. táblázat:** Osteomyelitis kezelése a Semmelweis Egyetem antibiotikum alkalmazási protokollja alapján (223)

Hatóanyag	Készítmény	Dózis
Hematogén osteomyelitis		
<b>MSSA esetén</b>		
flucloxacillin	Flucloxacillin	3 x 2 g iv.
vagy		
cefazolin	Cefazolin „Sandoz” 1 g por injekcióhoz	3 x 2 g iv.
vagy		
clindamycin	Dalacin 600 mg inj.	4 x 600 mg iv.
<b>MRSA gyanú esetén</b>		
vancomycin	Vancomycin-Human 1g inj.	2 x 1 g iv.
<b>Gram-negatív kórokozó esetén</b>		
ciprofloxacín	Ciprofloxacín Kabi 400 mg inf.	2 x 400 mg iv.
<i>A parenterális kezelés időtartama 4-6 hét, amely érzékenység alapján rifampicin+sulfamethoxazol/ trimetoprim illetve clindamycin vagy ciprofloxacín orális terápiával folytatandó.</i>		
Környezetből ráterjedő osteomyelitis		
ciprofloxacín	Ciprofloxacín Kabi 400 mg inf.	2 x 400 mg iv.
+/-		
vancomycin	Vancomycin-Human 1g inj.	2 x 1 g iv.

Az antibiotikumok számára a csont nehezen hozzáférhető, ezért szükség van egy olyan terápiás módszerre, ami tartósan biztosítja lokális MIC értéket meghaladó antibiotikum szintet a fertőzés helyén.

Vizsgálatainkban a viasz alapú hordozó összetétele alapján Wax1 és Wax2 viaszkorong néven szerepel. A viasz alapú hordozót a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézete fejlesztette ki az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA) pályázata keretében (pályázat címe: *Szabályozott hatóanyag-felszabadulású antibiotikumokat tartalmazó biológiai hordozók alkalmazása csonthiányok pótlására*, OTKA azonosító: 49480). Az intézet munkacsoportja közleményekben és konferencia absztraktokban számolt be a viasz fizikai és kémiai jellemzőinek vizsgálatáról (224-226).

A komplex, kutatócsoportunk által vizsgált, szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszer az irodalomban ismert ADS-ekhez képest számos előnnyel rendelkezik (227). A mindennapi klinikai gyakorlatban alkalmazott rendszerek (4. táblázat) többségének közös problémája, hogy a hordozó anyag az antibiotikum leadását követően élettelen idegen testként a beültetés helyén marad. A Septopal-lánc elterjedt alkalmazásának az egyre szélesedő antibiotikum rezisztencia szab határt. Az egyre növekvő számú aminoglikozid rezisztens *Staphylococcus spp.* törzsek által okozott fertőzés miatta gentamicint sok klinikus orvos már nem ajánlja (199, 228, 229). Emellett a gyöngyökben alacsonyabb lehet az antibiotikum hozzáférhetősége, mert nem egyforma a gyöngyök mérete. Krónikus osteomyelitis esetén a seb gyógyulása a PMMA gyöngyök beültetését követően 5 nap múlva várható, a gyöngyök minimum 4 hétig a betegben maradnak, majd újabb sebészi beavatkozással távolítják el őket. A PMMA gyöngyök legnagyobb hátránya, hogy az újabb operáció magában hordozza az ismételt fertőzés lehetőségét. A vizsgálatok azt mutatják, hogy a 4 hetes időintervallum alatt a hatóanyag kevesebb, mint 50 % szabadul fel. Ezzel szemben a parenterális kezeléssel kombinált antibiotikummal impregnált PMMA csontcement alkalmazásának sikere 40-90 % között van (230). A hatásos baktericid koncentráció fenntartása szempontjából a vancomycinnel átitatott csontcement (vancomycin impregnated poly-methyl-metacrilat) bizonyult a leghatékonyabb módszernek.

Vizsgálat igazolta, hogy a protézis felületén elszaporodó biofilm képző kórokozók glycoallixot növesztenek, amely meggátolja az antibiotikum molekulák hatását, így a Septopal-lánc és a az antibiotikummal impregnált csontcement kedvező terápiás hatása sok esetben korlátozott (231).

Biodegradábilis hordozó esetén megkíméljük a szervezetet a reoprációtól. A 4. táblázatban látható biodegradábilis DDS rendszerek azonban még nem kerültek be a sebészi gyakorlatba, többsége kísérleti rendszer.

A viasz hordozóanyagként történő alkalmazása új módszerek számít. Eddig kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a viasz DDS-ben történő felhasználásáról. A viaszhoz hasonló liposzómális hordozó rendszert 1961-ben mutatták be Angliában (232). Napjainkig többfajta liposzómás rendszert teszteltek különféle hatóanyagokkal terápiás lehetőségként (daganatellenes terápia, fájdalomcsillapítók, neurológiai degeneratív kórképek terápiaja). Az elmúlt években a viasz alapú gyógyszer felszabadítású rendszereket különböző non-szteroid gyulladásgátló molekulákkal tesztelték (233). A szövetek közt maradó, hatóanyagot már nem tartalmazó rendszer degradálására több lehetőség kínálkozik. A szervezet által termelt enzimek az élettelen hordozóanyagot elbonthatják (231). Viasz esetében a későbbiekben a szervezet makrofágjai végzik a hordozómolekulák eltávolítását az antibiotikum hatás elmúltával.

Ahogy a csontörlemény - antibiotikum keveréket tartalmazó cilinderek esetében, az antibiotikum - hordozóanyag komplexumot is szilárd, szerkezettel rendelkező cellában kell a fertőzés helyére beültetni, mivel csak így tudja biztosítani a lokális, hosszabb ideig fenntartható MIC koncentrációt (különben hamar eldiffundál a hatóanyag) (138). Az ortopédiában használt cilinderek azonban testidegen anyagok, nem vitalizálhatók. A cella képzésénél figyelembe kell venni azt a felmerülő igényt, hogy a rendszer a hatóanyag elfogytával a helyi szövetek része legyen. Ennek az elvárásnak eleget téve, cellaként mátrix szerkezetű, liofilizált csont használható fel. A liofilizált csont előnye, hogy a szervezet számára vitalizálható szövetként beépül a csontszövetbe (144, 145).

A szivacsos csontállomány esetében a viasz molekulák bediffundálnak a belsejébe, így a hordozóanyag homogén eloszlást mutat. Spongiózus csontot a csípőízület totál endoprotézisre (TEP) való kicserélésénél nyerünk. A destruált ízületből eltávolításra kerül a femur fej és a combnyak. Az ízületi fejet, amennyiben felhasználható, félbevágják, majd liofilizálják.

A liofilizálás a tartósító eljárások közé tartozik, oldószernek vagy víznek a megfagyasztott anyagból (pl. vérplazmából, élelmiszer- ipari termékekből, italalapanyagokból) való eltávolítására szolgáló módszer. Lényege, hogy a csontot megfagyasztják, majd vákuum segítségével a megfagyott víz szublimációja következik

be (fagyasztva szárítás). Ezzel az eljárással évekig eltarthatóvá válik a humán csont, amelyet csontbankban tárolnak. Liofilizált csontokat a múlt század 70-es évei óta használnak csontpótláshoz (pl. fogászat) (234-236).

### **8.3.2. A rendszer antibakteriális hatásának idő függvényében történő vizsgálata**

A tanulmány, amely a vancomycin folyékony közegben történő kioldódását elemezte, az antibiotikumhoz tartozó MIC értéket 2 µg/ml-ben határozta meg *S. epidermidis* ATCC 35984 számú törzsével szemben (23). A kalibrációs görbét (6. ábra) figyelembe véve a vancomycin MIC értéke szintén 2 µg /ml. Az ölési görbe analízise alapján kisebb koncentráció elegendőnek bizonyult a baktericid hatás kifejtéséhez. 1 µg/ml vancomycin koncentráció jelentős csíraszám csökkentő hatással bírt mind a három tápoldatban, ennél kisebb koncentráció azonban egy nagyságrenddel kevesebb baktérium megölésére volt csak képes T<sub>24</sub> időpontban. A folyékony közegben végzett kioldódási vizsgálat során 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong esetében a többi rendszerhez képest szignifikánsabb csíraszám csökkenést észleltünk. Más TKC analízissel foglalkozó vizsgálatok vancomycin ilyen koncentrációjánál jelentkező csíraszám csökkentő hatást daptomycin és rifampicin alkalmazása esetében igazoltak (238).

### **8.3.3. A rendszer antibiotikum leadási dinamikájának meghatározása**

A DDS szilárd tápoldalon történt vizsgálata során baktériumölő képességét az a Bauer-Kirby módszer szerint a Wax1 és Wax2 viaszkorongok körül létrejött gátlási zóna átmérőjével adtuk meg. Az antibiotikummal impregnált viaszkorongot ráhelyeztük a *Staphylococcus* tenyészetre. Az irodalomból ismert adatok alapján minimálisan két hetes parenterális antibiotikum terápia, majd 4-6 hetes per os. kezelés szükséges a hematogén osteomyelitis leküzdésére (223). Ennek függvényében az elvárásunk az volt, hogy a gátlási zóna négy hétig fennmaradjon. A Wax1 és Wax2 viaszkorongok 1, 2 és 4 mg vancomycin tartalom mellett 6 napig gátolta a *S. epidermidis* növekedését szilárd



táptalajon (11. ábra). A gátlási zóna körül új telepek sem képződtek, ami arra utalt, hogy elhúzódó, egyenletes hatóanyag leadás mellett nem szelektálódtak ki vancomycin rezisztens törzsek. A kísérletnek a tenyészetek eltarthatósága szabott gátat. 1 hét után a baktérium pázsitok többsége befertőződött, illetve néhány esetben a korongok elmozdultak, így a gátlási zónák értékelhetetlenné váltak.

Wax1 és Wax2 viaszkorongok folyékony közegben történő hatóanyag leadását ölési görbék kinetikájának vizsgálatával lehetett jól jellemezni. Minden vancomycin tartalom esetében összehasonlítottuk a Wax1 és Wax2 viaszkorongok ölési görbéit a kristályos vancomycin BHI-ben kifejtett csíraszám csökkentő hatásával (15, 16, 17. és 18. ábra). Mind a 8 ADS minden esetben egyenletesen szabadította fel a vancomycint, ezért  $T_0$  időponttól számítva a *S. epidermidis* csíraszama fokozatosan csökkent. Exponenciálisan jellemezhető CFU csökkenést a Wax2 viaszkorong 4mg vancomycint tartalmazó típusánál értünk el. Ez a viaszkorong típus egyenletesen, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vancomycin koncentrációt biztosított a tápoldatban. Ezzel megegyező mennyiségű vancomycint BHI tápoldathoz adva azt tapasztaltuk, hogy a kristályos antibiotikum mellett a baktériumok az első 4 órában tovább szaporodnak, majd hirtelen bekövetkezik a meredek, deklinációs fázis. Viaszkorongok esetében a kezdeti növekedési fázis elmaradt, ami szintén kiegyensúlyozott hatóanyag leadásra utalt. A rendszer tehát szabályozott módon, egyenletesen képes biztosítani az 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vancomycin koncentrációt *in vitro* és feltehetően *in vivo* körülmények között is.

