

# Szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszer *in vitro* mikrobiológiai vizsgálata

Doktori tézisek

**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

# Bevezetés

Az orvosi gyakorlatban a testidegen anyagok beültetése speciális problémákat vet fel. Az ortopédiában használt protézis, műbillentyű, centrális vénás katéter, perifériás vénás kanül beültetésével vagy húgyúti katéter illetve nephrostoma bevezetésével ideális felszín hozunk létre a mikrobák szaporodására. Kanülok 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. A baktériumok ezt követően az idegen felületről a vér-és nyirokkeringés segítségével távoli szervekbe juthatnak, úgynevezett szeptikus metasztázisokat hozhatnak létre, illetve szövődményként véráram fertőzés (bloodstream infection, BSI) alakulhat ki.

Az ortopédiai protézis fertőzésének (prosthetic joint infection, PJI) leggyakoribb oka a szervezetben szunnyadó infekciós folyamatok reaktiválódása. A véráram segítségével a lappangó gócból érkező kórokozók megtapadhatnak a beültetett protézis felszínén és környező csontszövetben osteomyelitis hozhatnak létre. A PJI-k másik oka a protézis beültetés során bevitt nozokomiális flóra kolonizációja, amikor a beteg bőréről fakultatív patogén kórokozók kerülnek a műtési területre. A széles körben protézis rögzítésére alkalmazott, hőtermelő szintetikus cement (akrilátok) lokális nekrozist okoz, majd a protézist hematoma veszi körül, ennek következtében a műtét során bekerült baktériumok hetek múltával gennyesedést okozhatnak. A fellépő infekció során letokolt folyamat veszi kezdetét. A fertőzött protézis állandó lehetőséget teremt a visszatérő BSI kialakulására. Ezen felül a protézis szeptikus kilazulása is bekövetkezhet, ami további reoperációkat tesz szükségessé.

A protézis fertőzéseket okozó törzsek képesek adhéziós faktorokat termelni, amelyekkel kitapadnak az idegen felületre. A baktérium által termelt glycocalyx ligandként kötődik a megszilárdult polimetil-metakrilát (PMMA) felületére. A protézis felszínén elsősorban *Staphylococcus epidermidis* alakít ki biofilmet. A Gram-negatív baktériumok közül a biofilm képző *Pseudomonas aeruginosa* törzsek okozta szeptikus folyamatokkal kell számolnunk.

Az 1950-es évektől egyre több helyről jelentettek koaguláz-negatív *Staphylococcus* spp. (CNS) fertőzéseket. A CNS fertőzések aránya 2000 után az USA és Európa kórházaiban ugrásszerű növekedést mutatott. A folyamat eredményeként a Gram-pozitív baktériumok – ezen belül a *S. epidermidis* - dominánssá váltak az idegen testekhez, így pl. az ortopédiai

protézisekhez köthető kórházi fertőzésekben. Napjainkban a Gram-negatív baktériumok okozta PJI-k számának előretörése észlelehető.

A kiterjedt béta-laktám antibiotikum használat hozzájárult a meticillin rezisztens *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) törzsek elterjedéséhez. A meticillin rezisztens törzsek invazivitása a meticillin érzékeny (meticillin susceptible *Staphylococcus epidermidis*, MSSE) törzsekét meghaladja, ezért sok esetben az ortopédiai protézisek környékén, a mélyebb szövetek felé terjedő infekciók (deep-prosthetic joint infections, DPJI) elsőszámú kóroki tényezőjeként szerepel. Az MRSE törzsek emellett csökkent érzékenységet mutatnak a glikopeptidokkal szemben. Több tanulmány igazolta, hogy az MRSE törzsekkel szembeni aminoglikozid rezisztencia Nyugat-Európában jelenleg átlagosan 60 % felett van.

A protézisek felszínén megtapadó baktériumok patogén folyamatait szisztémás terápiával a gyenge szöveti penetráció miatt nehéz befolyásolni. Az ortopédiában 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. Az ADS-ek két csoportra oszthatóak: nem biodegradábilis és biodegradábilis rendszerekre. A nem biodegradábilis rendszerre jó példa a gentamicint tartalmazó PMMA golyócskákból álló Septopal-lánc. A biodegradábilis rendszerek közös jellemzője, hogy a beültetést követően nincs szükség az eltávolításukra, jelentősen csökkentve ezzel újabb infekció kialakulásának kockázatát. Az antibiotikum leadást követően a hordozóanyagot a szervezet elbontja 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. Évtizedek óta a klinikai gyakorlatba sikerrel bevezetett gentamicin és tobramycin tartalmú DDS-ek alkalmazhatóságának az előretörő antibiotikum rezisztencia szab gátat. Újabb fejlesztésű antibiotikum felszabadítású rendszerekhez vancomycint, teicoplanint, illetve amikacint kötnek, mert ezek az antibiotikumok napjainkban nagyobb sikerrel alkalmazhatóak *S. epidermidis* okozta protézis fertőzések esetén.

