

## Ortopédiai sebfertőzések mikrobiológiai

### nyomon követése

PhD értekezés tézisei

**Dr. Kustos Tamás**

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Nagy Judit

Programvezető:

Prof. Dr. Bellvei Árpád

Témavezetők:

Dr. Kocsis Béla

Prof. Dr. Kilár Ferenc

Pécsi Tudományegyetem Orvos Egészségügyi Centrum

Általános Orvostudományi Kar

Ortopédiai Klinika

2003

### Bevetés

A sebfertőzések az ortopédiai műtétek egyik legrettegettebb szövődményei, melyek mind a beteg, mind az operáló orvost, de az ellátó intézményt is rendkívül súlyosan érintenek. A sebfertőzések kezelése rendkívül nehéz és hosszadalmas, költség vonzata miatt súlyos terhet ró az ellátó intézményre is. Ezek alapján a fertőzések megelőzése minden ortopédiai osztály kiemelkedő feladata. Ha azonban a fertőzés bekövetkezik, a korai diagnózis felállítása, a megfelelő terápia időben történő megkezdése rendkívül fontos, mert így van esély a fertőzés szanálására, nagyszilíteti endoprotézis beültetését követően esetlegesen a protézis „megmentésére”, ami sok szenvedéstől kímélheti meg a betegét. Sebfertőzések esetén azonban a korai diagnózis felállítása nem egyszerű feladat, lévén, hogy fizikálisan az operált terület fájdalom, néha duzzadt lehet úgymond „normál” esetben is. A betegnek lehet hőemelkedése, láza a műteti haematomák felszívódása miatt is. Képfalkortó eljárások (RTG, UH, scintigraphia) általában nem informatívak, MRI vizsgálat pedig gyakran nem végezhető (pl. protézis beültetéseket követően sem) a beültetett fémanyagok miatt. A nehezen megítélhető fizikális jelek mellett így a labor vizsgálat adhat támpontot a sebtésznek, melyhez azonban ismerni kell azt, hogy „normál”, nem infékt esetekben hogy változnak a gyulladássos paraméterek a műtétet követően. Ha pedig sikerült felállítanunk a diagnózist, a megfelelő terápia mielőbbi megkezdése a cél. Ehhez viszont ismernünk kell az általunk kezelt fertőzés kórokozóját, annak tulajdonságait, az átlagtól való eltéréseit. A fentiek alapján fogalmaznunk meg kutatásunk céljait és végeztük kísérleteinket.

### A baktériumok sejt felszíni hidrofóbicitása

A bakteriális infékcó egy több fázisból álló folyamat. A baktériumok megtapadása a gazdaszövetek felszínén a fertőzései folyamat első szignifikáns lépése, melyet kolonizáció, bakteriális szaporodás, invázió és szövet destrukció követ.

Az adhézió első, rapid fázisa számos nem specifikus, relative gyenge fiziko-kémiai kölcsönhatáson alapul. Ezek közül az egyik legfontosabbnak tartott a hidrofób interakció. Emellett elektrostatikus erők, hidrogén kötések, van der Waals erők, és lektin szerű interakciók is szerepet játszanak a fertőzés ezen fázisában. Ezen kölcsönhatások eredménye a patogének azonnali, reverzibilis kötődése a gazdaszövet felszínéhez.

Számos bakteriális és fungális patogén elsősorban a hidrofób kölcsönhatások révén kolonizálja a gazdaszervezet szöveteit. A baktériumok felszínén általában hidrofób és hidrofíli komponensek is kifejeződnek, és számos molekula járul hozzá a sejt felszíni hidrofóbicitás kialakításához. Néhány ezek közül kovalensen kötődik a sejtfálhoz (pl. *Staphylococcus* és

*Streptococcus* proteinek), vagy a citoplazma membránhoz (pl. *Streptococcus pyogenes* lipoteikolsav). Egyesek a külső membránba vannak lehorgonyozva (pl. fimbriális fehérjék), de lehetnek szkerait biომolekulák is (pl. *Acinetobacter calcoaceticus* amphihiphili poliszacharidja).

A nem specifikus hidrofób kölcsönhatások adhézióban betöltött szerepe számos vizsgálati módszer kifejlesztéséhez vezetett. Munkánk során ezek közül a só aggregációs tesztet (SAT) és a mikrobák szénhidrogénekhez való adhézióját (MATH) alkalmaztuk. Emellett több más módszer (pl. hidrofób interakciós kromatográfia, két fázisú megoszlási módszer stb.) is használatosak.

A hidrofóbicitási vizsgálatok jelentőségét az adja, hogy a baktériumok hidrofób karaktere a virulenciával, a megbetegítő képességgel asszociált. Erre számos példa található az irodalomban: pl. a *Yersinia enterocolitica* plazmid által kódolt sejt felszíni proteintje hidrofób tulajdonságot biztosít a mikrobának. Az infektív hidrofób törzsek hordozzák a plazmidot, míg a plazmid hiányos mutánsok felszíne hidrofílebbé válik, és elvesztik megbetegítő képességüket. A pyelonephritist okozó P fimbriával rendelkező *E. coli* törzsek is hidrofób sejt felszínnel jellemezhetőek. A *S. aureus* törzsek adhéziójai, amelyek extracelluláris mátrix fehérjékhez (pl. kollagén, fibronektin, laminin) képesek kötődni, elsősorban hidrofób aminosavakat tartalmazó aktív kötőhelyekkel rendelkeznek. A baktériumok adhéziós képessége mind az élő szövetekhez, mind az orvosi implantátumok felszínéhez növekszik kifejezettebb hidrofóbicitás esetén, és csökken hidrofílebb mikrobiális felszín esetén.

#### Külső membrán fehérjék

Az adhézió első, rapid fázisát a lazán tapadt baktérium sejtek permanens kötődése követi az élő sejtek vagy implantátumok felszínéhez. Ez a folyamat már specifikus interakciókon alapul, mely a bakteriális adhezinek és a gazdasejt receptorai között alakul ki. Számos, a baktérium felszínén expresszálandó komponens vehet részt az infekció ezen fázisában, pl. fimbriális fehérjék, nem fimbriális adhezinek, lipopoliszacharidok, külső membrán fehérjék (OMP), stb. Ezen faktorok közül tanulmányunkban mi a külső membrán fehérje összetételt elemeztük részleteiben.

Az OMP-k a Gram-negatív baktériumok külső membránjában helyezkednek el. Egyes proteinek nagy mennyiségben vannak jelen, ezek az ún. major fehérjék. Az OMP-k számos bakteriális funkcióban töltnek be fontos szerepet. A legismertebb külső membrán fehérjék a porinok, melyek a baktériumok sejtfalában pórusokat hoznak létre, és lehetővé teszik számos

anyag transzportját a külső membránon keresztül. A porinok egyik csoportja nem specifikus csatornákat képez, amely a kis molekulasúlyú hidrofíli molekulák átjutását biztosítja. A belbaktériumok porinjai, és az ortopediai mintáinkból is izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzsek porinjai jelentősen különböznek egymástól. A *Pseudomonas* külső membrán proteinjai szignifikánsan nagyobb pórusokat képeznek, és nagyobb molekula tömegű hidrofíli molekulák (6000 Da-ig) transzportját teszik lehetővé. Ugyanakkor ezek a pórusok sokkal gyakrabban vannak zárt állapotban, mint belbaktériumok esetén, így általában a diffúzióhoz rendelkezésre álló pórusok mennyisége jelentősen kevesebb a *Pseudomonas* törzsekben. Ez az alacsony külső membrán permeabilitás magyarázza a *Pseudomonas* törzsek nagyfokú természetesen rezisztenciáját hidrofíli antibiotikumokkal szemben. A porinok másik csoportja specifikus diffúziós folyamatokban játszik szerepet pl. Lamb protein a maltóz és maltodextrinnek, a Tsx a nukleozidok, a BmbD a B12 vitamin transzportjában.