## 8.4. *Pseudomonas aeruginosa* törzsek vizsgálata

### 8.4.1. Biofilm képzés igazolása

A mikrotiter lemez mélyedéseiben képződő biofilm réteg safraninnal történő megfestése egyszerű és költséghatékony kvalitatív módszernek bizonyult a biofilm képzés igazolására. A fenotípusos vizsgálat jól használható olyan esetekben, amikor nincs szükségünk a biofilm képző baktérium molekuláris biológiai módszerekkel történő analizálására, de el kell döntenünk, vajon a vizsgált törzs képes-e biofilmet létrehozni.

### 8.4.2. Biofilm képzést gátló antibiotikum kombinációk meghatározása

Kutatócsoportunk antibiotikumok szinergizmusát vizsgálta biofilmképző *P. aeruginosa* törzseken (239). Ugyan a *P. aeruginosa* antibiotikumok számára nehezen áthatolható biofilmréteget hozott létre, de bizonyos antibiotikum kombinációk szinergizmus miatt alacsonyabb koncentráció mellett is gátolták a biofilmréteg kialakulását. A vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a ceftazidim fluorokinolonokkal és az aminoglikozidok clarithromycinnel történt kombinálása kimagaslóan szinergista hatást fejtett ki a biofilm képző törzsekkel szemben. A clarithromycin MIC<sub>90</sub> értéke bizonyult a legmagassabbnak a vizsgált antibiotikumok közül, de MBIC érték alapján már jóval alacsonyabb koncentrációban gátolta a biofilm képződést. Ennek a jelenségnek az a magyarázata, hogy a clarithromycin lényegében hatástalan a *P. aeruginosával* szemben (a baktérium planktonikus fázisban is rezisztens). A makrolidok azonban képesek gátolni a baktérium N-acil L-homoszerin lakton mediált quorum sensing mechanizmusát, amely *P. aeruginosa* esetében biofilm termelésért felelős gének expresszióját indítja be (240, 241). Ugyan ezt a jelenséget figyeltük meg piperacillin/tazobaktám esetében. A clarithromycin jól kombinálható más antibiotikumokkal, többségükkel szinergista hatást fejt ki. Cefepimmal történt kombinációja azonban antagonistá hatást fejt ki, ami azért lényeges, mert a cefepim az egyik, széles körben használt, *P. aeruginosa* ellenes antibiotikum. A FIC-index meghatározás során észleltük, hogy a clarithromycin MBIC értéke - és ez által a MIC értéke is - kombinációban alkalmazva tovább csökkenthető, míg

piperacillin/tazobaktám esetében ez jelenséget nem figyeltük meg. A karbapenem-makrolid kombináció lényegében hatástalannak bizonyult.

Biofilm képző *P. aeruginosa* törzsekkel szemben más közleményekben a fosfomicin-ofloxacin és szintén makrolid (tobramycin)-clarithromycin kombináció bizonyult hatásosnak (242-244).

Biofilm képző, ESBL termelő, klinikai izolátum *E. coli* törzs (CTX-M-15 termelő O25:H4-ST131 törzs) (245) ellen fosfomicin kolisztinnel történt kombinációja igazolta a legjelentősebb szinergista hatást (246). Fosfomicin önállóan 17 %-ban volt képes gátolni a biofilm képző Gram-negatív baktériumokat. A kísérletben felhasznált *E. coli* klinikai biofilm képző fázisban 100 %-ban rezisztensnek bizonyult külön-külön a tápoldatra adott kolisztinnel, gentamicinnel és tigecklinnel szemben, de az egyes antibiotikumok fosfomicinnel történt kombinációja szintén szinergista hatást mutatott.

Más tanulmányban a fosfomicin olyan antibiotikumokkal kombinálva is képes volt szinergizmust kifejteni MRSA-val szemben, amelyekre a baktérium biofilm képző fázisban külön-külön rezisztens volt (fosfomicin + linezolid, fosfomicin + minociklin, fosfomicin + vancomycin, fosfomicin + teicoplanin) (207).

Biofilm képző *S. epidermidis* törzssel szemben linezolid-rifampicin kombináció mutatott szinergista hatást (247). Rifampicin vancomycinnel történt kombinálása szintén szinergista hatást igazolt, míg aminoglikozid-rifampicin kombináció antagonista hatást fejtett ki biofilm képző *S. epidermidis* törzsekkel szemben (248).

Kutatócsoportunk más Gram-negatív, biofilmképző, nozokomiális kórokozóval szemben is végzett antibiotikum szinergizmust igazoló *in vitro* vizsgálatokat. *P. aeruginosa* törzsekkel szemben hatástalannak bizonyuló imipenem + tobramycin kombináció szinergista hatást fejtett ki karbapenemáz termelő, biofilmképző, nozokomiális *K. pneumoniae* törzsekkel szemben. Kolisztin rifampicinnel történt kombinálása szintén jelentős szinergista hatást mutatott (249). Egyes antibiotikum kombinációk szinergizmusát a 12. táblázat mutatja be.

**12. táblázat:** Biofilm képző törzsekkel szemben szinergizmust mutató antibiotikum kombinációk

Antibiotikum kombináció	Baktérium	Közlemény
clarithromycin-levofloxacin	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Szász és mtsai, 2010</i>
clarithromycin-ciprofloxacín	<i>P. aeruginosa</i>	
clarithromycin-gentamicin	<i>P. aeruginosa</i>	
clarithromycin-tobramycin	<i>P. aeruginosa</i>	
ceftazidim-ciprofloxacín	<i>P. aeruginosa</i>	
fosfomicin-ofloxacin	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Kumon és mtsai, 1995, Monden és mtsai, 2002</i>
fosfomicin-kolisztin	<i>E. coli</i> (ESBL)	<i>Corvec és mtsai, 2013</i>
fosfomicin-gentamicin	<i>E. coli</i> (ESBL)	
tigeciklin-kolisztin	<i>E. coli</i> (ESBL)	
kolisztin-rifampicin	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Kádár és mtsai, 2013</i>
imipenem-tobramycin	<i>K. pneumoniae</i>	
fosfomicin-linezolid	<i>S. aureus</i> (MRSA)	<i>Tang és mtsai, 2012</i>
fosfomicin-minociklin	<i>S. aureus</i> (MRSA)	
fosfomicin-vancomycin	<i>S. aureus</i> (MRSA)	
fosfomicin-teicoplanin	<i>S. aureus</i> (MRSA)	
rifampicin-vancomycin	<i>S. epidermidis</i>	<i>Gagnon és mtsai, 1991</i>
rifampicin-linezolid	<i>S. epidermidis</i>	<i>Hellmark és mtsai, 2010</i>

## 9. Következtetések

1. A Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikájáról 2001 és 2010 között összegyűjtött adatok alapján protézisekhez köthető infekciók közül *S. epidermidis* okozta fertőzések aránya megfelel az európai centrumokban tapasztaltaknak, de a külföldi adatok tekintetében nagy szórással kell számolnunk. *S. aureus* kevesebb esetben izoláltunk, azonban Gram-negatív baktériumok okozta infekciók számában más kórházakhoz képest előretérés észlelhető.
2. A baktériumok a növekedési kinetikájának megfelelően, a megfigyelés első szakaszában az *in vitro* vizsgálatokhoz használt folyékony táptalajok mindegyikében szaporodásnak indulnak, majd velük szemben a vancomycin fokozatosan fejti ki a hatását. Mivel a kioldódási vizsgálatok során széleskörben használt dúsító táptalajok összetétele a vancomycin baktériumokra gyakorolt hatását nem gátolja, így ezek a tápoldatok alkalmasak az infekciós góc körül elhelyezkedő élő szövetek modellezésére. A vancomycin statisztikailag alátámasztható, csíraszám csökkentő hatása a kioldódási vizsgálatokhoz széleskörben használt tápoldatok mindegyikében megfigyelhető. Tápanyagellátottság szempontjából a BHI áll a legközelebb az élő szövetekhez, ezért hasonló kísérleteket bemutató közlemények többsége a BHI-t ajánlja az élő szöveti viszonyok modellezése. Fiziológiás só oldat csak korlátozottan alkalmas *in vitro* kísérletekhez, mivel 6-8 óra elteltével a baktériumok száma, tápanyagok hiányában, antibiotikus hatás nélkül is csökkenni kezd. Ez a jelenség megfelel a baktériumok normal növekedési görbéjén észlelhető deklinációs fázisnak.
3. 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong esetében a többi rendszerhez képest szignifikánsabb csíraszám csökkenést tudunk elérni, és 4 mg vancomycin tartalom esetén 1 µg/ml koncentráció is elegendő a baktériumszaporodás gátlásához és a csíraszám csökkentéséhez.

4. BHI-ben a vancomycin kalibrációs görbéje alapján a szabad antibiotikum MIC értéke 2 µg /ml körüli. Ezzel szemben Wax1 és Wax2 viaszkorongok kioldódásos vizsgálatakor mért 1 µg/ml vancomycin koncentráció érhető el folyékony közegben, amely egyenletes hatóanyagleadás mellett gátolja a baktériumok szaporodását. Szilárd táptalajon végzett hatóanyag leadás vizsgálat alapján a Wax1 és Wax2 viaszkorongok 1 mg és annál nagyobb vancomycin tartalom mellett majdnem 1 hétig képesek gátlási zónát fenntartani, technikai okok miatt a rendszer a továbbiakban nem tartható el. A fentiek alapján szabályozott, egyenletes antibiotikum leadás esetén a vancomycin MIC értéke 1 µg/ml-ig csökkenthető. Élő szövetek között, egyenletes vancomycin leadás mellett a DDS 6 napig képes biztosítani az 1 µg/ml körüli antibiotikum koncentrációt. Az általunk vizsgált DDS így képes megelőzni a protézisek szeptikus folyamatait és parenterális antibiotikum terápiával kiegészítve sikeresen alkalmazható osteomyelitis kezelésére is.
5. A mikrotiter lemez mélyedéseiben képződő biofilm réteg safraninnal történő megfestése egyszerű és költségghatékony kvalitatív módszer a biofilm képzés igazolására. A biofilm festés minden, olyan esetben jól használható eljárás, amikor nincs szükségünk a biofilm képző baktérium molekuláris biológiai módszerekkel történő analizálására, de el kell döntenünk, vajon a vizsgált törzs képes-e biofilmet létrehozni.
6. A frakcionált gátló koncentráció indexek meghatározása alapján a ceftazidim-fluorokinolon kombináció kimagaslóan szinergista hatást fejt ki a biofilm képző, *P. aeruginosa* törzsekkel szemben. A clarithromycin jól kombinálható más antibiotikumokkal, többségükkel szintén szinergista hatást hoz létre. Protézisek felületén megtelepedő biofilm képző kórokozók miatt biofilm képzést gátló antibiotikum kombinációk alkalmazása válhat szükségessé szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszerekben.

## 10. Összefoglalás

Az emberi test normálflórájának tagjaként ismert *S. epidermidis* az elsőszámú patogének egyike a protézis asszociált fertőzésekben és fontos kóroki tényezője a testbe ültetett eszközök felületén létrejövő biofilmnek.