## Kutatási munkánk célkitűzései

- 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 *Staphylococcus epidermidis* növekedési kinetikájának összehasonlítása különböző tápoldatokban.
- Célkitűzésinkben szerepelt két eltérő összetételű, különböző vancomycin tartalmú, szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszer *Staphylococcus 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 a *Pseudomonas aeruginosa* törzsek biofilm képző képességének a vizsgálata.
- Végül célul tűztük ki a *Pseudomonas aeruginosa* törzsekkel szemben hatékony, biofilm képzést gátló antibiotikum kombinációk meghatározását.

# Anyag és módszer

## **Adatok összesítése**

A Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáján 2001 és 2010 között végzett szeptikus műtétek és az észlelt posztoperatív sebfertőzések tenyésztési eredményeinek regisztrálása a Semmelweis Egyetem Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Laboratóriumában történt.

## **Mikrobiológiai minták feldolgozása**

Az epidemiológiai vizsgálatokhoz 2001 és 2011 között összegyűjtött klinikai minták szállítása transzport médiumban (Amies Agar Gel, 108C, Copan Diagnostics Inc, USA) történt. A kísérletekhez használt baktérium törzsek tárolása 20 % glicerint tartalmazó tripszines szója tápoldatban (TSB) történt -80 °C-on. A kísérletek előtt a baktériumokat felélesztettük.

## **Baktérium törzsek**

A hatóanyag leadás vizsgálatokhoz és a növekedési kinetika meghatározásához a *S. epidermidis* ATCC 35984 törzsét használtuk fel (LGC Standards GmbH, Germany). Kontroll törzsként a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 törzsét alkalmaztuk (Becton-Dickinson, USA). A biofilm képzéses vizsgálatokhoz klinikai mintákból izolált, 60 *P. aeruginosa* törzset használtunk fel, melyek a Magyar Honvédség Egészségügyi Központ Mikrobiológiai Laboratóriumából származtak. Pozitív kontroll törzsként a *S. aureus* ATCC 12600 törzsét, negatív kontrollként a *S. epidermidis* ATCC 12228 törzsét használtuk (LGC Standards GmbH, Germany).

## **Különböző antibiotikumok minimális gátló koncentrációjának meghatározása**

A Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) és a National Committee Of Clinical Laboratory Standard (NCCLS) ajánlásainak megfelelően a minimális gátló koncentrációt (MIC) a következő antibiotikumoknál mikrodilúciós módszerrel határoztuk meg: piperacillin/tazobaktám, ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, gentamicin, amikacin, netilmicin, tobramycin, ciprofloxacin, levofloxacin, chlorithromycin.

## **Baktérium csíraszám meghatározása**

A tápoldatok adott időponthoz köthető csíraszámát hígítási módszerrel határoztuk meg. A tápoldatok kiindulási csíraszámának beállítása a McFarland-mérő (BD PhoenixSpec, Becton-Dickinson, USA) készülék denzitometriás elvei alapján történt.

### **Tápanyagok vancomycin koncentrációjának meghatározása**

A BHI (brain-heart infusion), a TG (tioglikolát), az MH (Müller-Hinton) leves II tápanyagokban és a fiziológiás sóoldatban, eltérő időpontokban, észlelhető vancomycin koncentrációkat papírkorong módszerrel határoztuk meg. Ezt követően a vancomycin csökkenő hígítási sorához hozzárendeltük az adott koncentráción létre jövő gátlási zónák átmérőjét (kalibrációs görbe).

### ***Staphylococcus epidermidis* növekedési kinetikájának vizsgálata**

A baktérium növekedési kinetikájának vizsgálatát hígítási módszer segítségével végeztük. A maximálisan ( $10^5$ ) hígított szuszpenziókból MH szilárd tápanyagokon baktérium pázsitot készítettünk, majd inkubálást követően telepszámlálást végeztünk.

### **Viaszkorongok antibakteriális hatásának vizsgálata**

Módszerünkhöz használt Wax1 (Cera alba : Precirol® : Vaseline album 45 : 45 : 10 arányú elegye) és Wax2 (Cera alba : Precirol® 50 : 50 arányú elegye) viaszkorongok rendre 0,5, 1, 2 és 4 mg vancomycint tartalmaztak, így összesen 2x4 féle korong állt rendelkezésünkre. A viaszkorongok *S. epidermidis*re kifejtett baktériumölő képességét (time-kill curve) BHI tápanyagban, hígítási módszerrel vizsgáltuk.

### **Viaszkorongok antibiotikum leadásának vizsgálata szilárd tápanyagon**

A DDS baktériumölő képességét a Wax1 és Wax2 viaszkorongok 0,5, 1, 2 és 4 mg vancomycint tartalmazó változatai körül a *S. epidermidis* tenyészetén kialakuló gátlási zónák átmérőjének mértékével demonstráltuk (Bauer-Kirby módszer).