További funkciója az OMP-eknek, hogy receptorokként szolgálnak számos bakteriofág (T6, T5, T1,  $\lambda$ ) és colicin (colicin B, D, E, K) számára. Mint sejt felszíni antigének részt vesznek a gazdszervezet immun választásának kiváltásában. Ezenkívül fontos patogenezistikai faktorok, a baktériumok adhéziójában, megtapadásában játszanak szerepet.

#### Biofilm képződés

A modern egészségügy számos területén egyre növekvő számban alkalmaznak beültethető orvosi eszközöket (pl. protézisek, katéterek, tubusok), amelyet egyre növekvő incidenciájú implantátum asszociált fertőzés kísért.

A mikroorganizmusok megtapadása az élő sejtek és a beültethető orvosi eszközök felszínén hasonló módon játszódik le, de hangsúlyozni kell, hogy a baktériumok nagyobb adhéziós hajlamot mutatnak az életlen mestertesztes felületek iránt. Az adhéziót az implantátum felületén kolonizáció és biofilm képződés követi, amelyet direkt elektron mikroszkópos vizsgálatokkal demonstrálni lehet. A biofilm képzés folyamata alatt a baktérium sejtek egy exopoliszacharid gluccoalix mátrixot termelnek, és ebben szaporodnak a baktériumok. Scanning konfokális mikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján a legtöbb bakteriális species által termelt biofilmnek hasonló az összetétele, biokémiaiilag uronsavakból, mono- és diszacharidokból (pl. mannóz, fukóz, aminosavak) állnak. Számos patogén és szaprofitia baktérium képezhet biofilmet, de vannak olyan speciesek, melyek hajlamosabbak mátrix termelésre és biofilm képzésre a legkülönbözőbb felületeken, pl.: *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*. A biofilmen belüli életfolyamatokat részletesen tanulmányozták az elmúlt évtizedben. A

biofilmen belül speciális, nehezen reprodukálható körülmények találhatók. Az oxigén diffúziója, a tápanyagok transzportja, és a metabolikus végtermékek eltávolítása különbözik a biofilm egyes részei között. Az anyagcsere folyamatait lelassultak, a baktériumok szaporodási rájáa kifejezetten alacsony. A biofilm képzés egyik igen fontos klinikai jelentősége, hogy az exopoliszacharid mátrix védelmet biztosít a benne szaporodó baktériumoknak az antibiotikumokkal, enzimmekkel, biocidokkal, és a szervezet immun rendszerével szemben. Irodalmi adatok alapján a biofilment növekvő baktériumok antibiotikumokkal (streptomycin, chloramphenicol) szembeni rezisztenciája 25-32-szeres, biocidokkal (pl. ezüst nitrát, nátrium hipoklorid) szembeni ellenálló képessége pedig 10-16-szoros emelkedést mutatott. Ez magyarázza az implantátum asszociált fertőzések igen rezisztens jellegét, gyakori krónikussá válását, amely igen gyakran reoperációt és a protézisek eltávolítását követeli meg. További klinikai problémák adódhatnak a biofilm felszínéről leváló, ún. planktonikus fázisba jutó baktérium sejtekből, melyek a szervezet különböző pontjaira eljutva újabb felszínre tapadhatnak, és súlyos klinikai tüneteket (pl. sepsis) válthatnak ki. Ezek a tények támasztják alá a biofilm vizsgálatának jelentőségét az ortopédiában, ahol a nagy izületi felszíneken a kórokozók biofilmet képezhetnek, s súlyos klinikai tüneteket válthatnak ki.

Számos kísérleti protokoll létezik az orvosi implantátumok bakteriális kolonizációjának vizsgálatára pl. direkt mikroszkópos vizsgálatok, radioizotópos technikák, a biofilm festési módszerekkel történő detektálása, biológiai próbák, és az implantátum felületéről eltávolított élő baktérium csíraszám meghatározása. Mi vizsgálataink során ez utóbbi csoportba tartozó ultrahangos módszert alkalmaztuk. Az ilyen módon kapott eredmények kvantitatívak, direkték, könnyen standardizálhatók, és nem igényelnek speciális felszerelést. Különböző, komplex formájú objektumok esetén is alkalmazható, mind ezen előnyei következtében széles körben alkalmazzák a kísérletekben.

#### Az antibiotikus hatás vizsgálata

Az antibiotikus kezelés számos morfológiai és metabolikus változást képes előidézni a baktérium sejtekben, pl. a bakteriális adherencia változásai, a sejtek ultra struktúrájának, a fehérje és/vagy DNS szintézisének változásai, az enzintermelés, vagy bakteriális virulencia faktorok szintézisének változásai.

Az antimikrobiális szerek képesek módosítani a sejt felszíni fizikokémiai tulajdonságokat. Irodalmi adatok alapján az antibiotikus kezelés képes csökkenteni a sejt felszíni hidrofilitást. Ezen változások jelentősége, hogy a hidrofílebb sejt felszínnel rendelkező mikrobbak csökkent adhéziós képességgel rendelkeznek.

Szintén több irodalmi adat utal a külső membrán fehérje összetétel antibiotikus hatás alatti változásaira. Egyes fehérjék nagyobb mennyiségben fejeződnek ki, míg mások termelése csökken az antibiotikum adagolás következtében. Ezen eredmények jelentősége, hogy az OMP profiban bekövetkező változások a patogének sejt felszíni változásai következtében módosíthatják az adhéziós képességet, amelynek kihatása lehet a baktérium törzsek virulenciájára, megbetegítő képességére.

Az alkalmazott antibiotikumok koncentrációja igen nagy mértékben befolyásolhatja a bakteriális morfológiában és funkcióban indukált változásokat. Ezért kísérleteinkben sub-inhibitorikus ( $0.5 \times \text{MIC}$ ) és supra-inhibitorikus ( $2 \times \text{MIC}$ ) koncentráció szinteket is alkalmaztunk.

Az antibiotikumok minimális gátló koncentrációját (MIC) csőhígítással módszerrel határoztuk meg: minden cső 1-1 ml buillon tartalmazott, majd az antibiotikum törzsolattal ( $800 \mu\text{g/ml}$ ) felező hígítást végeztünk. Ezután a baktérium szuszpenzióból (abszorbanciája  $600 \text{ nm-en } 0.2 \text{ volt}$ ) 10-10  $\mu\text{l}$ -t adtuk minden csőhöz, és inkubáltuk  $37^\circ\text{C-on } 24 \text{ óra}$ n át. Az a legkisebb antibiotikum koncentráció, amely 24 óra inkubáció után képes volt gátolni a bakteriális növekedést, felelt meg a MIC értéknek.