A szeptikus csontfolyamatok sokszor csontfolytonosság megszakadásával járnak és parenterális antibiotikumok adásával is nehézkes és elhúzódó az osteomyelitis kezelése. Szükségessé vált olyan rendszerek kifejlesztése, amelyek segítségével sikeresen kezelhetjük az infekciós folyamatot, alkalmazásukkal megelőzhető legyen a protézis szeptikus kilazulása és megfelelő antibiotikum kombinációt felhasználva a biofilm képzést is gátoljuk. Az ismertetett szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszerünk (DDS) előnyei a következők: biodegradábilis, csontpótlásra is használható, illetve MRSA és MRSE törzsek ellen is hatásos antibiotikumot (vancomycint) tartalmaz.

A DDS egyszerre szolgálja az ortopédsebész, az infektológus és a beteg érdekét. Az ortopédsebésznek nem kell újabb, az infekciós rátát növelő operációt végeznie. A konzíliumba hívott infektológus és a klinikus orvos lerövidítheti a költséges, hosszantartó parenterális antibiotikum terápiát. Alkalmazása a betegnek számára a legelőnyösebb, mivel a posztoperatív fertőzés eshetősége és ebből kifolyólag a kórházi tartózkodás ideje csökken.

Kadar B, Szasz M, Kristof K, Pesti N, Krizsan G, Szentandrassy J, Rokusz L, Nagy K, Szabo D: In vitro activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* strains, *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2010, 57(3):235-45.

Kadar B, Kocsis B, Toth A, Damjanova I, Szasz M, Kristof K, Nagy K, Szabo D: Synergistic antibiotic combinations for colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2013, 60(2):201-9.

Szasz M, Hajdu M, Pesti N, Domahidy M, Kristof K, Zahar A, Nagy K, Szabo D: In vitro efficiency of vancomycin containing experimental drug delivery systems, *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2013, 60(4):461-8.

## 11. Summary

*S. epidermidis* is the part of the normal skin flora, however it can cause also infections; it is the most important pathogen in infections related to implanted foreign material, especially prosthetic joint infections (PJI). Biofilm-producing *S. epidermidis* strains play important role in infection on artificial devices.

However, even these studies confirm, that *S. epidermidis* isolated from prosthetic joints infections are often multiresistant. There is a high resistance rate against the aminoglycosides among *S. epidermidis* strain and aminoglycosides were widely used in implant, however the resistance could restrict their use. Developing a new type of drug delivery system (DDS), it was necessary to use new antibiotic and new carrier material to avoid chronic osteomyelitis around the prosthetic joint and bone non-union. Vancomycin has a bactericide effect against *S. epidermidis* in aerob and anaerob conditions as well. Because the clinical isolates from orthopedic device infection are susceptible to vancomycin, so we decided to add vancomycin as an antibiotic to our DDS. Wax is a new, biodegradable material to use as an antibiotic carrier in orthopedic. It is easy to develop and can be phagocyted by macrophages after releasing antibiotic.

These facts can make us not to reoperate patients because there is no foreign body and the possibility of new infection can be avoided.

Kadar B, Szasz M, Kristof K, Pesti N, Krizsan G, Szentandrassy J, Rokusz L, Nagy K, Szabo D: In vitro activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* strains, *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2010, 57(3):235-45.

Kadar B, Kocsis B, Toth A, Damjanova I, Szasz M, Kristof K, Nagy K, Szabo D: Synergistic antibiotic combinations for colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2013, 60(2):201-9.

Szasz M, Hajdu M, Pesti N, Domahidy M, Kristof K, Zahar A, Nagy K, Szabo D: In vitro efficiency of vancomycin containing experimental drug delivery systems, *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2013, (4):461-8.



## 12. Irodalmi hivatkozások jegyzéke

1. Rosenthal VD, Bijie H, Maki DG, Mehta Y, Apisarnthanarak A, Medeiros EA, Leblebicioglu H, Fisher D, Alvarez-Moreno C, Khader IA. (2012) International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. *Am J Infect Control*, 40(5):396-407.
2. Mestre G, Berbel C, Tortajada P, Alarcia M, Coca R, Fernandez MM, Gallemi G, Garcia I, Aguilar MC, Rodriguez-Bano J. (2013) Successful multifaceted intervention aimed to reduce short peripheral venous catheter-related adverse events: a quasiexperimental cohort study. *Am J Infect Control*, 41(6):520-526.
3. Pujol M, Hornero A, Saballs M, Argerich MJ, Verdaguer R, Ciscal M, Pena C, Ariza J, Gudiol F. (2007) Clinical epidemiology and outcomes of peripheral venous catheter-related bloodstream infections at a university-affiliated hospital. *J Hosp Infect*, 67(1):22-29.
4. El-Ahdab F, Benjamin DK, Jr., Wang A, Cabell CH, Chu VH, Stryjewski ME, Corey GR, Sexton DJ, Reller LB, Fowler VG, Jr. (2005) Risk of endocarditis among patients with prosthetic valves and *Staphylococcus aureus* bacteremia. *The Am J Med*, 118(3):225-229.
5. Gordon SM, Keys TF. (1995) Bloodstream infections in patients with implanted prosthetic cardiac valves. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 7(1):2-6.
6. Leontyev S, Borger MA, Modi P, Lehmann S, Seeburger J, Walther T, Mohr FW: Redo aortic valve surgery. (2001) Influence of prosthetic valve endocarditis on outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 142(1):99-105.
7. Borgquist L, A WD, Dale H, Lidgren L, Stefansdottir A. (2014) Prosthetic joint infections: a need for health economy studies. *Acta Orthop*, 85(3):218-220.
8. Jansen E, Varonen M, Huhtala H, Lehto MU, Lumio J, Kontinen YT, Moilanen T. (2010) Incidence of prosthetic joint infections after primary knee arthroplasty. *J Arthroplasty*, 25(1):87-92.
9. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. (2012) Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *J Arthroplasty* 2012, 27(8):61-65.

10. Nasser S. (1994) The incidence of sepsis after total hip replacement arthroplasty. *Semin Arthroplasty*, 5(4):153-159.
11. Gomes D, Pereira, M., Bettencourt, A.F. (2013) Osteomyelitis: an overview of antimicrobial therapy. *Braz J Pharm Sci*, 49(1):13-27.
12. Takai S, Kuriyama T, Yanagisawa M, Nakagawa K, Karasawa T. (2005) Incidence and bacteriology of bacteremia associated with various oral and maxillofacial surgical procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 99(3):292-298.
13. Coelho-Prabhu N, Oxentenko AS, Osmon DR, Baron TH, Hanssen AD, Wilson WR, Steckelberg JM, Baddour LM, Harmsen WS, Mandrekar J. (2013) Increased risk of prosthetic joint infection associated with esophago-gastro-duodenoscopy with biopsy. *Acta Orthop*, 84(1):82-86.
14. Meyer GW, Artis AL. (1997) Antibiotic prophylaxis for orthopedic prostheses and GI procedures: report of a survey. *Am J Gastroenterol*, 92(6):989-991.
15. Settles D, Rex DK. (2011) Antibiotics before endoscopy in patients with prosthetic joints. *Gastrointest Endosc*, 73(5):1067.
16. Oni JA, Kangesu T. (1991) *Yersinia enterocolitica* infection of a prosthetic knee joint. *Br J Clin Pract*, 45(3):225.
17. Bennett DM, Shekhel T, Radelet M, Miller MD. (2014) Isolated *Lactobacillus* chronic prosthetic knee infection. *Orthopedics*, 37(1):e83-86.
18. Gupta A, Berbari EF, Osmon DR, Virk A. (2014) Prosthetic joint infection due to *Salmonella* species: a case series. *BMC Infect Dis*, 14(1):633.
19. Termine N, Panzarella V, Ciavarella D, Lo Muzio L, D'Angelo M, Sardella A, Compilato D, Campisi G. (2009) Antibiotic prophylaxis in dentistry and oral surgery: use and misuse. *Int Dent J*, 59(5):263-270.
20. Euba G, Lora-Tamayo J, Murillo O, Pedrero S, Cabo J, Verdaguer R, Ariza J. (2009) Pilot study of ampicillin-ceftriaxone combination for treatment of orthopedic infections due to *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(10):4305-4310.

21. Chen PL, Chang CM, Wu CJ, Ko NY, Lee NY, Lee HC, Shih HI, Lee CC, Wang RR, Ko WC. (2007) Extraintestinal focal infections in adults with nontyphoid *Salmonella* bacteraemia: predisposing factors and clinical outcome. *J Intern Med*, 261(1):91-100.
22. Spadafora PF, Qadir MT, Cunha BA. (1996) *Streptococcus bovis* endocarditis and vertebral osteomyelitis. *Heart Lung*, 25(2):165-168.
23. Kiss J, Zahar A, Nyiri P, Prinz G. (2005) A case of femoral osteomyelitis caused by *Lactococcus*. *Orv Hetil*, 146(13):613-618.
24. Bistolfi A, Massazza G, Verne E, Masse A, Deledda D, Ferraris S, Miola M, Galetto F, Crova M. (2011) Antibiotic-loaded cement in orthopedic surgery: a review. *ISRN Orthop*, 2011:290851.
25. Lora-Tamayo J, Murillo O, Iribarren JA, Soriano A, Sanchez-Somolinos M, Baraia-Etxaburu JM, Rico A, Palomino J, Rodriguez-Pardo D, Horcajada JP. (2013) 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*, 56(2):182-194.
26. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. (2002) Effects on antibiotic resistance of *Staphylococcus epidermidis* following adhesion to polymethylmethacrylate and to silicone surfaces. *Biomaterials*, 23(6):1495-1502.
27. Dudeck MA, Horan TC, Peterson KD, Allen-Bridson K, Morrell GC, Pollock DA, Edwards JR. (2011) National Healthcare Safety Network (NHSN) report, data summary for 2009, device-associated module. *Am J Infect Control*, 39(5):349-367.
28. Edwards JR, Peterson KD, Mu Y, Banerjee S, Allen-Bridson K, Morrell G, Dudeck MA, Pollock DA, Horan TC. (2009) National Healthcare Safety Network (NHSN) report: data summary for 2006 through 2008, issued December 2009. *Am J Infect Control*, 37(10):783-805.
29. Sacks GD, Diggs BS, Hadjizacharia P, Green D, Salim A, Malinoski DJ. (2014) Reducing the rate of catheter-associated bloodstream infections in a surgical intensive care unit using the Institute for Healthcare Improvement Central Line Bundle. *Am J Surg*, 207(6):817-823.