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

A Wax1 és Wax2 viaszkorongok 0,5, 1, 2 és 4 mg vancomycint tartalmazó változataiból a BHI tápanyagba kioldódó antibiotikum mennyiségét a *B. subtilis* ATCC 6633 törzseiből készített pázsiton papírkorong módszer segítségével határoztuk meg.

### **Biofilmképzés fenotípusos vizsgálata**

A vizsgálat során a *P. aeruginosa* klinikai izolátum törzseiből 96 lyukú mikrotiter lemez mélyedéseibe szuszpenziókat mértünk. Foszfát-pufferrel történt öblítés után a kitapadt sejteket etanollal fixáltuk, majd safraninnal festést végeztünk.

### **A minimális biofilmgátló koncentráció meghatározása**

A minimális biofilmgátló koncentráció (MBIC) meghatározásához mikrodilúciós módszert használtuk. Ezt követően a fenotípusos vizsgálatnál ismertetett módon vizsgáltuk a biofilm képzést.

### **Frakcionált biofilmgátló koncentráció és a frakcionált gátló koncentráció index meghatározása**

A frakcionált biofilmgátló koncentráció (FBIC) meghatározásához a MIC meghatározásánál ismertetett 12 féle antibiotikumból kiválasztottunk kettőt (A és B), melyekből hígítási sorozatot készítettünk 96 lyukú mikrotiter lemez mélyedéseibe, a lemez hosszabb és rövidebb oldalának megfelelően. Ezt követően a lemez köztes mélyedéseibe összeállítottuk az A és B antibiotikum kombinációját, majd hozzáadtuk a *P. aeruginosa* törzsekből készült szuszpenziót. A biofilmképzés kvalitatív vizsgálata safraninos festéssel történt. 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: szinergista ( $\Sigma FBIC \leq 0,5$ ); részlegesen szinergista ( $0,5 < \Sigma FBIC \leq 1$ ); indifferens ( $1 < \Sigma FBIC \leq 4$ ); antagonistista ( $4 < \Sigma FBIC$ )

### **Statisztikai számítások**

Különböző tápoldatokban a növekedési kinetikákat korrelációs együttható kiszámításával hasonlítottuk össze. A viaszkorongok által kifejtett baktérium ölési kinetika vizsgálatokhoz és a vancomycin leadás méréséhez többszörös lineáris regressziós modellt (General Linear Model, GLM) használtuk. A csoportok összehasonlításához Fischer-féle tesztet (least significant difference, LSD) alkalmaztunk. A viaszkorongok által kifejtett csíraszám csökkenés összehasonlítását kétmintás t-próbával végeztük. A vancomycin csúcskoncentrációk összehasonlítása kétszemponos varianciaanalízissel (ANOVA-teszt) történt. Minden esetben  $p \leq 0,05$  esetén az eltérést szignifikánsnak tekintettük.

## Eredmények

### A posztoperatív protézis fertőzések retrospektív epidemiológiai vizsgálata

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 %). *S. aureus* 25 %-ban okozott infekciót. A *P. aeruginosa* 8 %-ban volt felelős az ortopédiai fertőzésekért.

### Minimális gátló koncentráció meghatározása

A 14 biofilm képző *P. aeruginosa* klinikai izolátummal szemben vizsgált antibiotikumok MIC értékeit az 1. táblázat foglalja össze.

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

Antibiotikumok	Átlag MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	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
Ciprofloxacin	256	512	8–1024
Levofloxacin	32	62	2–256
Amikacin	4	32	2–1024
Gentamicin	128	256	1–256
Tobramycin	128	512	2–>1024
Netilmici	4	>256	1–>256
Clarithromycin	256	>1024	32–>1024

### Különböző tápoldatok vancomycin koncentrációjának meghatározása

BHI és MH leves II közegben 2  $\mu\text{g/ml}$  vancomycin koncentrációhoz tartozó gátlási zóna átmérője 18 mm volt. Fiziológiás sóoldat esetében 2  $\mu\text{g/ml}$  vancomycin koncentráció mellett 19 mm átmérőjű gátlási zónát mértünk. TG tápoldat és fiziológiás sóoldat esetén 0,125  $\mu\text{g/ml}$  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 képződött.