## Céltűzések

1. Három, infekció esetén gyakran használt labor paraméter (vörösvérsejt süllyedés /We/, fehérvérsejtszám /Fvs/, C-reaktív protein /CRP/) postoperatív értékeinek meghatározása, olyan esetekben amikor nagyszülleti endoprotézis (csípő- és térd total endoprotézis) beültetést követően sebterőzés nem következett be. A „normál” értékek ismerete segítséget nyújthat infekt esetek korai diagnosztizálásában.
2. Ortopédiai sebterőzések esetén a kórokozó baktériumok tenyésztése a sebváladékból, és identifikálása mikrobiológiai módszerekkel.
3. A kitenyésztett *S. aureus*, koaguláz-negatív *Staphylococcus* és *P. aeruginosa* törzsek antibiotikum érzékenységeinek és a minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározása 4 antibiotikum esetében (cefuroxim, cefotaxim, amoxicillin + klavulán sav, amikacin). Ezek a leggyakrabban használt antibiotikumok klinikánk gyakorlatában az antibiotikus profilaxis és terápia terén.
4. A kitenyésztett baktériumok sejtfelszíni hidrofobicitásának meghatározása és ezek összehasonlítása 3 standard magyar baktérium törzs sejtfelszíni hidrofobicitásával. A hidrofobicitás meghatározását két különböző teszttel, a kisózsásos módszerrel (Salt Aggregation Test - SAT) és a szerves oldószerekben való megoszlás alapján (Microbial Adhesion To Hydrocarbon - MATH) kívánunk vizsgálni és a két teszttel kapott eredményeket összehasonlítani.
5. Vizsgálni kívánunk a fent említett 4 antibiotikum sub-inhibitorikus és supra inhibitorikus koncentrációinak hatását a sejtfelszíni hidrofobicitásra.
6. Analizálni kívánunk az ortopédiai mintákból izolált *P. aeruginosa* törzsek külső membrán fehérjét egy új módszerrel, a kapilláris elektroforézissel. Össze kívánunk hasonlítani ezen profilokat egy standard törzs vizsgálata esetén kapott elektroferogrammal, valamint meg kívánunk határozni ezen technikával a supra-inhibitorikus koncentrációban alkalmazott antibiotikumok külső membrán fehérjékre kifejtett módosító hatását.
7. Meg kívánunk vizsgálni ultrahangos módszerrel a kitenyésztett baktériumok megapadási képességét polyetilén acetábulumon, illetve azt, hogy a fent említett 4 antibiotikum sub-inhibitorikus és supra-inhibitorikus koncentrációja módosítja-e a megapadási képességet.
8. Meg kívánunk vizsgálni, hogy az ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek sejtfelszíni hidrofobicitása, a külső membrán fehérjék összetétele és a megapadási képességük összefüggésben van-e.
9. A klinikai gyakorlatra vonatkozó javaslatok megfogalmazása vizsgálatunk eredményeinek ismeretében.

1. Labor paraméterek változása totál endoprotézisek beültetését követően nem fertőzött esetekben

### 1.1 Beteganyag és módszer

Vizsgálatainkhoz 50 olyan beteg választottunk, akik a PTE OEC Ortopédiai Klinikáján totál endoprotézis beültetésen estek át. Betegeinknél vizsgáltuk a fertőzések esetén rendszeresen nézett labor paraméterek közül a We, Fvs és CRP értékeket.

A kiválasztás random módon történt, de csak azon betegek kerültek a tanulmányba, akik:

1. Nem szenvedtek olyan ismert betegségben, ami befolyásolhatta volna a fent említett labor paramétereket, mint pl. diabetes mellitus, köszvény, rheumatóid arthritis, stb.
2. A vizsgált betegek nem estek át korábban totál endoprotézis beültetésen vagy más nagyobb ortopédiai műtéteken akár fém anyag beültetéssel, akár anélkül.
3. Felvételkor a betegek vér süllyedés értéke normál tartományon belül volt (We < 20 mm/h).
4. A tanulmányba bekerült betegek negatív torok és vizelet leoltási eredményel rendelkeztek.

A betegknél vizsgáltuk a fent említett labor paramétereket a műtét előtt, majd az 1., 3. és 10. postoperatív napokon. Betegeinknél 45 esetben végeztünk totál csípő és 5 esetben totál térdizületi endoprotézis beültetést.

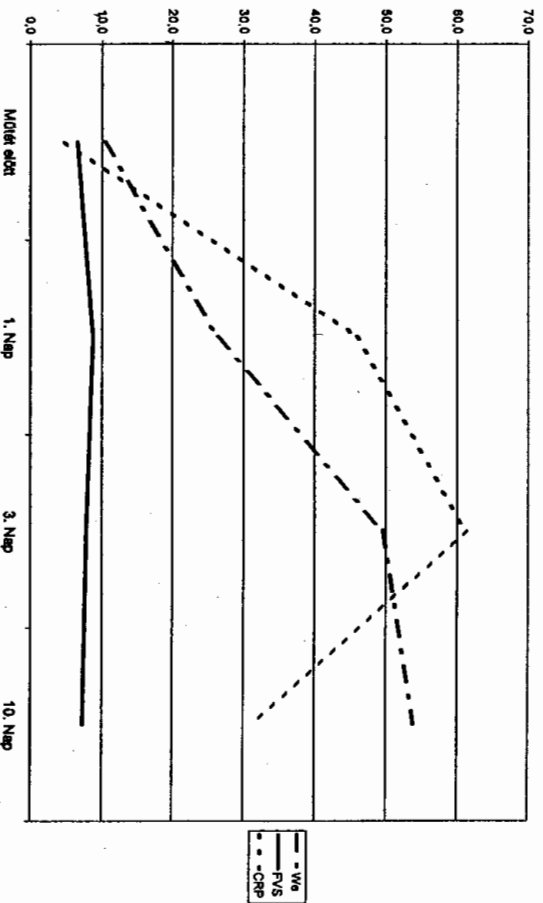
### 1.2. Eredmények

Az 50 vizsgált betegünk közül egy adatnál ki kellett zárunk a tanulmányból, mert a betegnél sebterőzés lépett fel totál csípőizületi endoprotézis beültetést követően.

A labor paraméterek postoperatív változását az 1. ábrán szemléltettem.

161 látszik az ábráról, hogy a fehérvérsejt szám a vizsgált periódus alatt praktikusán változatlan értékeket mutatott. Ezzel szemben a vérsüllyedés érték előbb kissé gyorsabb, majd lassabb, de folyamatos emelkedéssé esett át a vizsgált periódusban. A C-reaktív protein érték viszont a 3. postoperatív naptól kezdve átmenni emelkedést követően csökkenő tendenciát mutatott. Ezek alapján mondhatjuk, hogy a totál endoprotézis beültetéseket követően a korai fertőzések diagnosztizálásában a sebésznek a legjobban támpontot a CRP érték adhatja, hiszen fertőzés fennállásakor a CRP érték nem csökken. Ezt támasztotta alá az az esetünk is, ahol fertőzés következett be totál csípőizületi endoprotézis beültetést követően és a CRP érték a 10. postoperatív napon sem csökkent, sőt további emelkedést mutatott.

1. ábra A We, Fvs és CRP átlag értékeinek alakulása 49 beteg alapján, műtét előtt és után total endoprotézis beültetés során nem fertőzött esetekben.



## 2. Baktériális sejt felszíni hidrofobicitás vizsgálata ktszázós módszerrel (SAT)

### 2.1. Anyag és módszer

Kísérleti sorozatunk második részében olyan betegeket vizsgáltunk, akikben ortopédiai műtétet követően bakteriológiai úton igazolható seb infekció alakult ki. Hét betegből, akik életkora 14 és 87 év között volt, 13 baktérium törzset izoláltunk, és identifikáltunk mikrobiológiai módszerekkel: 5 *S. aureus*, 3 koaguláz-negatív *Staphylococcus* és 5 *P. aeruginosa* törzset. A klinikai izolátumok mellett - kontrollként - három magyar standard törzset is vizsgáltunk: *S. aureus* NIH Hungary 118003, *S. saprophyticus* NIH Hungary 120008, és *P. aeruginosa* NIH Hungary 170000.

Ebben a kísérlet sorozatunkban az ortopédiai minikből izolált baktériumok sejt felszíni hidrofobicitását kívánjuk meghatározni a ktszázós módszerrel, és össze akarunk hasonlítani a klinikai izolátumok és a három standard törzs hidrofobicitási értékeit. Ezenkívül elemeztük, hogy az antibiotikus hatás képe-e változásokat indukálni a baktériumokra jellemző hidrofobicitási karakterben. A só aggregációs tesztben 10 µL kezelten vagy antibiotikummal kezelt baktérium szuszpenziót ( $5 \times 10^9$  baktérium / mL) - 0.04 M nátrium foszfát pufferben (pH = 6.8) - kevertünk össze tárgyilemezen 10-10 µL növekvő

koncentrációjú ammónium szulfát oldatokkal (0.05 - 4.00 M / L). A baktériumok sejt felszíni hidrofobicitását azzal a legalaacsonyabb ammónium szulfát koncentrációval jellemezzük, amely már képes volt bakteriális aggregációt előidézni. A négy antibiotikum hatását sub-inhibitorikus és supra-inhibitorikus koncentrációban elemeztük: a baktérium tenyészetet 60 percig inkubáltuk antibiotikum jelenlétében, majd a só aggregációs tesztet ugyanígy végeztük el, mint a kezeletlen esetekben.