30. NNSR 2008 évi eredményei. [www.oek.hu](http://www.oek.hu)
31. NNSR 2011 évi eredményei. [www.oek.hu](http://www.oek.hu)
32. Cecinati V, Brescia L, Tagliaferri L, Giordano P, Esposito S. (2012) Catheter-related infections in pediatric patients with cancer. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 31(11):2869-2877.
33. Worth LJ, Slavin MA. (2009) Bloodstream infections in haematology: risks and new challenges for prevention. *Blood Rev*, 23(3):113-122.
34. Niel-Weise BS, Stijnen T, van den Broek PJ. (2008) Anti-infective-treated central venous catheters for total parenteral nutrition or chemotherapy: a systematic review. *J Hosp Infect*, 69(2):114-123.
35. Madhukumar P, Loh GY, Maung ZA, Chua FS, Chen JJ. (2012) Incidence of non-tunnelled central venous catheter-related infections in oncologic patients receiving chemotherapy in an outpatient setting. *Singapore Med J*, 53(8):513-516.
36. Raad I, Hanna H, Maki D. (2007) Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect Dis*, 7(10):645-657.
37. Safdar N, Fine JP, Maki DG. (2005) Meta-analysis: methods for diagnosing intravascular device-related bloodstream infection. *Ann Intern Med*, 142(6):451-466.
38. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. (1997) A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med*, 296(23):1305-1309.
39. Bouza E. (2005) A prospective, randomized and comparative study of 3 different methods for the diagnosis of intravascular catheter colonization. *Clin Infect Dis*, 2005(40):1096-1100.
40. Munoz P, Bouza E, San Juan R, Voss A, Pascau J, Desco M, Co-Operative Group of the European Study Group on Nosocomial I. (2004) Clinical-epidemiological characteristics and outcome of patients with catheter-related bloodstream infections in Europe (ESGNI-006 Study). *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10(9):843-845.

41. Lombardi S, Felice V, Di Campi E, Di Giulio M, Cellini L. (2014) Central vascular catheter infections in a Hospital of Central Italy. *New Microbiol*, 2014(37):41-50.
42. Braun E, Hussein K, Geffen Y, Rabino G, Bar-Lavie Y, Paul M. (2014) Predominance of Gram-negative bacilli among patients with catheter-related bloodstream infections. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(10):O627-629.
43. Khorvash F, Abbasi S, Meidani M, Shakeri M. (2014) Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of isolated microorganisms from central venous catheters in ICU patients. *Adv Biomed Res*, 3:102.
44. Jaberi A, Hadziomerovic A, Toor SS, Galwa RP, Graham J, Thornhill RE, Ryan SE. (2014) Externalization of tunneled hemodialysis catheter in patients with tunnel or exit-site infections and limited access options. *J Vasc Interv Radiol*, 25(4):561-566
45. Guggenbichler JP, Boeswald M, Kramer A. (2011) Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials – catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär*, 6(1).
46. Burdeu G, Currey J, Pilcher D. (2014) Idle central venous catheter-days pose infection risk for patients after discharge from intensive care. *Am J Infect Control*, 42(4):453-455.
47. Peces R, Diaz-Corte C, Baltar J, Gago E, Alvarez-Grande J. (1999) A desperate case of failing vascular access--management of superior vena cava thrombosis, recurrent bacteraemia, and acute clavicular osteomyelitis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 14(2):487-489.
48. Kristof K. (2010) Nozokomiális fertőzéseket okozó multirezisztens baktériumok mikrobiológiai jellemzői. Doktori értekezés, Semmelweis Egyetem Doktori Iskola.

49. Eleftheriadis T, Liakopoulos V, Leivaditis K, Antoniadis G, Stefanidis I. (2011) Infections in hemodialysis: a concise review - Part 1: bacteremia and respiratory infections. *Hippokratia*, 15(1):12-17.
50. Power A, Singh SK, Ashby D, Cairns T, Taube D, Duncan N. (2011) Long-term Tesio catheter access for hemodialysis can deliver high dialysis adequacy with low complication rates. *J Vasc Interv Radiol*, 22(5):631-637.
51. Wang J, LaBerge JM, Chertow GM, Kerlan RK, Wilson MW, Gordon RL. (2006) Tesio catheter access for long-term maintenance hemodialysis. *Radiology*, 241(1):284-290.
52. Chang M, Cunha BA. (2004) *Klebsiella pneumoniae* bacteremia associated with a Tesio hemodialysis catheter. *Am J Infect Control*, 32(6):374.
53. Ramanathan V, Riosa S, Al-Sharif AH, Mansouri MD, Tranchina A, Kayyal T, Abreo AP, Aslam S, Nassar G, Darouiche RO. (2012) Characteristics of biofilm on tunneled cuffed hemodialysis catheters in the presence and absence of clinical infection. *Am J Kidney Dis*, 60(6):976-982.
54. Katneni R, Hedayati SS. (2007) Central venous catheter-related bacteremia in chronic hemodialysis patients: epidemiology and evidence-based management. *Nat Clin Pract Nephrol*, 3(5):256-266.
55. Gupta V, Yassin MH. (2013) Infection and hemodialysis access: an updated review. *Infect Disord Drug Targets*, 13(3):196-205.
56. Dwyer A. (2008) Surface-treated catheters--a review. *Sem Dialysis*, 21(6):542-546.
57. Lok CE. (2006) Avoiding trouble down the line: the management and prevention of hemodialysis catheter-related infections. *Adv Chronic Kidney Dis*, 13(3):225-244.
58. Nori US, Manoharan A, Thornby JI, Yee J, Parasuraman R, Ramanathan V. (2006) Mortality risk factors in chronic haemodialysis patients with infective endocarditis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 21(8):2184-2190.

59. Peterson WJ, Maya ID, Carlton D, Estrada E, Allon M. (2009) Treatment of dialysis catheter-related Enterococcus bacteremia with an antibiotic lock: a quality improvement report. *Am J Kidney Dis*, 53(1):107-111.
60. Fysaraki M, Samonis G, Valachis A, Daphnis E, Karageorgopoulos DE, Falagas ME, Stylianou K, Kofleridis DP. (2013) Incidence, clinical, microbiological features and outcome of bloodstream infections in patients undergoing hemodialysis. *Int J Med Sci*, 10(12):1632-1638.
61. Nguyen DB, Lessa FC, Belflower R, Mu Y, Wise M, Nadle J, Bamberg WM, Petit S, Ray SM, Harrison LH. (2013) Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections among patients on chronic dialysis in the United States, 2005-2011. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(10):1393-1400.
62. Centers for Disease C, Prevention. (2007) Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections among dialysis patients--United States, 2005. *Morb Mortal Wkly Rep*, 56(9):197-199.
63. Fitzgerald SF, O'Gorman J, Morris-Downes MM, Crowley RK, Donlon S, Bajwa R, Smyth EG, Fitzpatrick F, Conlon PJ, Humphreys H. (2011) A 12-year review of Staphylococcus aureus bloodstream infections in haemodialysis patients: more work to be done. *J Hosp Infect*, 79(3):218-221.
64. Leone S, Suter F. (2010) Severe bacterial infections in haemodialysis patients. *Infez Med*, 18(2):79-85.
65. Munoz de Bustillo E, Borrás F, Gomez-Roldan C, Perez-Contreras FJ, Olivares J, Garcia R, Miguel A, Grupo Levante de Dialisis P. (2011) Impact of peritonitis on long-term survival of peritoneal dialysis patients. *Nefrologia*, 31(6):723-732.
66. Kabat-Koperska J, Golembiewska E, Ciechanowski K. (2008) Peritoneal dialysis-related peritonitis in the years 2005-2007 among patients of the Peritoneal Dialysis Clinic of the Department of Nephrology, Transplantology and Internal Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin. *Pol Arch Med Wewn*, 118(12):694-699.

67. Lawal CO, Soyibo AK, Frankson A, Barton EN. (2010) Characteristics, complications and outcome of patients treated with automated peritoneal dialysis at the Peritoneal Dialysis Unit, University Hospital of the West Indies. *West Indian Med J*, 59(3):312-318.
68. Yap DY, To KK, Yip TP, Lui SL, Chan TM, Lai KN, Lo WK. (2012) *Streptococcus bovis* peritonitis complicating peritoneal dialysis--a review of 10 years' experience. *Perit Dial Int*, 32(1):55-59.
69. Ghali JR, Bannister KM, Brown FG, Rosman JB, Wiggins KJ, Johnson DW, McDonald SP. (2011) Microbiology and outcomes of peritonitis in Australian peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int*, 31(6):651-662.
70. Predari SC, de Paulis AN, Veron D, Zucchini A, Santoianni JE: Fungal peritonitis in patients on peritoneal dialysis. (2007) twenty five years of experience in a teaching hospital in Argentina. *Rev Argent Microbiol*, 39(4):213-217.
71. Sirivongs D, Praderm L, Chan-On C. (2011) Experiences on bedside Tenckhoff catheter implantation. *J Med Assoc Thai*, 94 Suppl 4:S58-63.
72. Guerra e Silva A, Lima MG, Takiya CM, Andrade LR. (2011) Patient's cells colonize the biofilm of Tenckhoff catheters used in peritoneal dialysis. *Biofouling*, 27(6):603-608.
73. Read RR, Eberwein P, Dasgupta MK, Grant SK, Lam K, Nickel JC, Costerton JW. (1989) Peritonitis in peritoneal dialysis: bacterial colonization by biofilm spread along the catheter surface. *Kidney Int*, 35(2):614-621.
74. Szasz M, Lehotkai N, Kristof K, Szabo D, Nagy K. (2009) Prevalence and antimicrobial resistance of uropathogens in different inpatient wards. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 56(4):375-387.
75. Donelli G, Vuotto C. (2014) Biofilm-based infections in long-term care facilities. *Future microbiology*, 9(2):175-188.
76. Nicolle LE. (2014) Catheter associated urinary tract infections. *Antimicrob Resist Infect Control*, 3:23.
77. Nicolle LE. (2012) Urinary catheter-associated infections. *Infect Dis Clin North Am*, 26(1):13-27.



78. Olejnickova K, Hola V, Ruzicka F. (2014) Catheter-related infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: virulence factors involved and their relationships. *Pathog Dis*, 72(2):87-94.
79. Radecka E, Magnusson A. (2004) Complications associated with percutaneous nephrostomies. A retrospective study. *Acta Radiol*, 45(2):184-188.
80. Demirtas A, Yildirim YE, Sofikerim M, Kaya EG, Akinsal EC, Tombul ST, Ekmekcioglu O, Gulmez I. (2012) Comparison of infection and urosepsis rates of ciprofloxacin and ceftriaxone prophylaxis before percutaneous nephrolithotomy: a prospective and randomised study. *Sci World J*, 2012:916381.
81. Bahu R, Chaftari AM, Hachem RY, Ahrar K, Shomali W, El Zakhem A, Jiang Y, AlShuaibi M, Raad, II. (2013) Nephrostomy tube related pyelonephritis in patients with cancer: epidemiology, infection rate and risk factors. *J Urol*, 189(1):130-135.
82. Siddiq DM, Darouiche RO. (2012) Infectious complications associated with percutaneous nephrostomy catheters: do we know enough? *Int J Artif Organs*, 35(10):898-907.
83. Weigel LM, Donlan RM, Shin DH, Jensen B, Clark NC, McDougal LK, Zhu W, Musser KA, Thompson J, Kohlerschmidt D. (2007) High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(1):231-238.
84. Nataloni M, Pergolini M, Rescigno G, Mocchegiani R. (2010) Prosthetic valve endocarditis. *J Cardiovasc Med*, 11(12):869-883.
85. Tornos P, Gonzalez-Alujas T, Thuny F, Habib G. (2011) Infective endocarditis: the European viewpoint. *Curr Probl Cardiol*, 36(5):175-222.
86. Montasser D, Bahadi A, Zajjari Y, Asserraji M, Alayoude A, Moujoud O, Aattif T, Kadiri M, Zemraoui N, El Kabbaj D. (2011) Infective endocarditis in chronic hemodialysis patients: experience from Morocco. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation* : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia, 22(1):160-166.