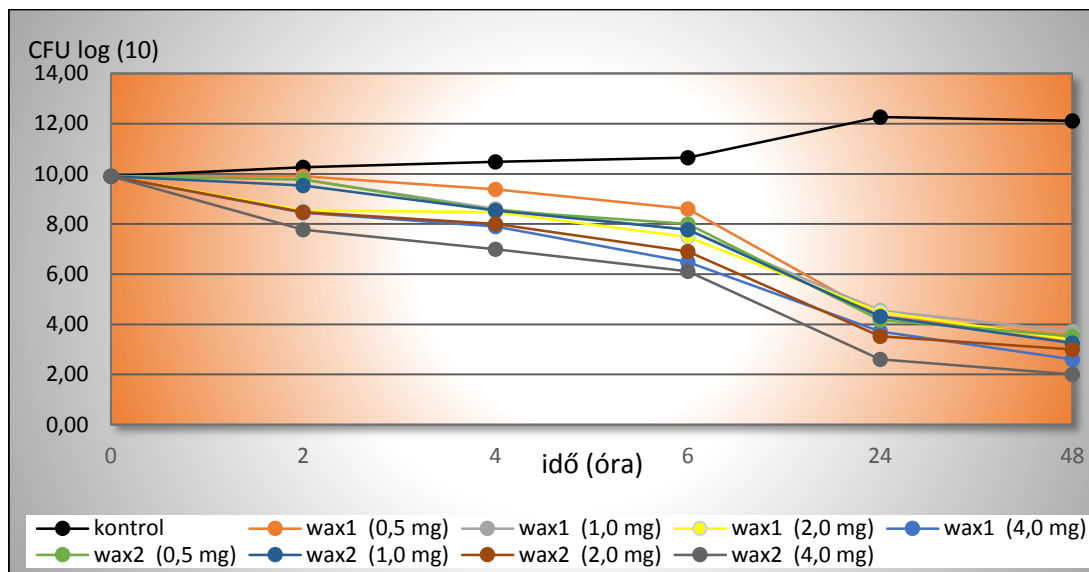
### ***Staphylococcus epidermidis* növekedési kinetikájának vizsgálata**

Az MH leves és TG tápoldatok csíraszám csökkentő kinetikája és a fiziológiás sóoldatban észlelet csíraszám csökkenés mértéke között pozitív, rendkívül szoros korrelációt tapasztaltunk. BHI és fiziológiás sóoldat között pozitív, szoros korrelációt figyeltünk meg. MH tápoldatban 2, 4 és 8 µg/ml vancomycin koncentráció mellett a baktériumok kezdeti növekedési fázisa elmaradt, plató fázist követően 4 óra elteltével drasztikus csíraszám csökkenést észleltünk. 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, kontroll BHI tápoldatban észleltük a *S. epidermidis* legintenzívebb szaporodását. A vancomycint nem tartalmazó fiziológiás sóoldatban a baktériumok száma 24 óra elteltével a kiindulási csíraszám alá csökkent.

### **Viaszkorongok antibakteriális hatásának vizsgálata**

A növekedési kinetika vizsgálata alapján a viaszkorongot nem tartalmazó közegben a csíraszám folyamatosan emelkedett. Wax1 és Wax2 viaszkorongok esetében a baktérium csíraszám folyamatos csökkenését észleltük BHI-ben (1. ábra). A legerősebb antibakteriális hatást a Wax2 viaszkorong 4 mg vancomycint tartalmazó változata fejtette ki: 2 óra elteltével a csíraszám több, mint két nagyságrenddel csökkent, 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.

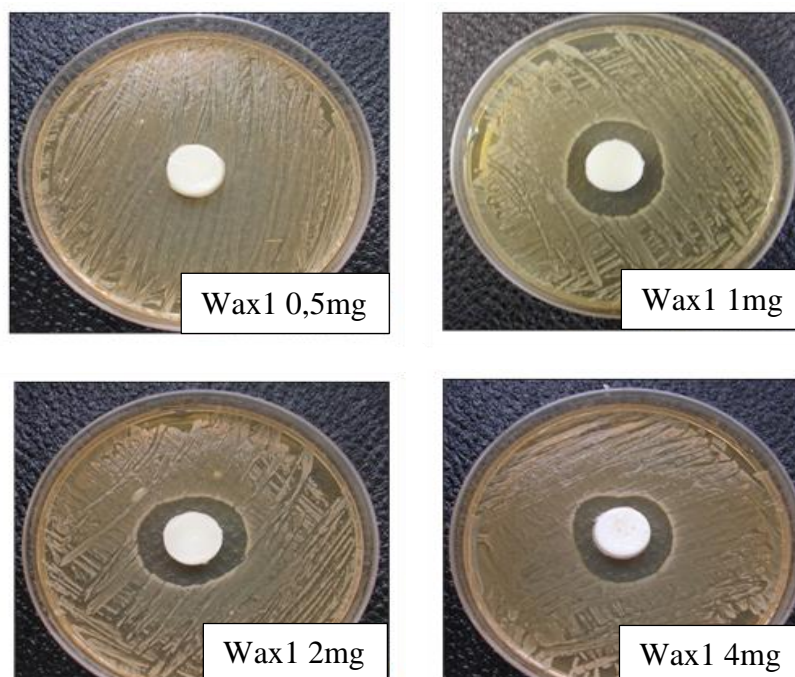
A Wax2 viaszkorong 4 mg vancomycint tartalmazó változatának BHI-s oldatában 4 óra elteltével a szabad vancomycint tartalmazó oldathoz képest jelentősen - majdnem egy nagyságrenddel - nagyobb csíraszám csökkenést detektáltunk. Az 1 és 2 mg vancomycint tartalmazó viaszkorongok oldata esetében 6 óra elteltével 0,5 mg vancomycint tartalmazó változatok esetében a 24. óra elteltével következett be jelentősebb csíraszám csökkenés.