### 2.2. Eredmények

A kezeletlen *S. aureus*, koaguláz-negatív *Staphylococcus* és *P. aeruginosa* törzsek aggregációja 1.00 - 3.00 M/L koncentrációjú ammónium szulfát jelenlétében volt látható. A ktszázós módszerrel nem tudunk kimutatni szignifikáns különbséget a klinikai izolátumok és a magyar standard koaguláz-negatív *Staphylococcus* (2.5 M/L), *S. aureus* (2.0 M/L) és *P. aeruginosa* (2.0 M/L) törzsek hidrofobicitása között.

Mind a standard törzseket, mind az ortopédiai izolátumokat 0.5 x MIC és 2 x MIC koncentrációjú cefuroxim, cefotaxim, klavulánsavval kombinált amoxicillin és amikacin kezeléssel tettük ki. Eredményeink alapján az antibiotikus kezelés számos esetben képes volt a sejt felszíni hidrofobicitás megváltoztatására. Ezen változások minden esetben azt jelentették, hogy a látható sejt aggregáció magasabb ammónium szulfát koncentráció mellett következett be, tehát a hidrofobicitás csökkent. Statisztikai analízis (egy minitás egy oldalas Z-próba) alapján a detektált változások több mint 39 %-a szignifikáns volt ( $p < 0.001$ ). Hangsúlyozni szeretnénk, hogy habár nem az összes módosítás volt szignifikáns, amelyet antibiotikum jelenlétében ki tudunk mutatni, de a változások tendenciája minden esetben ugyanaz volt: azaz a baktériális sejt felszín hidrofílebbé vált, hidrofobicitása csökkent.

Ezenkívül ki szeretnénk említeni, hogy a supra-inhibitorikus (2 x MIC) koncentrációjú antibiotikum kezelés gyakoribb és nagyobb mértékű hidrofobicitás változás előidézésére volt képes, mint a sub-inhibitorikus koncentráció.

### 3. Baktériumok sejt felszíni hidrofobicitásának meghatározása szénhidrogénekhez történő adhézió alapján

#### 3.1. Anyag és módszer

Kővekező kísérleteinkben a korábbiakban említett oropédiai izolátumok és a három standard törzs sejt felszíni hidrofobicitását kívántuk elemezni a szénhidrogénekhez való adhéziójuk alapján. Ezzel a módszerrel is analizáltuk a négy különböző antibiotikum sub-MIC és supra-MIC koncentrációinak sejt felszíni hidrofobicitására kifejtett hatását. Továbbiakban pedig összehasonlítottuk a két különböző, bakteriális hidrofobicitás meghatározására használt módszerrel kapott eredményeket.

A baktériumok sejt felszíni hidrofobicitásának vizsgálatára 1983-ban Rosenberg és mtsai vezették be a MATH módszert (mikrobiális adhézió szénhidrogénekhez). Ezen metodika lényege, hogy a vizes szuszpenzióban található baktériumokat (optikai denzitás 600 nm-en 0,4 és 0,6 között) szénhidrogénekkel keverjük össze, és a hidrofób felszínnel rendelkező sejtek hajlamosabbak a szénhidrogénekhez való kötődésre. Vizsgálatainkban három különböző szerves oldószer, hexadecane-t, toluene-t és xylene-t alkalmaztunk. Egy perces Vortex-szel végzett rázást követően a keveréket öt percig nyugalmomba helyezve a hidrofób szolvens és a vizes fázis élesen elkülönült egymástól. A vizes fázist elárvoltva 600 nm-en határoztuk meg az abszorbanciát. A hidrofobicitás %-os értékének meghatározását a következő egyenlet alapján végeztük:

$$\text{hidrofobicitás \%} = \left[ \frac{\text{OD}_{600\text{nm}} - \text{OD}_{600\text{nm}}^{\text{oldószer}}}{\text{OD}_{600\text{nm}}} \right] \times 100$$

Az antibiotikus hatás elemzésére a 4 különböző típusú antibiotikumot használtuk fel 0,5 x MIC és 2 x MIC koncentrációban. Az antibiotikus kezelés időtartama 60 perc volt.

#### 3.2. Eredmények

A MATH módszerrel a három standard törzs és hat klinikai izolátum (KT 1, KT 25 Sta., KT 24, KT 278, KT 2, és KT 25 Ps.) sejt felszíni hidrofobicitását elemeztük. A legmagasabb hidrofobicitási értékeket a *S. aureus* törzsek esetében tudtuk detektálni, szignifikánsan alacsonyabb értékekkel jellemezhetőek a koaguláz-negatív *Staphylococcusok*, és a legalacsonyabb értékeket a *P. aeruginosa* törzsekéi találtuk. Statisztikai kiértékelés (ANOVA teszteszt = analysis of variance) alapján a három bakteriális species hidrofobicitási értékei szignifikáns különbséget mutattak ( $F = 127,54$ ;  $p < 0,001$ ). A *S. aureus* és a *P. aeruginosa* speciesen belüli nem tudtuk szignifikáns különbséget demonstrálni a standard törzsek és az oropédiai izolátumok hidrofobicitási jellemzői között. Ugyanakkor a koaguláz-negatív KT 278 törzs hidrofobicitási karaktere és a standard *S. saprophyticus* NIH Hungary 120008 értéke szignifikáns eltérést mutatott. Ezt a jelenséget feltehetőleg azzal a ténnyel lehet

magyarázni, hogy a standard törzstől eltérően a KT 278 törzs biokémiai vizsgálatok alapján koaguláz-negatív *S. hominis* speciesnek bizonyult.

Vizsgálataink során három különböző oldószer alkalmaztunk (1. anyag és módszer fejezet). A statisztikai vizsgálatok alapján nem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni a három különböző oldószer jelenlétében kapott hidrofobicitási értékek között. ( $F = 1,026$ ;  $p = 0,437$ ).

A négy különböző antibiotikum (cefuroxim, cefotaxim, klavulánsavval kombinált amoxicillin és amikacin) hatását a sejt felszíni hidrofobicitásra szintén analizáltuk a MATH módszer felhasználásával. Habár számos változást tudtuk kimutatni antibiotikum adagolását követően, a statisztikai számítások alapján ezek a változások nem nevezhetők szignifikánsnak. Tehát egyik antibiotikum sem volt képes szignifikáns változást indukálni sem a standard törzsek, sem a klinikai izolátumok hidrofobicitási értékeiben ( $F = 1,429$ ;  $p = 0,324$ ). Az antibiotikus koncentráció módosító hatását sub-inhibitorikus és supra-inhibitorikus koncentrációk alkalmazásával vizsgáltuk. A statisztikai kiértékelés alapján az antibiotikus koncentráció nem befolyásolta szignifikánsan a sejt felszíni hidrofobicitást ( $F = 0,038$ ;  $p = 0,863$ ). Irodalmi adatok és az előző SAT módszeres eredményeink alapján ismert, hogy az antibiotikum kezelés képes módosítani a bakteriális morfológiát és számos sejt funkciót. Feltehetően azonban a vizsgálatainkban alkalmazott antibiotikumok nem tudtak jelentős változást indukálni azon sejt felszíni struktúrákban, amelyek szerepet játszanak a mikrobbák szénhidrogénekhez való kapcsolódásában, ebből adódóan nem tudtuk a MATH módszerrel szignifikáns változást detektálni antibiotikus kezelés hatására.

Összehasonlítva a sejt felszíni hidrofobicitás meghatározására használt kisozásos módszer és a szénhidrogénekhez történő adhéziós módszer eredményeit, nem tudtuk korrelációt kimutatni a két technikával kapott adatok között. Hasonló eredményeket publikálták 1999-ben Ocana és mtsai is. Ezeket a különbségeket azzal magyarázzák, hogy nem ugyanazon sejt felszíni struktúrák felelősek a két különböző technikával kapott eredményekért.