87. Lopez J, Revilla A, Vilacosta I, Sevilla T, Garcia H, Gomez I, Pozo E, Sarria C, San Roman JA. (2011) Multiple-valve infective endocarditis: clinical, microbiologic, echocardiographic, and prognostic profile. *Medicine*, 90(4):231-236.
88. Thanavaro KL, Nixon JV. (2014) Endocarditis 2014: an update. *Heart Lung*, 43(4):334-337.
89. Grubitzsch H, Schaefer A, Melzer C, Wernecke KD, Gabbieri D, Konertz W. (2014) Outcome after surgery for prosthetic valve endocarditis and the impact of preoperative treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 148(5):2052-2059.
90. Beliaev AM, Roberts SA, Pemberton J, Haydock DA. (2014) *Propionibacterium acnes* biofilm endocarditis requiring radical cardiac debridement and prosthetic valve replacements. *ANZ J Surg*, Epub 2014 Feb 17, [onlinelibrary.wiley.com](http://onlinelibrary.wiley.com)
91. Nasser RM, Melgar GR, Longworth DL, Gordon SM. (1997) Incidence and risk of developing fungal prosthetic valve endocarditis after nosocomial candidemia. *Am J Med*, 103(1):25-32.
92. Stoodley P, Nistico L, Johnson S, Lasko LA, Baratz M, Gahlot V, Ehrlich GD, Kathju S. (2008) Direct demonstration of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in an infected total joint arthroplasty. A case report. *J Bone Joint Surg Am*, 90(8):1751-1758.
93. Overhage J, Bains M, Brazas MD, Hancock RE. (2008) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol*, 190(8):2671-2679.
94. Qin Z, Yang X, Yang L, Jiang J, Ou Y, Molin S, Qu D. (2007) Formation and properties of in vitro biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *J Med Microbiol*, 56(Pt 1):83-93.
95. Dempsey KE, Riggio MP, Lennon A, Hannah VE, Ramage G, Allan D, Bagg J. (2007) Identification of bacteria on the surface of clinically infected and non-infected prosthetic hip joints removed during revision arthroplasties by 16S rRNA gene sequencing and by microbiological culture. *Arthritis Res Ther*, 9(3):R46.
96. Cargill JS, Upton M. (2009) Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Pathol*, 62(12):1112-1116.

97. Nagy E. (2005) Műanyag eszközök és biofilm: mi különbözteti meg a biofilmben élő baktériumot a planktonikus állapótútól? *Infekt Klin Mikrobiol*, 12(4):113-117.
98. Chang CC, Merritt K. (1992) Microbial adherence on poly(methyl methacrylate) (PMMA) surfaces. *J Biomed Mater Res*, 26(2):197-207.
99. Christner M, Franke GC, Schommer NN, Wendt U, Wegert K, Pehle P, Kroll G, Schulze C, Buck F, Mack D. (2010) The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol Microbiol*, 75(1):187-207.
100. Moojen DJ, van Hellemond G, Vogely HC, Burger BJ, Walenkamp GH, Tulp NJ, Schreurs BW, de Meulemeester FR, Schot CS, van de Pol I. (2010) Incidence of low-grade infection in aseptic loosening of total hip arthroplasty. *Acta Orthop*, 81(6):667-673.
101. Maaloum Y, Meybeck A, Olive D, Boussekey N, Delannoy PY, Chiche A, Georges H, Beltrand E, Senneville E, d'Escrivan T. (2013) Clinical spectrum and outcome of critically ill patients suffering from prosthetic joint infections. *Infection*, 41(2):493-501.
102. Rodriguez-Pardo D, Pigrau C, Lora-Tamayo J, Soriano A, del Toro MD, Cobo J, Palomino J, Euba G, Riera M, Sanchez-Somolinos M. (2014) 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*, 20(11):O911-919.
103. Schäfer P, Sandow D, Frommelt L. Infections in Hip and Knee Arthroplasty. Challenges to and Chances for the Microbiological Laboratory In Samo K Fokter (szerk), *Recent Advances in Arthroplasty*, InTech, Rijeka, 2012:439-458.
104. Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kranzler H, Batzilla C, Kozitskaya S. (2006) Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicro Ag* 28(1):14-20.
105. Ziebuhr W. (2001) *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. *Contrib Microbiol*, 8:102-107.

106. Fey PD, Ulphani JS, Gotz F, Heilmann C, Mack D, Rupp ME. (1999) Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis*, 179(6):1561-1564.
107. O'Gara JP, Humphreys H. (2001) *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol*, 50(7):582-587.
108. Huebner J, Goldmann DA. (1999) Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med*, 50:223-236.
109. Mohanty SS, Kay PR. (2004) Infection in total joint replacements. Why we screen MRSA when MRSE is the problem? *J Bone Joint Surg Br*, 86(2):266-268.
110. Rabaud C, Mauuary G. (2001) Infection and/or colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *Pathol Biol (Paris)*, 49(10):812-814.
111. Miragaia M, Couto I, Pereira SF, Kristinsson KG, Westh H, Jarlov JO, Carrico J, Almeida J, Santos-Sanches I, de Lencastre H. (2002) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. *J Clin Microbiol*, 40(2):430-438.
112. Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ, Wichelhaus TA, Paul-Ehrlich-Society for C. (2004) Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the Antimicrobial Resistance Surveillance Study of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, 2001. *Int J Antimicrob Ag*, 23(6):577-581.
113. Dominguez-Herrera J, Docobo-Perez F, Lopez-Rojas R, Pichardo C, Ruiz-Valderas R, Lepe JA, Pachon J. (2012) Efficacy of daptomycin versus vancomycin in an experimental model of foreign-body and systemic infection caused by biofilm producers and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(2):613-617.
114. Tevell S, Claesson C, Hellmark B, Soderquist B, Nilsson-Augustinsson A. (2014) Heterogeneous glycopeptide intermediate *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 33(6):911-917.

115. Chilukuri DM, Shah JC. (2005) Local delivery of vancomycin for the prophylaxis of prosthetic device-related infections. *Pharm Res*, 22(4):563-572.
116. Klemm K. (2001) The use of antibiotic-containing bead chains in the treatment of chronic bone infections. *Clin Microbiol Infect*, 7(1):28-31.
117. Neut D, van de Belt H, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. (2003) Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials*, 24(10):1829-1831.
118. Seligson D, Mehta S, Voos K, Henry SL, Johnson JR. (1992) The use of antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads to prevent the evolution of localized infection. *J Orthop Trauma*, 6(4):401-406.
119. Kirkpatrick DK, Trachtenberg LS, Mangino PD, Von Fraunhofer JA, Seligson D. (1985) In vitro characteristics of tobramycin-PMMA beads: compressive strength and leaching. *Orthopedics*, 8(9):1130-1133.
120. Neut D, Kluin OS, Thompson J, van der Mei HC, Busscher HJ. (2010) Gentamicin release from commercially-available gentamicin-loaded PMMA bone cements in a prosthesis-related interfacial gap model and their antibacterial efficacy. *BMC Musculoskelet Disord*, 11:258.
121. McLaren AC, Nugent M, Economopoulos K, Kaul H, Vernon BL, McLemore R. (2009) Hand-mixed and premixed antibiotic-loaded bone cement have similar homogeneity. *Clin Orthop Relat Res*, 467(7):1693-1698.
122. Geurts JA, Janssen DM, Kessels AG, Walenkamp GH. (2013) Good results in postoperative and hematogenous deep infections of 89 stable total hip and knee replacements with retention of prosthesis and local antibiotics. *Acta orthopaedica*, 84(6):509-516.
123. Hendriks JG, Neut D, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. (2003) The release of gentamicin from acrylic bone cements in a simulated prosthesis-related interfacial gap. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 64(1):1-5.
124. Neut D, de Groot EP, Kowalski RS, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. (2005) Gentamicin-loaded bone cement with clindamycin or fusidic acid added: biofilm formation and antibiotic release. *J Biomed Mater Res Part A*, 73(2):165-170.

125. Neut D, Hendriks JG, van Horn JR, Kowalski RS, van der Mei HC, Busscher HJ. (2006) Antimicrobial efficacy of gentamicin-loaded acrylic bone cements with fusidic acid or clindamycin added. *J Orthop Res*, 24(2):291-299.
126. Gutowski CJ, Zmistowski BM, Clyde CT, Parvizi J. (2014) The economics of using prophylactic antibiotic-loaded bone cement in total knee replacement. *Bone Joint J*, 96-B(1):65-69.
127. Rottger J, Buchholz HW, Engelbrecht E, Siegel A. (1979) Results with Refobacin-Palacos in the changing of infected prostheses. Results of prostheses exchange under cover of Refobacin-Palacos in Hamburg. *Aktuelle Probl Chir Orthop*, 1979(12):211-213.
128. Buchholz HW, Elson RA, Heinert K. (1984) Antibiotic-loaded acrylic cement: current concepts. *Clin Orthop Relat Res*, 1984(190):96-108.
129. Elson RA, Jephcott AE, McGeachie DB, Verettas D. (1977): Antibiotic-loaded acrylic cement. *J Bone Joint Surg Br*, 59(2):200-205.
130. Rottger J, Buchholz HW, Engelbrecht E, Siegel A. (1979) Gentamycin-PMMA in joint prosthesis. Indication and technic in the use of Refobacin-Palacos in joint prosthesis. *Aktuelle Probl Chir Orthop* 1979(12):197-200.
131. Buchholz HW, Engelbrecht H. (1970) Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. *Chirurg*, 41(11):511-515.
132. Klekamp J, Dawson JM, Haas DW, DeBoer D, Christie M. (1999) The use of vancomycin and tobramycin in acrylic bone cement: biomechanical effects and elution kinetics for use in joint arthroplasty. *J Arthroplasty*, 14(3):339-346.
133. Gonzalez Della Valle A, Bostrom M, Brause B, Harney C, Salvati EA. (2001) Effective bactericidal activity of tobramycin and vancomycin eluted from acrylic bone cement. *Acta Orthop Scand*, 72(3):237-240.
134. Anagnostakos K, Schroder K. (2012) Antibiotic-impregnated bone grafts in orthopaedic and trauma surgery: a systematic review of the literature. *Int J Biomater*, 2012:538061.