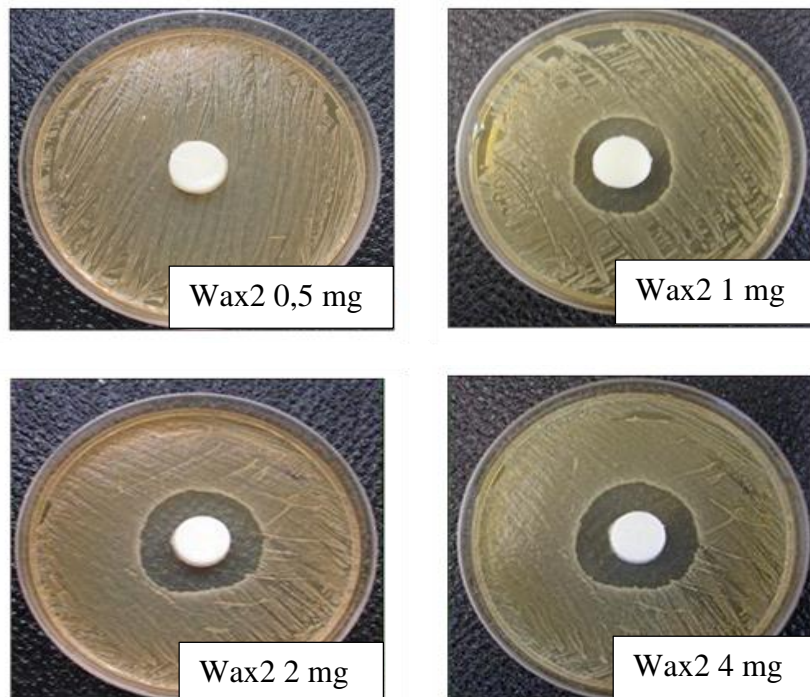
**1. ábra:** Csíraszám csökkenése eltérő vancomycin tartalmú Wax1 és Wax2 viaszkorongok esetében az idő függvényében.

### Viaszkorongok vancomycin leadásának vizsgálata szilárd táptalajon

A Wax1 és Wax2 típusú viaszkorongok 0,5 mg vancomycin tartalom mellett nem hoztak létre gátlási zónát. 1 mg, vagy annál nagyobb antibiotikum tartalom esetén mind két korong típus 18 mm-nél nagyobb gátlási zónát hozott létre egy éjszakán át történt inkubálást követően (2. és 3. ábra).



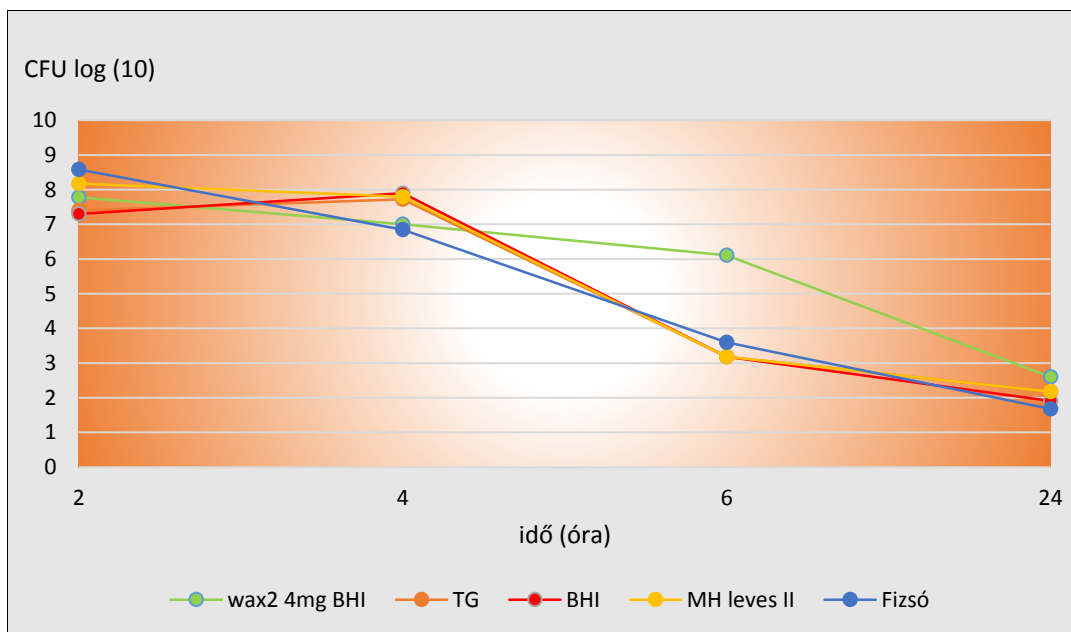
**2. ábra:** Gátlási zónák mérete 0,5, 1, 2 és 4mg vancomycint tartalmazó Wax1 viaszkorong esetében egy éjszakán történt inkubálást követően (saját felvétel).