#### 4. Külső membrán fehérjék analízise kapilláris elektroforézissel

##### 4.1. Anyag és módszer

Ezen kísérlet sorozatunkban az ortopédiái minikből izolált *Pseudomonas* törzsek, valamint a standard *P. aeruginosa* törzs külső membrán fehérjéit (OMP) kívántuk kinyerálni, majd a kapilláris elektroforézis technika felhasználásával összehasonlítani ezeknek a törzseknek az OMP összetételét, a major fehérjék molekulatömegét és mennyiségét. Elemezni kívántuk továbbá, hogy a supra-inhibitorikus koncentrációjú antibiotikumok képesek-e szignifikáns változásokat előidézni a *Pseudomonas* törzsekre jellemző külső membrán proteín profilokban.

##### 4.1.1. Külső membrán fehérjék (OMP) preparálása

Kísérlet sorozatunkban a standard *P. aeruginosa* NIH Hungary 170000 törzs és 5 klinikai *Pseudomonas* izolátum (KT 2, KT 7, KT 25 Ps, KT 28, KT 39) külső membrán fehérjéit preparáltuk ki és vizsgáltuk a kapilláris elektroforézis technika felhasználásával.

A baktériumokat 2000 ml tápoldatban tenyésztettük (1.667 % peptone, 0.11 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.389 % glükóz, 0.195 % hús kivonat, 0.023 %  $\text{MgCl}_2$ , pH=7.2), majd centrifugálással gyűjtöttük össze. A bakteriális sejtek plazmolízisét a sejt üledék reszuszpendálásával érték el (25 ml 0.75 M sucrose/10 mM Tris, pH=7.5). A *Pseudomonas* sejtek peptidoglikán rétegét lizozim kezeléssel emésztettük (2.5 mg lizozim 2 percig 4°C-on). Ezután 50 ml 1.5 mM EDTA, pH=7.5 oldatot adagoltunk lassan (kb 10 perc alatt) a szuszpenzióhoz, amely egyrészt hígította azt, másrészt az eredetileg pálcá alakú baktériumokat gömb alakú spheroplastokká alakította. A spheroplastok lizisét ultrahangos kezeléssel idéztük elő (400 W, 4 x 2 perc). A fel nem tört sejteket centrifugálással távolítottuk el. A lizátumok membrán frakcióit ultracentrifugálással gyűjtöttük össze (100.000 g, 2 x 1 h, 4°C). A belső és külső membrán elválasztására sucrose gradiens ultracentrifugálást alkalmaztunk. Az üledéket 25 % (w/w) sucrose/5mM EDTA, pH=7.5 oldatban reszuszpendáltuk, és 30-55 % (w/w) sucrose/5 mM EDTA, pH=7.5 lépcsős gradiens tetéjére tégeztük. A gradiens ultracentrifugálást 100.000 g-vel, 21 órán át, 4°C-on végeztük. A centrifugálás után a külső és belső membrán turbid csík formájában volt látható. A külső membrán frakcióit összegyűjtöttük, ultracentrifugálással mostuk, majd 500  $\mu\text{L}$  mintapufferben (0.125 M Tris-HCl, pH=6.8, 4 % SDS, 10 %  $\beta$ -mercaptoetanol) reszuszpendáltuk.

Az antibiotikumok OMP összetételre gyakorolt hatásának elemzéséhez a baktérium tenyészeteket 2 x MIC koncentrációjú antibiotikus kezelésnek vetettük alá 60 percen keresztül, majd az OMP-k preparálását az előbb leírt módon végeztük.

##### 4.1.2. Kapilláris elektroforézis

A baktériumok külső membrán fehérje összetételének vizsgálatára egy új és modern módszert, a kapilláris elektroforézist alkalmaztuk. Ez egy rendkívül gyors módszer, amely percekben belül szolgáltat adatokat a fehérje összetételről, mennyiségéről, molekulatömegéről. Ez a módszer lehetővé teszi az SDS-PAGE-nál alkalmazott időigényes festési, gélisztartási lépések elhagyását a direkt UV detektálás segítségével. További előnyei a módszernek a kis minta-, és puffer igény (nL-es nagyságrend), és az automatizálhatóság. Az adatok kvantitatívak, számlógépes rendszer segítségével azonnal kiértékelhetők és tárolhatók.

A kapilláris elektroforézis vizsgálatok során az ún. dinamikus sieving kapilláris elektroforézis technikát alkalmaztuk. Ez a módszer lehetővé tette a fehérjék molekulatömeg alapján történő elválasztását. Háttér pufferként a BioRad kereskedelemben is kapható CE-SDS protein futtató puffert alkalmaztuk, melyben egy hidrofili polimer 14000 és 200000 Da molekulatömeg tartományban biztosított szűró effektust, és a fehérjék molekulatömeg alapján történő elválasztását.

A méréseket BioFocus 3000 rendszerben végeztük, 24 cm hosszú, 50  $\mu\text{m}$  belső átmérőjű ömlesztett szilika kapillárisokban. Az elválasztás konstanis feszültség mellett történt (15 kV), a hőmérsékletet 20°C-on stabilizáltuk. A miniatűr hidrodinamikusan injektáltuk, 50 psi x sec nyomással. A kapilláriszt minden futtatás között mostuk, (0.1 M NaOH, 0.1 NaCl, deionizált víz) ilyen módon eltávolítottuk a polimeres futtató oldatot. UV detektálást végeztünk 220, 254 és 280 nm-en. Az adatok feldolgozása és tárolása számítógépes rendszerrel történt.

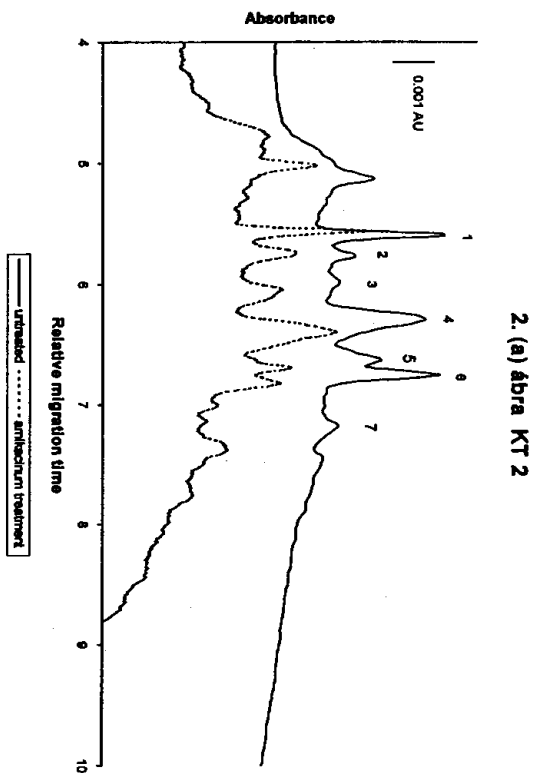
Minden futtatásnál egy belső standardot (Benzoesav) alkalmaztunk a fehérjék relatív migrációs sebességének meghatározásához. A fehérjék molekulatömegének meghatározásához a Pharmacia alacsony molekulatömegű kalibrációs kitjét használtuk ( $\alpha$ -lactalbumin, 14 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa; carbonic anhidráz, 30.0 kDa; ovalbumin, 43 kDa; albumin, 67 kDa; foszforilase b, 94 kDa). A fehérjék mennyiségének meghatározásához a csúscsok alatti területek %-os arányát határoztuk meg a BioFocus Integrator Program segítségével.