135. Schmolders J, Hischebeth GT, Friedrich MJ, Randau TM, Wimmer MD, Kohlhof H, Molitor E, Gravius S. (2014) Evidence of MRSE on a gentamicin and vancomycin impregnated polymethyl-methacrylate (PMMA) bone cement spacer after two-stage exchange arthroplasty due to periprosthetic joint infection of the knee. *BMC Infect Dis*, 14:144.
136. Witso E, Persen L, Benum P, Bergh K. (2002) Release of netilmicin and vancomycin from cancellous bone. *Acta Orthop Scand*, 73(2):199-205.
137. Witso E, Persen L, Loseth K, Benum P, Bergh K. (2000) Cancellous bone as an antibiotic carrier. *Acta Orthop Scand*, 71(1):80-84.
138. Witso E, Persen L, Loseth K, Bergh K. (1999) Adsorption and release of antibiotics from morselized cancellous bone. In vitro studies of 8 antibiotics. *Acta Orthop Scand*, 70(3):298-304.
139. Adams CS, Antoci V, Jr., Harrison G, Patal P, Freeman TA, Shapiro IM, Parvizi J, Hickok NJ, Radin S, Ducheyne P. (2009) Controlled release of vancomycin from thin sol-gel films on implant surfaces successfully controls osteomyelitis. *J Orthop Res*, 27(6):701-709.
140. Antoci V, Jr., Adams CS, Parvizi J, Davidson HM, Composto RJ, Freeman TA, Wickstrom E, Ducheyne P, Jungkind D, Shapiro IM. (2008) The inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection. *Biomaterials*, 29(35):4684-4690.
141. Antoci V, Jr., Adams CS, Hickok NJ, Shapiro IM, Parvizi J. (2007) Vancomycin bound to Ti rods reduces periprosthetic infection: preliminary study. *Clin Orthop Relat Res*, 461:88-95.
142. Antoci V, Jr., Adams CS, Parvizi J, Ducheyne P, Shapiro IM, Hickok NJ. (2007) Covalently attached vancomycin provides a nanoscale antibacterial surface. *Clin Orthop Relat Res*, 461:81-87.
143. Antoci V, Jr., King SB, Jose B, Parvizi J, Zeiger AR, Wickstrom E, Freeman TA, Composto RJ, Ducheyne P, Shapiro IM. (2007) Vancomycin covalently bonded to titanium alloy prevents bacterial colonization. *J Orthop Res*, 25(7):858-866.

144. Buttaro MA, Pusso R, Piccaluga F. (2005) Vancomycin-supplemented impacted bone allografts in infected hip arthroplasty. Two-stage revision results. *J Bone Joint Surg Br*, 87(3):314-319.
145. Chen CE, Ko JY, Pan CC. (2005) Results of vancomycin-impregnated cancellous bone grafting for infected tibial nonunion. *Arch Orthop Trauma Surg*, 125(6):369-375.
146. McLaren AC, McLaren SG, Nelson CL, Wassell DL, Olsen KM. (2002) The effect of sampling method on the elution of tobramycin from calcium sulfate. *Clin Orthop Related Res*, 2002(403):54-57.
147. Nelson CL, McLaren SG, Skinner RA, Smeltzer MS, Thomas JR, Olsen KM. (2002) The treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of calcium sulfate tobramycin pellets. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 20(4):643-647.
148. Lindfors NC, Hyvonen P, Nyysönen M, Kirjavainen M, Kankare J, Gulichsen E, Salo J. (2010) Bioactive glass S53P4 as bone graft substitute in treatment of osteomyelitis. *Bone*, 47(2):212-218.
149. Lindfors NC, Koski I, Heikkilä JT, Mattila K, Aho AJ. (2010) A prospective randomized 14-year follow-up study of bioactive glass and autogenous bone as bone graft substitutes in benign bone tumors. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*, 94(1):157-
150. Liu X, Xie Z, Zhang C, Pan H, Rahaman MN, Zhang X, Fu Q, Huang W. (2010) Bioactive borate glass scaffolds: in vitro and in vivo evaluation for use as a drug delivery system in the treatment of bone infection. *Journal of materials science Materials in medicine*, 21(2):575-582.
151. Jia WT, Zhang X, Luo SH, Liu X, Huang WH, Rahaman MN, Day DE, Zhang CQ, Xie ZP, Wang JQ. (2010) Novel borate glass/chitosan composite as a delivery vehicle for teicoplanin in the treatment of chronic osteomyelitis. *Acta Biomater*, 6(3):812-819.



152. Xie Z, Liu X, Jia W, Zhang C, Huang W, Wang J. (2009) Treatment of osteomyelitis and repair of bone defect by degradable bioactive borate glass releasing vancomycin. *J Control Release*, 139(2):118-126.
153. Garvin KL, Miyano JA, Robinson D, Giger D, Novak J, Radio S. (1994) Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model. *J Bone Joint Surg Am*, 76(10):1500-1506.
154. Ambrose CG, Gogola GR, Clyburn TA, Raymond AK, Peng AS, Mikos AG. (2003) Antibiotic microspheres: preliminary testing for potential treatment of osteomyelitis. *Clin Orthop Related Res*, 2003(415):279-285.
155. Ambrose CG, Clyburn TA, Loudon K, Joseph J, Wright J, Gulati P, Gogola GR, Mikos AG. (2004) Effective treatment of osteomyelitis with biodegradable microspheres in a rabbit model. *Clin Orthop Related Res*, 2004(421):293-299.
156. Riegels-Nielsen P, Espersen F, Holmich LR, Frimodt-Moller N. (1995) Collagen with gentamicin for prophylaxis of postoperative infection. *Staphylococcus aureus* osteomyelitis studied in rabbits. *Acta Orthop Scand*, 66(1):69-72.
157. Brin YS, Golenser J, Mizrahi B, Maoz G, Domb AJ, Peddada S, Tuvia S, Nyska A, Nyska M. (2008) Treatment of osteomyelitis in rats by injection of degradable polymer releasing gentamicin. *J Control Release*, 131(2):121-127.
158. Alvarez H, Castro C, Moujir L, Perera A, Delgado A, Soriano I, Evora C, Sanchez E. (2008) Efficacy of ciprofloxacin implants in treating experimental osteomyelitis. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 85(1):93-104.
159. Makinen TJ, Veiranto M, Lankinen P, Moritz N, Jalava J, Tormala P, Aro HT. (2005) In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from osteoconductive bone defect filler. *J Antimicrob Chemother*, 56(6):1063-1068.
160. Koort JK, Makinen TJ, Suokas E, Veiranto M, Jalava J, Knuuti J, Tormala P, Aro HT. (2005) Efficacy of ciprofloxacin-releasing bioabsorbable osteoconductive bone defect filler for treatment of experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(4):1502-1508.
161. Jia WT, Zhang X, Zhang CQ, Liu X, Huang WH, Rahaman MN, Day DE. (2010) Elution characteristics of teicoplanin-loaded biodegradable borate glass/chitosan composite. *Int J Pharm*, 387(1-2):184-186.

162. Miyai T, Ito A, Tamazawa G, Matsuno T, Sogo Y, Nakamura C, Yamazaki A, Satoh T. (2008) Antibiotic-loaded poly-epsilon-caprolactone and porous beta-tricalcium phosphate composite for treating osteomyelitis. *Biomaterials*, 29(3):350-358.
163. Baskin KM, Hunnicutt C, Beck ME, Cohen ED, Crowley JJ, Fitz CR. (2014) Long-term central venous access in pediatric patients at high risk: conventional versus antibiotic-impregnated catheters. *J Vasc Interv Radiol*, 25(3):411-418.
164. Jamal MA, Rosenblatt JS, Hachem RY, Ying J, Pravinkumar E, Nates JL, Chafdari AM, Raad, II. (2014) Prevention of biofilm colonization by Gram-negative bacteria on minocycline-rifampin-impregnated catheters sequentially coated with chlorhexidine. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(2):1179-1182.
165. Crnich CJ, Maki DG. (2005) Are antimicrobial-impregnated catheters effective? When does repetition reach the point of exhaustion? *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41(5):681-685.
166. Chatzinikolaou I, Finkel K, Hanna H, Boktour M, Foringer J, Ho T, Raad I. (2003) Antibiotic-coated hemodialysis catheters for the prevention of vascular catheter-related infections: a prospective, randomized study. *Am J Med*, 115(5):352-357.
167. Schutze GE. (2002) Antimicrobial-impregnated central venous catheters. *Pediatr Infect Dis J*, 21(1):63-64.
168. Pai MP, Pendland SL, Danziger LH. (2001) Antimicrobial-coated/bonded and -impregnated intravascular catheters. *Ann Pharmacother*, 35(10):1255-1263.
169. Monzillo V, Corona S, Lanzarini P, Dalla Valle C, Marone P. (2012) Chlorhexidine-silver sulfadiazine-impregnated central venous catheters: in vitro antibacterial activity and impact on bacterial adhesion. *New Microbiol*, 35(2):175-182.
170. Darouiche RO, Berger DH, Khardori N, Robertson CS, Wall MJ, Jr., Metzler MH, Shah S, Mansouri MD, Cerra-Stewart C, Versalovic J. (2005) Comparison of antimicrobial impregnation with tunneling of long-term central venous catheters: a randomized controlled trial. *Ann Surg*, 242(2):193-200.

171. Tenke P, Koves B, Johansen TE. (2014) An update on prevention and treatment of catheter-associated urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis*, 27(1):102-107.
172. Park JH, Cho YW, Cho YH, Choi JM, Shin HJ, Bae YH, Chung H, Jeong SY, Kwon IC. (2003) Norfloxacin-releasing urethral catheter for long-term catheterization. *J Biomater Sci Polym Ed*, 14(9):951-962.
173. Cho YW, Park JH, Kim SH, Cho YH, Choi JM, Shin HJ, Bae YH, Chung H, Jeong SY, Kwon IC. (2003) Gentamicin-releasing urethral catheter for short-term catheterization. *J Biomater Sci Polym Ed*, 14(9):963-972.
174. Rudy M, Nowakowska M, Wiechula B, Zientara M, Radosz-Komoniewska H. (2004) Antibiotic susceptibility analysis of *Enterococcus* spp. isolated from urine. *Prz Lek*, 61(5):473-476.
175. Gould IM, MacKenzie FM. (2002) Antibiotic exposure as a risk factor for emergence of resistance: the influence of concentration. *J Appl Microbiol*, 92:78-84.
176. Levin PD. (1975) The effectiveness of various antibiotics in methyl methacrylate. *J Bone Joint Surg Br*, 57(2):234-237.
177. McQueen MM, Hughes SP, May P, Verity L. (1990) Cefuroxime in total joint arthroplasty. Intravenous or in bone cement. *J Arthroplasty*, 5(2):169-172.
178. Schierholz JM, Steinhauser H, Rump AF, Berkels R, Pulverer G. (1997) Controlled release of antibiotics from biomedical polyurethanes: morphological and structural features. *Biomaterials*, 18(12):839-844.
179. Schierholz JM, Rump A, Pulverer G. (1996) Drug delivery concepts for the efficacious prevention of foreign-body infections. *Zentralbl Bakteriol*, 284(2-3):390-401.
180. Borzsei L, Mintal T, Horvath A, Koos Z, Kocsis B, Nyarady J. (2006) Comparative study of antibiotic-containing polymethylmethacrylate capsules and beads. *Chemotherapy*, 52(1):1-8.
181. Y. Chang, C-L. Tai, P-H. Hsieh, Ueng SWN. (2013) Gentamicin in bone cement. A potentially more effective prophylactic measure of infection in joint arthroplasty. *Bone Joint Res*, 2013(2):220-226.