**3. ábra:** Gátlási zónák mérete 0,5, 1, 2, és 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong esetében egy éjszakán történt inkubálást követően (saját felvétel).

### Viaszkorongok vancomycin leadásának vizsgálata folyékony közegben

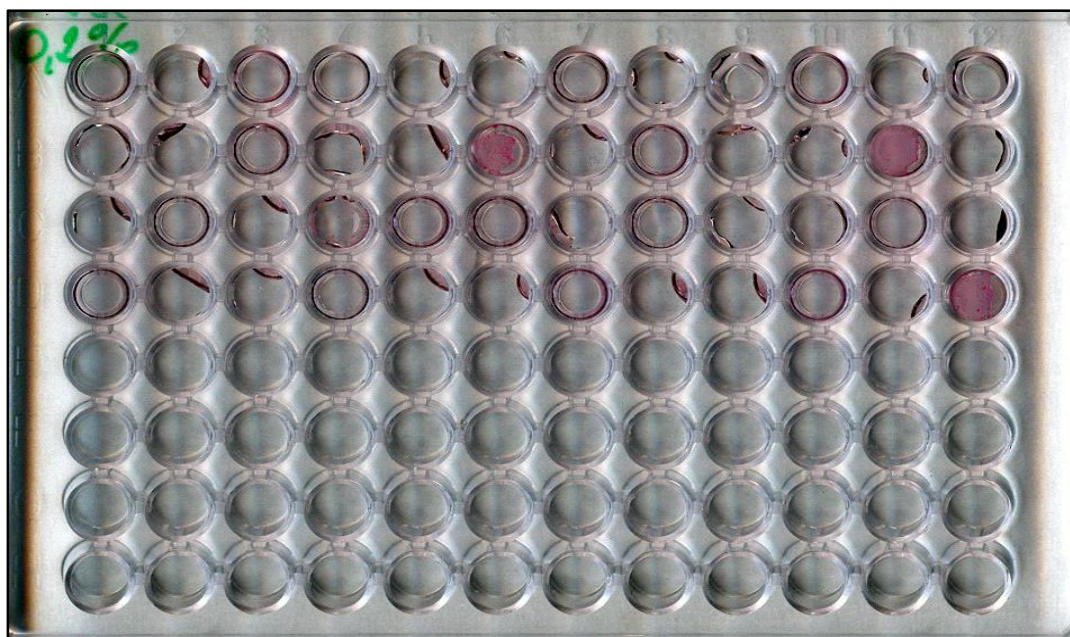
Általánosságban elmondható, hogy a Wax2 viaszkorongból a vancomycin kioldódás hamarabb következett be (szignifikáns különbség,  $p = 0,0134$ ). A vancomycin koncentráció és az inkubációs idő között szignifikáns összefüggést tapasztaltunk ( $p = 0,000001$ ). A csúcskoncentráció Wax1 viaszkorong 0,5 mg vancomycint tartalmazó változata esetében 0,25  $\mu\text{g/ml}$ , míg Wax2 viaszkorong 4 mg vancomycint tartalmazó változatánál 1  $\mu\text{g/ml}$  volt. Wax2 viaszkorong 4 mg vancomycint tartalmazó változata esetében mért antibiotikum csúcskoncentráció szignifikáns különbséget mutatott a 0,5, az 1 és a 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 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong típus BHI-s oldatának csíraszám csökkentő hatása és a különböző tápoldatok csíraszám csökkentős hatása között pozitív, szoros korreláció igazolódott, fiziológiás sóoldattal összehasonlítva pedig rendkívül szoros, pozitív korrelációt figyeltünk meg (4. ábra).