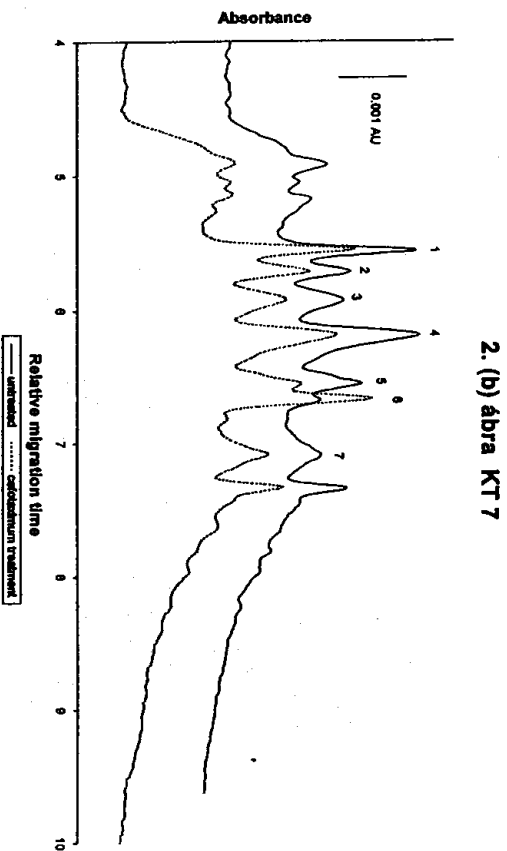
#### 4.2. Eredmények

A *Pseudomonas* törzsek kapilláris elektroforetikus külső membrán fehérje mintázata jellemző volt a genusra és jelentősen különbözött (a domináló fehérjék számát és molekulatömegét tekintve) más fajok (pl. *Salmonella minnesota*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Proteus penneri*) profiljától. A kapott mintázatok reprodukálhatóak voltak. A standard törzs és az öt klinikai *Pseudomonas* izolátum OMP összetétele hasonlított egymáshoz. Minden profil hét major fehérje jelenlétével lehetett jellemezni, melyek molekulatömege 22,6, 25,8, 29,1, 34,4, 37,6, 38,8 és 46,6 kDa volt. Ezeket a major proteinek minden profilban detektálni lehetett, de fehérjék mennyisége és relatív aránya különbözött az egyes törzsek elektroferogramján. Pl. a 38,8 kDa fehérje nagy mennyiségben volt jelen a KT 2 és kis mennyiségben a KT 7 törzs profiljában, míg a 29,1 kDa protein a KT 2 mintázatában nagy mennyiségben volt jelen és a KT 25 mintázatában alacsony mennyiségben a többi *Pseudomonas* OMP összetételéhez viszonyítva.

Az antibiotikus kezelés képes módosítani a baktériumok OMP profilját. A kísérlet sorozatunkban használt három antibiotikum (cefotaxim, klavulánsavval kombinált amoxicillin, amikacin) képes volt befolyásolni az OMP összetételét. Szigifikáns változást három esetben tudunk kimutani (a fehérjék relatív mennyiségében bekövetkező változást meghaladta a standard deviació háromszorosát), de kisebb eltérések több esetben is detektálhatóak voltak. A 2. ábrán két esetet demonstrálunk, ahol szigifikáns változás volt kimutatható antibiotikus kezelést követően. A KT 2 törzs mintázatában (2a ábra) a 38,8 kDa protein mennyisége csökkent szigifikánsan (20 %-ról 6 %-ra) amikacin kezelés hatására. A KT 7 (2b ábra) és a KT 28 törzsek OMP profilja szintén szigifikáns változást mutatott: cefotaxim adagolást követően a 38,8 kDa protein mennyisége növekedett (KT 7 törzs esetében 2 %-ról 16 %-ra, míg KT 28 törzs profiljában 12 %-ról 28 %-ra). A bemutatott szigifikáns változások igen nagy jelentőségűek lehetnek, hiszen az OMP összetétel befolyásolhatja a baktérium és a gazdaszervezet receptorai között kialakuló kölcsönhatásokat, ezáltal az adhézió folyamata (ebben az esetben ennek második vagy irreverzibilis fázisa) megváltozhat az antibiotikum kezelés hatására.



2. (a) ábra KT 2



2. (b) ábra KT 7

2. ábra Az ábrákon két *Pseudomonas* törzs (2.a. KT 2, 2.b. KT 7) külső membrán fehérje kapilláris elektroferogramja látható. Folyamatos vonallal látható a kezeletlen minta, szaggatott vonallal a fehérje profil antibiotikus kezelést (KT 2 - amikacin, KT 7 - cefotaxim) követően.



## 5. Ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek polyethylen vápán történő megtapadásának vizsgálata.

### 5.1. Anyag és módszer

Munkánk utolsó kísérlet sorozatában azt kívántuk vizsgálni, hogy az ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek közül melyek tapadnak meg legjobban a csipő protézis beültetéskor használt polyethylen vápán, különbözik-e ezen megtapadási képességük a standard baktérium törzsek megtapadásától. Vizsgáltuk azt, hogy az antibiotikum hatás hogy módosítja ezt a megtapadási képességet. Függe-e a változás az antibiotikum típusától, illetve az alkalmazott antibiotikum koncentrációjától?

Kísérlet sorozatunkhoz 2-2 ortopédiai mintából izolált, valamint 1-1 standard *S. aureus*, koaguláz-negatív *Staphylococcus* és *P. aeruginosa* törzset használtunk.

A módszer amit kísérlet sorozatunk során követünk a következő volt:

- A baktérium törzseket 30 ml 0,25% dextrózt tartalmazó PBS oldatban tenyésztettük 24 óráig 37° C-on.
- Ezt követően a baktériumokat centrifugálással gyűjtöttük össze, melyet 15 percig, 4° C-on, 4500 g-vel végeztünk.
- Az átlagos koncentrációt spektrofotométer segítségével állítottuk be.
- Ezt követően a baktérium szuszpenzióba helyeztük az UHMWPE polyethylen acetábulum darabokat, 37° C-on, 2 órára.
- Az acetábulum darabok eltávolítását követően azokat 3 alkalommal mosunk.
- 25 ml, 0,25% dextrózt tartalmazó PBS oldatba helyezve a lemosott acetábulum darabokat, azokat UH-os kezelésnek vetettük alá 1 percig, 125 Watt teljesítménnyel.
- Az oldatból 1-1 ml-t eltávolítva, hightási sor után, melyhez fiziológiás só oldatot használtunk, 10 µl-t kivéve azt normál agar táptájalra leoltottuk.
- Ezt 24 óra át 37° C-on inkubáltuk
- A bakteriális megtapadás kiszámítására az 1 cm<sup>2</sup> területen megjelent telepképződik számát használtuk fel.

Ezen módszert alkalmaztuk antibiotikum kezelés nélkül, majd antibiotikus kezelést követően is. Vizsgálatainkhoz 4 féle antibiotikumot használtunk (cefuroxim, cefotaxim, amoxicillin-klavulánsav, amikacin) sub-inhibitorikus (0,5 x MIC) és supra-inhibitorikus koncentrációban (2 x MIC).

Eredményeink értékelésére itt is az egy- illetve többutas varianciaanalízist (ANOVA ill. TWANOVA) használtuk.

### 5.2. Eredmények

Munkánk során azt találtuk, hogy az ortopédiai szempontból „fakultatív patogének” tekintet, de biofilm képzésre hajlamos koaguláz-negatív *Staphylococcus* /CNS/ törzsek muattak a legnagyobb megtapadási képességet a polyethylen vápa darabokhoz. Őket követik, szignifikánsan alacsonyabb értékekkel a *S. aureus* és a legalacsonyabb megtapadási képességgel a *P. aeruginosa* törzsek ( $p < 0,001$ ). Ezzel szemben nem észleltünk különbséget a standard baktérium törzsek és az ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek megtapadási képességében.