182. Galvez-Lopez R, Pena-Monje A, Antelo-Lorenzo R, Guardia-Olmedo J, Moliz J, Hernandez-Quero J, Parra-Ruiz J. (2014) Elution kinetics, antimicrobial activity, and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded acrylic bone cement. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78(1):70-74.
183. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. (1985) Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, 28(2):302-307.
184. Neu HC. (1985) Contribution of beta-lactamases to bacterial resistance and mechanisms to inhibit beta-lactamases. *Am J Med*, 79(5B):2-12.
185. Samuel S, Mathew BS, Veeraraghavan B, Fleming DH, Chittaranjan SB, Prakash JA. (2012) In vitro study of elution kinetics and bio-activity of meropenem-loaded acrylic bone cement. *J Orthop Traumatol*, 13(3):131-136.
186. Solomon AW, Stott PM, Duffy K, Kumar PG, Holliman RE, Bridle SH. (2010) Elution and antibacterial activity of meropenem from implanted acrylic bone cement. *Journal Antimicrob Chemother*, 65(8):1834-1835.
187. Tsourvakas S, Alexandropoulos C, Karatzios C, Egnatiadis N, Kampagiannis N. (2009) Elution of ciprofloxacin from acrylic bone cement and fibrin clot: an in vitro study. *Acta Orthop Belg*, 75(4):537-542.
188. Yang HF, Cheng J, Hu LF, Ye Y, Li JB. (2012) Plasmid-mediated quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(8):4529-4531.
189. Zurfluh K, Abgottspon H, Hachler H, Nuesch-Inderbinen M, Stephan R. (2014) Quinolone resistance mechanisms among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from rivers and lakes in Switzerland. *PloS One*, 9(4):e95864.
190. Winkler H, Kaudela K, Stoiber A, Menschik F. (2006) Bone grafts impregnated with antibiotics as a tool for treating infected implants in orthopedic surgery - one stage revision results. *Cell Tissue Bank*, 7(4):319-323.
191. McLaren RL, McLaren AC, Vernon BL. (2008) Generic tobramycin elutes from bone cement faster than proprietary tobramycin. *Clin Orthop Relat Res*, 466(6):1372-1376.

192. Chang Y, Tai CL, Hsieh PH, Ueng SW. (2013) Gentamicin in bone cement: A potentially more effective prophylactic measure of infection in joint arthroplasty. *Bone Joint Res*, 2(10):220-226.
193. Frank D. (2011) Második generációs polimetil-metakrilát-szorbitol kapszulák - lokális antibiotikumhordozó molekulák kifejlesztése és permeabilitás vizsgálata. Doktori értekezés, Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Medicina Intézet, Fogászati és Szájsebészeti Klinika, Pécs.
194. Schurman DJ, Wheeler R. (1978) Gram negative bone and joint infection: sixty patients treated with amikacin. *Clin Orthop Relat Res*, 1978(134):268-274.
195. de Sanctis J, Teixeira L, van Duin D, Odio C, Hall G, Tomford JW, Perez F, Rudin SD, Bonomo RA, Barsoum WK. (2014) Complex prosthetic joint infections due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a unique challenge in the era of untreatable infections. *International journal of infectious diseases: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 25:73-78.
196. Kuechle DK, Landon GC, Musher DM, Noble PC. (1991) Elution of vancomycin, daptomycin, and amikacin from acrylic bone cement. *Clin Orthop Relat Res*, 1991(264):302-308.
197. Phillips H, Boothe DM, Shofer F, Davidson JS, Bennett RA. (2007) In vitro elution studies of amikacin and cefazolin from polymethylmethacrylate. *Vet Surg*, 36(3):272-278.
198. Ethell MT, Bennett RA, Brown MP, Merritt K, Davidson JS, Tran T. (2000) In vitro elution of gentamicin, amikacin, and ceftiofur from polymethylmethacrylate and hydroxyapatite cement. *Vet Surg*, 29(5):375-382.
199. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Pirini V, Visai L, Speziale P, Montanaro L. (2005) Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*, 26(33):6530-6535.
200. Arciola CR, Donati ME, Montanaro L. (2001) Adhesion to a polymeric biomaterial affects the antibiotic resistance of *Staphylococcus epidermidis*. *New Microbiol*, 24(1):63-68.

201. Lawson MC, Hoth KC, Deforest CA, Bowman CN, Anseth KS. (2010) Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilms using polymerizable vancomycin derivatives. *Clin Orthop Relat Res*, 468(8):2081-2091.
202. Chang Y, Chen WC, Hsieh PH, Chen DW, Lee MS, Shih HN, Ueng SW. (2011) In vitro activities of daptomycin-, vancomycin-, and teicoplanin-loaded polymethylmethacrylate against methicillin-susceptible, methicillin-resistant, and vancomycin-intermediate strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(12):5480-5484.
203. Hofmann CM, Anderson JM, Marchant RE. (2012) Targeted delivery of vancomycin to *Staphylococcus epidermidis* biofilms using a fibrinogen-derived peptide. *J Biomed Mater Res Part A*, 100(9):2517-2525.
204. Chen DW, Chang Y, Hsieh PH, Ueng SW, Lee MS. (2013) The influence of storage temperature on the antibiotic release of vancomycin-loaded polymethylmethacrylate. *Sci World J*, 2013:573526.
205. Hellmark B, Soderquist B, Unemo M, Nilsson-Augustinsson A. (2013) Comparison of *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections and commensal isolates in regard to antibiotic susceptibility, agr type, biofilm production, and epidemiology. *Int J Med Microbiol*, 303(1):32-39.
206. Zhang X, Jia W, Gu Y, Xiao W, Liu X, Wang D, Zhang C, Huang W, Rahaman MN, Day DE. (2010) Teicoplanin-loaded borate bioactive glass implants for treating chronic bone infection in a rabbit tibia osteomyelitis model. *Biomaterials*, 31(22):5865-5874.
207. Tang HJ, Chen CC, Cheng KC, Toh HS, Su BA, Chiang SR, Ko WC, Chuang YC. (2012) In vitro efficacy of fosfomycin-containing regimens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(4):944-950.
208. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. (2005) Adverse effect of staphylococci slime on in vitro activity of glycopeptides. *Jpn J Infect Dis*, 58(6):353-357.
209. Trampuz A, Zimmerli W. (2005) New strategies for the treatment of infections associated with prosthetic joints. *Curr Opin Investig Drugs*, 6(2):185-190.

210. Bassetti M, Vitale F, Melica G, Righi E, Di Biagio A, Molfetta L, Pipino F, Cruciani M, Bassetti D. (2005) Linezolid in the treatment of Gram-positive prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother*, 55(3):387-390.
211. Legout L, Valette M, Dezeque H, Nguyen S, Lemaire X, Loiez C, Caillaux M, Beltrand E, Dubreuil L, Yazdanpanah Y. (2010) Tolerability of prolonged linezolid therapy in bone and joint infection: protective effect of rifampicin on the occurrence of anaemia? *J Antimicrob Chemother*, 65(10):2224-2230.
212. Tattevin P, Arvieux C, Michelet C. (2006) What is the place of teicoplanin and linezolid in the treatment of prosthetic joint infections? *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(12):1241-1242.
213. Kaur S, Harjai K, Chhibber S. (2014) Local delivery of linezolid from poly-D,L-lactide (PDLLA)-linezolid-coated orthopaedic implants to prevent MRSA mediated post-arthroplasty infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 79(3):387-392.
214. Tsiolis P, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mavrogenis AF, Savvidou O, Lalos SN, Frangia K, Lazarettos I, Nikolaou V, Efstathopoulos NE. (2011) Experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with a polylactide carrier releasing linezolid. *Surg Infect*, 12(2):131-135.
215. Analyzing differences in bacterial optical density measurements between spectrophotometers. [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)
216. Bacterial Counts - Quantitative Analysis of Microbes. [biolabs.tmcc.edu](http://biolabs.tmcc.edu)
217. C.L.S.I. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Nineteenth Informational Supplement. In: Wayne, PA, USA, 2009.
218. Squire MW, Ludwig BJ, Thompson JR, Jagodzinski J, Hall D, Andes D: Premixed antibiotic bone cement. (2008) an in vitro comparison of antimicrobial efficacy. *J Arthroplasty*, 23(6 Suppl 1):110-114.
219. Beenken KE, Blevins JS, Smeltzer MS. (2003) Mutation of sarA in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. *Infect Immun*, 71(7):4206-4211.
220. Lamagni T. (2014) Epidemiology and burden of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother*, 69 Suppl 1:i5-10.

221. Alt V, Bechert T, Steinrucke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E, Schnettler R. (2004) In vitro testing of antimicrobial activity of bone cement. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(11):4084-4088.
222. Gallo J, Kolar M, Florschütz AV, Novotný R, Pantucek R, Kesselova M. (2005) In vitro testing of gentamicin-vancomycin loaded bone cement to prevent prosthetic joint infection. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 149(1):153-158.
223. Ludwig E, Székely E, Gabler T, Palos G, Egri L. (2011) Antibiotikum alkalmazási protokoll. Semmelweis Egyetem Gyógyszerterápiás Bizottságának közleménye, Budapest
224. Laki M, Hajdu M, Zahar A, Saska Z, Klebovich I, Szendroi M, Antal I. (2007) Designing antibiotic-containing carrier systems used in bone surgery. *Acta Pharm Hung*, 77(2):108-115.
225. Zahar A, Laki M, Hajdu M, Klebovich I, Antal I, Szendroi M. *Revíziós műtétek során csonthiányok pótlására alkalmazható antibiotikum tartalmú biológiai hordozók hatóanyag-felszabadulásának vizsgálata*, Magyar Ortopéd Társaság 49. Kongresszusa, Budapest, 2006.
226. Laki M, Hajdu M, Zahar A, Klebovich I, Antal I. *Programozott hatóanyagleadású antibiotikum tartalmú biológiai hordozórendszerek tervezése és vizsgálata*, Semmelweis Egyetem, PhD Tudományos Napok, Nagyvárad téri Elméleti Tömb, Budapest, 2007.
227. Szasz M, Hajdu M, Pesti N, Domahidy M, Kristof K, Zahar A, Nagy K, Szabo D. (2013) In vitro efficiency of vancomycin containing experimental drug delivery systems. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 60(4):461-8.
228. Lutro O, Langvatn H, Dale H, Schrama JC, Hallan G, Espehaug B, Sjursen H, Engesaeter LB. (2014) Increasing Resistance of Coagulase-Negative Staphylococci in Total Hip Arthroplasty Infections: 278 THA-Revisions due to Infection Reported to the Norwegian Arthroplasty Register from 1993 to 2007. *Adv Orthop*, 2014:580359.
229. Sousa R, Pereira A, Massada M, da Silva MV, Lemos R, Costa e Castro J. (2010) Empirical antibiotic therapy in prosthetic joint infections. *Acta Orthop Belg*, 76(2):254-259.