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

#### Biofilm képzés fenotípusos vizsgálata

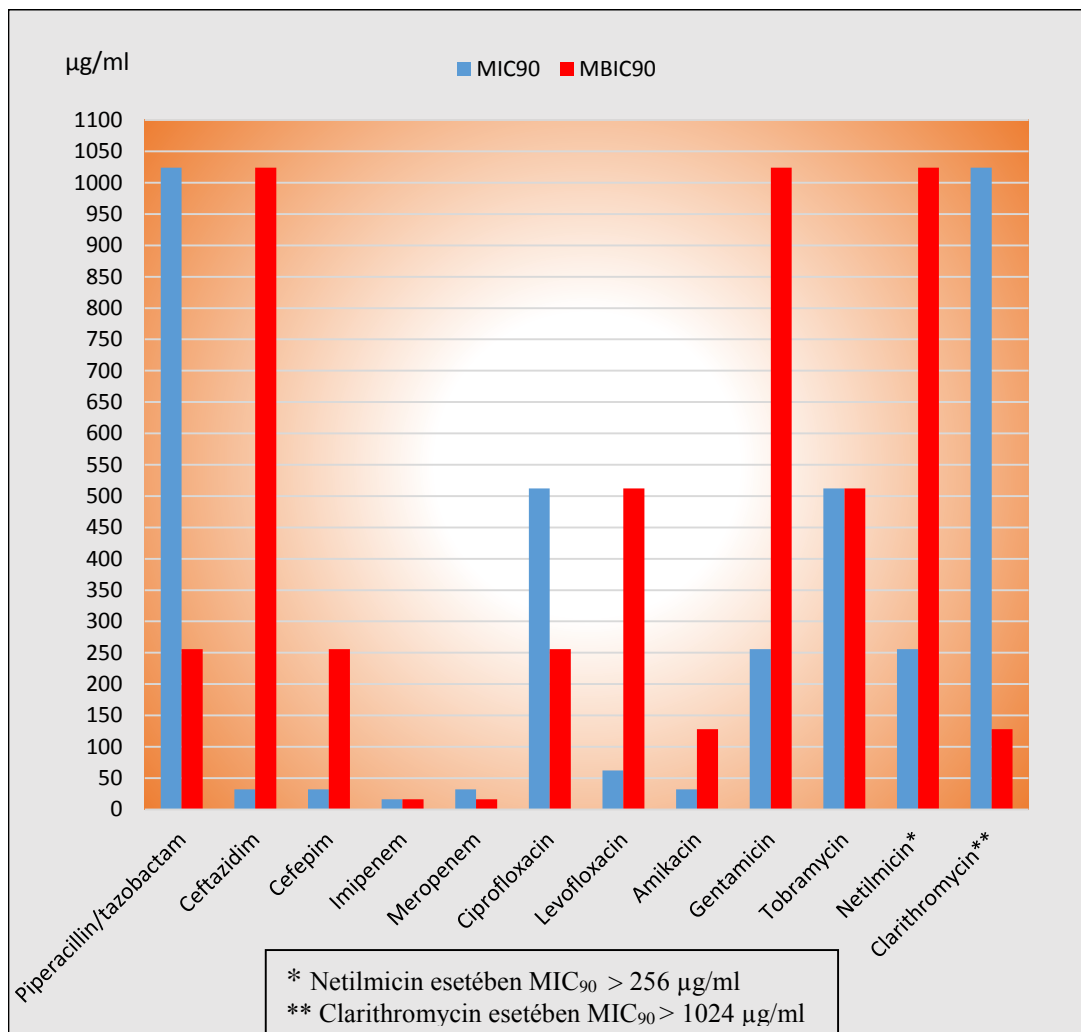
A 60 klinikai *P. aeruginosa* izolátumból 14 (23.3 %) bizonyult biofilm képzőnek. A bakteriális biofilm safraninnal történt festése az 5. ábrán látható.



**5. ábra:** *P. aeruginosa* biofilm képzésének igazolása safraninos festési eljárással. A mélyedésekben lila elszíneződés jelzi a biofilm létrejöttét.

### Minimális biofilm képzést gátló koncentráció meghatározása

Három antibiotikum bizonyult effektív biofilm képzést gátló vegyületnek: a meropenem, a piperacillin/tazobaktám és a clarithromycin. A három említett antibiotikum esetében mértük a legalacsonyabb MBIC<sub>50</sub> értékeket. Az MBIC piperacillin/tazobaktám, ciprofloxacín és clarithromycin esetében legalább kétszer kisebb volt a MIC értéknél. Piperacillin/tazobaktám esetében MBIC<sub>50</sub> 512-szer alacsonyabb volt, mint a MIC<sub>50</sub>. A MIC és MBIC értékek összehasonlítása a 6. ábrán látható.



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

## **A frakcionált biofilmgátló koncentráció és frakcionált gátló koncentráció index meghatározása**

*P. aeruginosa* izolátumok közül nyolc törzs 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 szinergizmust mutatott a törzsek felével szemben. Szinergizmust tapasztaltunk clarithromycin-aminoglikozid és fluorokinolon-ceftazidim esetében. Antagonista hatás érvényesült clarithromycin-meropenem és clarithromycin-cefepim esetében a biofilm képző törzsek 62.5 illetve 75 %-ában. Az aminoglikozid antibiotikumokat nagyon alacsony FIC-index értékek jellemezték.

## Megbeszélés

Az epidemiológiai összehasonlítás korlátját az adja, hogy a 2001 és 2010 közötti intervallumban kevés európai országban folytattak hasonló vizsgálatokat. Néhány ország évente végez surveillance felmérést országos szinten, így feltérképezhető az adott ország kórházaiban észlelt fertőzések kórképek gyakorisága. A hazai viszonyokat jól tükrözi, hogy számos intézmény egyáltalán nem szolgáltat adatokat az Országos Epidemiológiai Központ (OEK) által kezdeményezett éves, országos surveillance vizsgálatokhoz. A vizsgálatunk adatai nagy általánosságban korreláltak az európai centrumokban folytatott vizsgálatok eredményeivel. *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 gyakrabban fordultak elő.

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 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. 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. Fiziológiás só oldat sokáig képes stacioner fázisban tartani a baktériumokat, de tápanyagok hiányában vancomycin nélkül is meredek csíraszám csökkenést észleletünk.