Az antibiotikumok megtapadási képességet befolyásoló hatását vizsgálva azt találtuk, hogy az antibiotikumok alkalmazása esetén a baktérium törzsek polyethylen vápán történő megtapadása szignifikánsan csökkent ( $p < 0,001$ ). Érdekes módon azonban nem találtunk lényeges különbséget az egyes antibiotikumok között a megtapadási befolyásoló hatásban ( $p < 0,190$ ), így mind a 4 általunk vizsgált antibiotikum (cefuroxim, cefotaxim, amoxicillin-klavulánsav, amikacin) hasonló mértékben csökkentette a baktérium törzsek megtapadási képességét, mely legkevésbé a *P. aeruginosa* törzseké volt észlelhető. Ezzel szemben szignifikáns összehasonlítást látnunk a baktériumok megtapadási képessége és az alkalmazott antibiotikum koncentrációk között ( $p = 0,005$ ). Így a supra-inhibitorikus (2 x MIC) koncentráció szignifikánsan csökkentette a vizsgált baktérium törzsek polyethylen vápán történő megtapadását a sub-inhibitorikus (0,5 x MIC) antibiotikum koncentrációhoz képest.

## Új eredmények

1. Meghatároztuk a klinikai gyakorlatban, fertőzések esetén leggyakrabban használt labor paraméterek (We, Fvs, CRP) „normál” értékei nagyziliceti endoprotézis beültetést követően. A vizsgált paraméterek közül a CRP érték bizonyult a leginformatívabbnak a közvetlen postoperatív szakban, a korai sebfertőzések diagnózisának alátámasztására.
2. A baktériumok sejt felszíni hidrofobicitásának elemzésére két különböző módszert, a SAT és MATH technikákat alkalmaztuk. A két metodikával hidrofobicitási eredmények között korrelációt nem tudunk kimutatni.
3. Egyik módszerrel sem volt detektálható szignifikáns különbség a standard törzsek és a klinikai izolátumok sejt felszíni hidrofobicitását tekintve.
4. A SAT technikával az esetek kb. 40 %-ban tudunk szignifikáns változást kimutatni a bakteriális hidrofobicitásban antibiotikus kezelés hatására. A supra-inhibitorikus koncentráció gyakoribb és nagyobb mértékű változást idézett elő.
5. Ezzel szemben a MATH módszerrel az antibiotikus kezelés után nem tudunk szignifikáns változásokat igazolni. Ugyanakkor az egyes bakteriális speciések hidrofobicitása szignifikáns eltéréseket mutatott. A MATH technika során alkalmazott különböző oldószerek nem befolyásolták szignifikánsan a baktérium sejtekre jellemző hidrofobicitási értékeket.
6. Kapilláris elektroforézis technikával meghatároztuk az otrópédiai mintákból izolált és a standardként alkalmazott *Pseudomonas* törzsekre jellemző külső membrán fehérje profilokát. Supra-inhibitorikus antibiotikus kezelés hatására több esetben tudunk szignifikáns változást demonstrálni az elektroferogramokban.
7. A három különböző bakteriális speciést vizsgálva a fakultatív patogénként kezelt koaguláz-negatív *Staphylococcus* mutarták a legnagyobb fokú megapadási képességet a totál endoprotézisbeültetéshez használt polietilén acetabulum komponensen. Szignifikánsan alacsonyabb adhézióval rendelkeztek a *S. aureus* törzsek, míg a legkisebb fokú megapadási képességet a *Pseudomonas* törzsek mutatták.
8. A baktériumok megapadási képessége antibiotikumok adagolására szignifikánsan csökkent, függetlenül az antibiotikum típusától. Annak ellenére, hogy az egyes antibiotikumok hatása között - meglepő módon - szignifikáns különbség nem volt kimutatható, az antibiotikum koncentráció változásai viszont szignifikánsan befolyásolták a megapadási képességet.

9. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a bakteriális sejt felszíni hidrofobicitás, külső membrán fehérje összetétel, és az adhézióval kapcsolatos képesség összefüggésben állnak egymással. Mindezen tényezőknek igen jelentős szerepük van a fertőzési folyamat kialakulásában, de meg kell említenünk, hogy további más faktorok is fontos szerepet játszanak a baktériumok megapadásában, a fertőzési folyamatban. Az antibiotikus kezelés képes volt módosítani a külső membrán fehérje profil, csökkenteni a hidrofobicitást és a megapadási képességet. Mindez a klinikai gyakorlatban a pre- és postoperatív antibiotikus kezelés jelentőségére hívja fel a figyelmet. A lehető legkisebb traumatizációval járó műtéti technika, jó minőségű, modern implantátumok alkalmazása a sterilitás szabályainak messzemenő betartása, illetve a műtéti eljárások során alkalmazott profiaktikus antibiotikumok alkalmazása csökkentheti a műtéti fertőzések számát. A sajnálatosan mégis kialakuló sebfertőzések esetén a kórokozók kitenyésztésével antibiotikum érzékenységen alapuló terápiát kell folytatni megfelelő dózisban és megfelelő ideig, hogy az implantátumokhoz biofilmben kötődő mikroorganizmusokat is elpusztítsuk, így csökkentjük a sebfertőzéseket követő nagyziliceti endoprotézis cserék, illetve protézis eltávolítások számát.

## Publikációs jegyzék

### Az értekezés tárgyköréből megjelent publikációk és idézhető absztraktok jegyzéke

1. Kusztos T., Kusztos I., Gonda E., Kocsis B., Szabó Gy., Kilar F.:  
Capillary electrophoresis study of outer membrane proteins of *Pseudomonas* strains upon antibiotic treatment  
J. Chromatography A 979: 277-284, 2002      Impact factor : 2.793
2. Kusztos T., Kusztos I., Kilar F., Rappai G., Kocsis B.:  
Effect of antibiotics on cell surface hydrophobicity of bacteria causing orthopaedic wound infections  
Chemotherapy (Közlésre elfogadva)      Impact factor: 1.129
3. Kusztos T., Szabó I., Than P.:  
Veränderungen der Infektions-Laborparameter nach Endoprothesen-Implantationen  
Zeitschrift für Orthopädie (Közlésre leadva)
4. Kusztos I., Kusztos T., Kilar F., Rappai G., Kocsis B.:  
Changes in bacterial hydrophobicity of orthopedic isolates under antibiotic effect determined by the microbial adhesion to hydrocarbon method  
Journal of Applied Microbiology (Közlésre leadva)

### Absztraktok:

1. Kusztos T., Kusztos I., Kocsis B., Szabó Gy.:  
Ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek hidrofóbitásának elemzése  
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet  
45: Suppl. I, pp. 39, 2002      Abstract
2. Than P., Kusztos T.:  
Significance of postoperative fever and changes in inflammatory laboratory parameters after total hip replacement  
4<sup>th</sup> CEOC, Book of Abstracts 93, 2002      Abstract
3. Kusztos T., Kusztos I., Bálint L., Kocsis B.:  
Ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek polietilén vápán történő megtelepedésének mikrobiológiai elemzése  
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet  
46: Supplementum 1, 43, 2003      Abstract

### Az értekezés tárgyköréből tartott előadások jegyzéke:

1. Kusztos T., Kusztos I., Kocsis B., Szabó Gy.:  
Ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek hidrofóbitásának elemzése  
Magyar Ortopéd Társaság (MOT) 45. Kongresszusa, Pécs 2002
2. Than P., Kusztos T.:  
Significance of postoperative fever and changes in inflammatory laboratory parameters after total hip replacement  
4<sup>th</sup> CEOC Dubrovnik, Croatia 2002
3. Kusztos T., Kusztos I., Szabó Gy., Kocsis B.:  
Analysis of hydrophobicity in bacterial strains isolated from orthopedic samples.  
SICOT/SIROT 2002, XXII World Congress, San Diego, USA 2002
4. Kusztos T., Kusztos I., Bálint L., Kocsis B.:  
Ortopédiai mintákból izolált baktérium törzsek polietilén vápán történő megtelepedésének mikrobiológiai elemzése  
Magyar Ortopéd Társaság (MOT) 46. Kongresszusa, Budapest 2003