230. Rasyid HN, van der Mei HC, Frijlink HW, Soegijoko S, van Horn JR, Busscher HJ, Neut D. (2009) Concepts for increasing gentamicin release from handmade bone cement beads. *Acta Orthop*, 80(5):508-513.
231. El-Husseiny M, Patel S, MacFarlane RJ, Haddad FS. (2011) Biodegradable antibiotic delivery systems. *J Bone Joint Surg Br*, 93(2):151-157.
232. Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, Bannerjee SK. (2012) Drug delivery systems: An updated review. *Int J Pharm Investig*, 2(1):2-11.
233. Oliveira RB, Nascimento TL, Lima EM. (2012) Design and characterization of sustained release ketoprofen entrapped carnauba wax microparticles. *Drug Dev Ind Pharm*, 38(1):1-11.
234. Hornyak I, Madacsi E, Kalugyer P, Vacz G, Horvathy DB, Szendroi M, Han W, Lacza Z. (2014) Increased release time of antibiotics from bone allografts through a novel biodegradable coating. *Biomed Res Int*, 2014:459867.
235. Winkler H, Janata O, Berger C, Wein W, Georgopoulos A. (2000) In vitro release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts. *J Antimicrob Chemother*, 46(3):423-428.
236. Altieri ET, Reeve CM, Sheridan PJ. (1979) Lyophilized bone allografts in periodontal intraosseous defects. *J Periodontol*, 50(10):510-519.
237. LaPlante KL, Mermel LA. (2009) In vitro activities of telavancin and vancomycin against biofilm-producing *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, and *Enterococcus faecalis* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(7):3166-3169.
238. Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R. (2011) In vitro activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Curr Microbiol*, 63(3):313-317.
239. Kadar B, Szasz M, Kristof K, Pesti N, Krizsan G, Szentandrassy J, Rokusz L, Nagy K, Szabo D. (2010) In vitro activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 57(3):235-245.

240. Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, Yang L, Jensen PO, Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Hoiby N, Givskov M. (2008) Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(10):3648-3663.
241. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicro Ag*, 35(4):322-332.
242. Monden K, Ando E, Iida M, Kumon H. (2002) Role of fosfomycin in a synergistic combination with ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *J Infect Chemother*, 8(3):218-226.
243. Kumon H, Ono N, Iida M, Nickel JC. (1995) Combination effect of fosfomycin and ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(5):1038-1044.
244. Tre-Hardy M, Vanderbist F, Traore H, Devleeschouwer MJ. (2008) In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. *Int J Antimicro Ag*, 31(4):329-336.
245. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR. (2008) Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *The J Antimicrob Chemother*, 61(2):273-281.
246. Corvec S, Furustrand T, Ulfberg U, Betrisey B, Borens O, Trampuz A. (2013) Activities of fosfomycin, tigecycline, colistin, and gentamicin against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a foreign-body infection model. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(3):1421-1427.
247. Hellmark B, Unemo M, Nilsson-Augustinsson A, Soderquist B. (2010) In vitro antimicrobial synergy testing of coagulase-negative staphylococci isolated from prosthetic joint infections using Etest and with a focus on rifampicin and linezolid. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 29(5):591-595.
248. Gagnon RF, Richards GK, Wiesenfeld L. (1991) *Staphylococcus epidermidis* biofilms: unexpected outcome of double and triple antibiotic combinations with rifampin. *ASAIO J*, 37(3):M158-160.

249. Kadar B, Kocsis B, Toth A, Damjanova I, Szasz M, Kristof K, Nagy K, Szabo D. (2013) Synergistic antibiotic combinations for colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Microbiol Immunol Hun*, 60(2):201-209.

## 13. Saját publikációk jegyzéke

### *Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények*

1. Szasz M, Lehotkai N, Kristof K, Szabo D, Nagy K: Prevalence and antimicrobial resistance of uropathogens in different inpatient wards. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2009, 56(4):375-87. IF: 0,000

2. Kadar B,# Szasz M,# Kristof K, Pesti N, Krizsan G, Szentandrassy J, Rokusz L, Nagy K, Szabo D: In vitro activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* strains, *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2010, 57(3):235-45. IF: 0,625

# Eredeti közlemény alapján megosztott elsőszereplőség (equal contributed)

3. Kadar B, Kocsis B, Toth A, Damjanova I, Szasz M, Kristof K, Nagy K, Szabo D: Synergistic antibiotic combinations for colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2013, 60(2):201-9. IF: 0,780

4. Szasz M, Hajdu M, Pesti N, Domahidy M, Kristof K, Zahar A, Nagy K, Szabo D: In vitro efficiency of vancomycin containing experimental drug delivery systems. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2013, 60(4):461-8. IF: 0,780

### *Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények*

1. Czirok Sz, Szasz M, Kardos M, Babarczi E, Prinz Gy, Harsanyi J, Voros P: Endocarditishez társuló c-ANCA pozitívással járó immunkomplex glomerulonephritis (közlés alatt)

## 14. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Szabó Dórának a folyamatos konzultációért, továbbá Dr. Kocsis Bélának és Pesti Józsefné Natasának a kísérletekben nyújtott segítségért és a fényképfelvételek készítéséért, illetve Dr. Kádár Bélának, a fenotípusos vizsgálatokért.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Kenessey Istvánnak, az értekezés megírásában nyújtott segítségért és Fekete Gábornak a számítógépes munkáért.

Köszönettel tartozom Dr. Domahidy Mónikának a viaszkorongok elkészítéséért.

Külön köszönettel tartozom kollégáimnak és kutató munkatársaimnak, akik már tudományos diákkörösként is segítettek munkámat:

Dr. Kristóf Katalinnak, az epidemiológiai vizsgálatokban nyújtott segítségért,

Dr. Zahár Ákosnak, az ortopéd-szakmai háttérért és konzultációért

Az Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinika, Orvosi Mikrobiológiai Intézet és a Központi Mikrobiológiai Diagnosztikai Laboratórium összes aszisztensének és laboratóriumi dolgozójának.

Köszönettel tartozom családomnak, de legfőképpen feleségemnek, Dr. Lehotkai Nórának, aki kitartott mellettem a sokszor éjszakába nyúló munkában.

## 15. Az értekezésben szereplő táblázatok jegyzéke

<b>1. táblázat:</b> Véráramfertőzések gyakorisága .....	10
<b>2. táblázat:</b> Osteomyelitis leggyakoribb kórokozói korcsoportok és prediszponáló tényezők szerint .....	10
<b>3. táblázat:</b> <i>S. epidermidis</i> biofilm képzésért felelős virulencia faktorai .....	21
<b>4. táblázat:</b> Alkalmazott és fejlesztés alatt álló DDS-ek az ortopédiában.....	27
<b>5. táblázat:</b> MIC értékek 14 biofilm képző <i>P. aeruginosa</i> törzs esetében.....	48
<b>6. táblázat:</b> BHI-ben mért vancomycin koncentrációk a kioldódást követően.....	62
<b>7. táblázat:</b> MBIC értékek 14 biofilm képző <i>P. aeruginosa</i> törzs esetében.....	64
<b>8. táblázat:</b> 8 biofilm képző <i>P. aeruginosa</i> törzshöz tartozó FIC-index értékek.....	67
<b>9. táblázat:</b> Antibiotikum kombinációk hatékonyságának megoszlása 8 biofilm képző <i>P. aeruginosa</i> törzs esetében.....	68
<b>10. táblázat:</b> Európai centrumok és az SE-OK epidemiológiai eredményeinek összehasonlítása .....	73
<b>11. táblázat:</b> Osteomyelitis kezelése a Semmelweis Egyetem antibiotikum alkalmazási protokollja alapján .....	76
<b>12. táblázat:</b> Biofilm képző törzsekkel szemben szinergizmust mutató antibiotikum kombinációk .....	83

## 16. Az értekezésben szereplő ábrák jegyzéke

<b>1. ábra:</b> Primer véráram fertőzések halálzási adatai a NNSR 2011. évi jelentése alapján, kórokozók szerint.....	14
<b>2. ábra:</b> Septopal-lánc .....	24
<b>3. ábra:</b> Csíraszám meghatározása hígítási módszerrel .....	37
<b>4. ábra:</b> Kétféle antibiotikum szinergizmusának meghatározása .....	44
<b>5. ábra:</b> A Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján 2001 és 2011 között regisztrált ortopédiai protézis fertőzések kórokozó spektruma .....	47
<b>6. ábra:</b> <i>S. epidermidis</i> tenyésztete MH és véres agaron .....	47
<b>7. ábra:</b> Az eltérő vancomycin koncentrációkhoz tartozó gátlási zónák átmérőjének a vizsgálata különböző tápoldatokban.....	49
<b>8. ábra:</b> <i>S. epidermidis</i> növekedési kinetikája MH leves II tápoldatban eltérő vancomycin koncentrációk mellett.....	52
<b>9. ábra:</b> <i>S. epidermidis</i> növekedési kinetikája BHI tápoldatban eltérő vancomycin koncentrációk mellett.....	52
<b>10. ábra:</b> <i>S. epidermidis</i> növekedési kinetikája TG tápoldatban eltérő vancomycin koncentrációk mellett.....	53
<b>11. ábra:</b> <i>S. epidermidis</i> növekedési kinetikája fiziológiás sóoldatban eltérő vancomycin koncentrációk mellett.....	53
<b>12. ábra:</b> Csíraszám csökkenése eltérő vancomycin tartalmú Wax1 és Wax2 viaszkorongok esetében az idő függvényében.....	55
<b>13. ábra:</b> Telepek számának csökkenése 4mg vancomycint tartalmazó Wax1 viaszkorong esetében MH tápoldaton 10 <sup>5</sup> hígításnál .....	55
<b>14. ábra:</b> Telepek számának csökkenése 4mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong esetében MH tápoldaton 10 <sup>5</sup> hígításnál.....	56
<b>15. ábra:</b> Wax1 és Wax2 viaszkorongok baktérium ölési kinetikája 0,5 mg vancomycin tartalom esetén a kontroll tápoldathoz viszonyítva .....	57
<b>16. ábra:</b> Wax1 és Wax2 viaszkorongok baktérium ölési kinetikája 1 mg vancomycin tartalom esetén a kontroll tápoldathoz viszonyítva .....	57

<b>17. ábra:</b> Wax1 és Wax2 viaszkorongok baktérium ölési kinetikája 2 mg vancomycin tartalom esetén a kontroll tápoldathoz viszonyítva .....	58
<b>18. ábra:</b> Wax1 és Wax2 viaszkorongok baktérium ölési kinetikája 4 mg vancomycin tartalom esetén a kontroll tápoldathoz viszonyítva .....	58
<b>19. ábra:</b> Gátlási zónák mérete 0,5, 1, 2 és 4mg vancomycint tartalmazó Wax1 viaszkorong esetében .....	59
<b>20. ábra:</b> Gátlási zónák mérete 0,5, 1, 2, és 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong esetében .....	60
<b>21. ábra:</b> 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong és az 1 µg/ml vancomycin koncentrációt tartalmazó különböző tápoldatok <i>S. epidermidis</i> növekedési kinetikájára kifejtett hatásának összehasonlítása .....	62
<b>22. ábra:</b> <i>P. aeruginosa</i> biofilm képzésének igazolása safraninos festési eljárással.....	63
<b>23. ábra:</b> Antibiotikumok átlagolt MIC és MBIC értékeinek összehasonlítása 14 biofilm képző <i>P. aeruginosa</i> törzs esetében.....	65
<b>24. ábra:</b> Liofilizált csont és viaszkorong.....	75