A vizsgált szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszerünk három összetevőből állt:

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

A viasz biodegradábilis hordozóanyagként történő alkalmazása új módszernek számít. A viaszt az antibiotikum leadását követően a szervezet makrofágjai eltávolítják a szanálódott infekciós gócból. Az antibiotikum - hordozóanyag komplexumot szilárd, szerkezettel rendelkező cellában kell a fertőzés helyére beültetni, mivel csak így tudja biztosítani a lokális, hosszabb ideig fenntartható MIC koncentrációt. Ennek az elvárásnak eleget téve, mátrix szerkezetű,

liofilizált csont használható fel. A szivacsos csontállomány esetében a viasz molekulák bediffundálnak a belsejébe, így a hordozóanyag homogén eloszlást mutat. A liofilizált csont előnye, hogy a szerkezet számára vitalizálható szövetként beépül a csontszövetbe. A vancomycin alkalmazásának legfőbb előnye, hogy a baktérium szaporodása közben a sejtfalszintézist két lépésben gátolja.

Korábbi tanulmányok in vitro vizsgálatokban a vancomycin MIC értéket 2 µg/ml-ben határozták meg *S. epidermidis* ATCC 35984 számú törzsével szemben. Kísérleteinkben 1 µg/ml vancomycin koncentráció jelentős csíraszám csökkentő hatással bírt mind a három tápoldatban. A folyékony közegben végzett kioldódási vizsgálat során 4 mg vancomycint tartalmazó Wax2 viaszkorong esetében a többi rendszerhez képest szignifikánsabb csíraszám csökkenést észleltünk. Más vizsgálatok vancomycin ilyen koncentrációjánál jelentkező csíraszám csökkentő hatást daptomicin és rifampicin alkalmazása esetében igazoltak.

A Wax1 és Wax2 viaszkorongok 1, 2 és 4 mg vancomycin tartalom mellett hat napig gátolták a *S. epidermidis* növekedését szilárd tápoldaton. A gátlási zóna körül új telepek sem képződtek, ami arra utalt, hogy elhúzódó, egyenletes hatóanyag leadás mellett nem szelektálódtak ki vancomycin rezisztens törzsek. Mind a nyolc ADS egyenletesen szabadította fel a vancomycint, ezért minden esetben a *S. epidermidis* csíraszama fokozatosan csökkent. Exponenciálisan jellemezhető CFU csökkenést a Wax2 viaszkorong 4 mg vancomycint tartalmazó típusánál értünk el. Ez a viaszkorong típus egyenletesen, 1 µg/ml vancomycin koncentrációt biztosított a tápoldatban. Viaszkorongok esetében a kristályos vancomycint tartalmazó tápoldatokra jellemző kezdeti baktérium növekedési fázis elmaradt, ami szintén kiegyensúlyozott hatóanyag leadásra utalt.

A biofilm réteg safraninnal történő megfestése egyszerű és költséghatékony kvalitatív módszer, és jól használható olyan esetekben, amikor el kell döntenünk, vajon a vizsgált törzs képes-e biofilmet létrehozni. A vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a ceftazidim fluorokinolonokkal és az aminoglikozidok clarithromycinnel történt kombinálása kimagaslóan szinergista módon gátolta a *P. aeruginosa* biofilm képzését. A clarithromycin lényegében hatástalan a *P. aeruginosa*val szemben (a baktérium planktonikus fázisban is rezisztens), ugyan akkor képes gátolni a baktérium N-acil L-homoszerin lakton mediált quorum sensing mechanizmusát, amely *P. aeruginosa* esetében biofilm termelésért felelős gének expresszióját indítja be. A clarithromycin jól kombinálható más antibiotikumokkal, többségükkel szinergista hatást fejt ki. Cefepimmal történt kombinációja azonban antagonista hatást fejt ki, ami azért lényeges, mert a cefepim az egyik, széles körben használt, *P. aeruginosa* ellenes antibiotikum.



## Következtetések

1. Vizsgálatunkban a *S. epidermidis* okozta fertőzések aránya megfelel az európai centrumokban tapasztaltaknak, de a külföldi adatok tekintetében nagy szórással kell számolnunk. Gram-negatív baktériumok okozta infekciók számában más kórházakhoz képest növekedés észlelhető.
2. A vancomycin statisztikailag alátámasztható, csíraszám csökkentő hatása a kioldódási vizsgálatokhoz széleskörben használt tápoldatok mindegyikében megfigyelhető. Tápanyag-ellátottság szempontjából a BHI áll a legközelebb az élő szövetekhez. 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.
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. 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. Fiziológiás viszonyok között, egyenletes vancomycin leadás mellett a DDS 1 hétig 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 safraninos festés egyszerű és költséghatékony 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 index értékek 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. A biofilm képző kórokozók elterjedése miatt biofilm képzést gátló antibiotikum kombinációk alkalmazása válhat szükségessé szabályozott antibiotikum felszabadítású rendszerekben.

## Saját publikációk jegyzéke

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 elsőszerzőség

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