**A szerző összes publikációjának jegyzéke:**

1. Moser T., Kusztos T., Schmidt B.:  
Arthroscopia a Gyermekorthopédiában  
Sportorvosi Szemle (Hungarian Review of Sports Medicine)  
33: 48-52, 1992
2. Szomor Z., Than P., Kusztos T.:  
A chondromalacia patellae gyakorisága serdülőkorú sportolóknál  
Hungarian Orthopaedic Association, Zimmer Nándor pályamunka, 1992
3. Szomor Z., Than P., Kusztos T.:  
A chondromalacia patellae műtéti kezelésének eredményei serdülőkorú sportolóknál  
Sportorvosi Szemle (Hungarian Review of Sports Medicine)  
34: 47-53, 1993
4. Kusztos T., Magdics M.:  
Kétoldali vorticolis  
Orvosi Hetilap 134: 2817-2820, 1993
5. Kusztos T., Than P., Szomor Z.:  
Incidence of chondromalacia patellae in adolescent athletes  
Orthopaedics International Edition 3: 433-436, 1995 Impact factor: 0.162
6. Than P., Bálint L., Kusztos T.:  
Orsochondroma ritka localisatioja: a scapula  
Orvosi Hetilap 136: 2047-2049, 1995
7. Than P., Bálint L., Kusztos T.:  
Ergebnisse der operative Behandlung bei Scapula Saltans und bei Exostosen des Schultergürtels  
Orthopädische Praxis 31: 439-442, 1995
8. Szomor Z., Than P., Kusztos T.:  
Az ellátás keresztirányú szakadásának kezelési eredményei klinikánkon  
(Results of the treatment of anterior cruciate ligament tear)  
Sportorvosi Szemle (Hungarian Review of Sports Medicine)  
37: 41-52, 1996
9. Kusztos T., Szabó Gy., Than P.:  
Részleges többszintű percutan achillostenotomia  
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet  
40: 205-209, 1997
10. Kránicz J., Than P., Kusztos T.:  
Long-term results of the operative treatment of clubfoot:  
A representative study  
Orthopaedics 21: 669-674, 1998 Impact factor: 0.287
11. Szabó G., Kusztos T., Grand F., Mester S.:  
Bone Substitution of Benign Bone Defects in Children  
Orthopaedic Update (India) 8: 236-238, 1998
12. Than P., de Jonge T., Szabó G., Kusztos T., Gomori E.:  
Multiple Familial Occurrence of Ochronotic Arthropathy  
Orthopaedics 21: 590-592, 1998 Impact factor: 0.287
13. Szabó G., Kusztos T., Jeyab Z.A.:  
Comparative Analysis of Two Techniques for Achilles Tendon Lengthening in Cerebral Palsy  
Emirates Med. J. 18: 41-43, 2000
14. Szabó Gy., Lovász Gy., Kusztos T., Bemér A.:  
Does lifestyle have an influence?  
J. Bone Joint Surgery (Br) 82 - B: 1167-1169, 2000 Impact factor: 1.612
15. Kusztos T., Szabó I., David M.:  
Fragminalis szerzet tapasztalataink arthroplasztikán későbbi ortopédiai beteggek prolongált profillaxiséban  
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet  
44: 28-38, 2001

16. Kusztos T., Kusztos I., Gonda E., Kocsis B., Szabó Gy., Kilar F.:  
Capillary electrophoresis study of outer membrane proteins of *Pseudomonas* strains upon antibiotic treatment  
J. Chromatography A 979: 277-284, 2002 Impact factor: 2.793
  17. Kusztos T., Bellvei A., Kocsis Z., Horváth A.:  
Mélybágyasztott BTB allograftnál végeztet primer LCA plasztikáknak központi eredményei  
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet  
46: 47-54, 2003
  18. Kusztos T., Kusztos I., Kilar F., Rappai G., Kocsis B.:  
Effect of antibiotics on cell surface hydrophobicity of bacteria causing orthopaedic wound infections  
Chemotherapy (Közlelés elfogadva) Impact factor: 1.129
  19. Kusztos T., Szabó I., Than P.:  
Veränderungen der Infektions-Laborparameter nach Endoprothesen-Implantationen  
Zeitschrift für Orthopädie (Közlelés leadva)
  20. Kusztos T., Bálint L., Than P., Bárdos T.:  
Primary Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using Patellar Bone Tendon Autograft or Allograft: a Comparative Study  
Orthopaedics (Közlelés leadva)
  21. Kusztos I., Kusztos T., Kilar F., Rappai G., Kocsis B.:  
Changes in bacterial hydrophobicity of orthopaedic isolates under antibiotic effect determined by the microbial adhesion to hydrocarbon method  
Journal of Applied Microbiology (Közlelés leadva)
- Megjelent absztraktok jegyzéke**
1. Bálint L., Gáspár T., Kusztos T.:  
Laryngális maszk alkalmazása low flow anaesthesiával.  
A Magyar Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Társaság Nemzeti Kongresszusa, Siófok 1996  
Abstract: 3.01.
  2. Kusztos T., Szabó Gy., Lovász Gy.:  
Prospective comparative analysis of mobility in osteoarthritic knees:  
Does lifestyle have an influence?  
J. Bone Joint Surgery (Br.) 83-B: Suppl. II: pp. 133, 2001  
Abstract  
Impact factor: 1.612
  3. Kusztos T., Than P., Kocsis Z., Szabó Gy.:  
Short term results of anterior cruciate ligament plasty with deep frozen allogenic BTB graft  
13<sup>th</sup> SICOT Trainees Meeting, Book of Abstracts 226, 2002  
Abstract
  4. Kusztos T., Than P., Kocsis Z., Szabó Gy., Bálint L.:  
Primary anterior cruciate ligament plasty with allogenic bone - patellar tendon - bone graft  
4<sup>th</sup> CEOC Book of Abstracts 115, 2002  
Abstract
  5. Than P., Kusztos T.:  
Significance of postoperative fever and changes in inflammatory laboratory parameters after total hip replacement  
4<sup>th</sup> CEOC, Book of Abstracts 93, 2002  
Abstract
  6. Szabó Gy., Fonay V., Kusztos T., De Jonge T., Illés T.:  
Mélybágyasztott elvű csontbank, 10 éves tapasztalatok  
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet  
45: Suppl. I, pp. 60, 2002  
Abstract
  7. Kusztos T., Kusztos I., Kocsis B., Szabó Gy.:  
Ortopédiai műtétből izolált baktérium törzsek hidrofilicitásának elemzése  
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet  
45: Suppl. I, pp. 39, 2002  
Abstract
  8. Kusztos T., Than P., Szabó Gy.:  
A csontbank szerepe a sportsebészetben  
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet és Plasztikai Sebészet  
45: Suppl. I, pp. 40, 2002  
Abstract

9. Kusztos T., Bálint L., Bárdsos T.:  
Comparative analysis of primary anterior cruciate ligament plasty with allogenic and autogenic bone-patellar tendon – bone graft  
6<sup>th</sup> EFORT Congress, Abstract Book 50, 2003      Abstract
10. Kusztos T., Kusztos L., Bálint L., Kocsis B.:  
Ortopédiai miniképből izolált baktérium törzsek polietilén vápán történő megspapadásának mikrobiológiai elemzése  
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet  
46: Supplementum 1, 43, 2003      Abstract
11. Bálint L., Kusztos T., Péterfy Z., Szabó Gy.:  
Csontcementből történő Gemtanyecin emissio in vivo detekálása évekkel nagyzillemi endoprothesis beültetése követően  
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet  
46: Supplementum 1, 21, 2003      Abstract
12. Kusztos T., Baljey Á., Vermes Cs.:  
A spaztikus betegségekkel alkalmazott percuan és nyílár Achillostenotomiák eredményeinek hosszú távú összehasonlító vizsgálata  
Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet  
46: Supplementum 1, 44, 2003      Abstract

Kumulatív Impact factor: 6,27