

Utjecaj biofilma kod stafilokokne infekcije oko čeličnih i titanijskih implantata

Hudetz, Damir

Doctoral thesis / Disertacija

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:235577>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Hudetz, Damir (2009) *Utjecaj biofilma kod stafilokokne infekcije oko čeličnih i titanijskih implantata*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/667>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Damir Hudetz

**UTJECAJ BIOFILMA KOD STAFILOKOKNE
INFEKCIJE OKO ČELIČNIH I TITANIJSKIH
IMPLANTATA**

DISERTACIJA

Zagreb, 2009.

Rad je izrađen u Znanstveno-istraživačkom centru Sveučilišne Klinike u Baselu, Švicarska te u Klinici za ortopediju Bruderholz, Basel, Švicarska .

Voditelj rada: dr.sc. Ante Muljačić, dr.med.

ZAHVALA

Po završetku želim najiskrenije zahvaliti svojim mentorima, prof. dr. sc. Regine Landmann i prof. dr. sc. Niklaus Friederich, koji su mi svojim savjetima i potporom pomogli u izradi ovog rada i uz koje stalno produbljujem znanja iz ortopedije i mikrobiologije.

Osobito sam zahvalan prof. dr. sc. Gojku Buljatu na prepoznavanju ideje i potpori pri odlasku u Švicarsku. Zahvaljujem se akademiku Marku Pećini na incijalnoj potpori za odlazak na stipendiju u Švicarsku 2002. godine što je rezultiralo pozivom prof.dr.sc. Niklaus Friedericha 2006. godine. Zahvaljujem se dr. sc. Anti Muljačiću kao mentoru pri pisanju ovog doktorata.

Srdačno zahvaljujem kolegama iz Laboratorija za infektivne bolesti Znanstveno-istraživačkog centra Sveučilišne Klinike u Baselu, na pomoći tijekom izvođenja rada u laboratoriju.

Na kraju, najtoplije zahvaljujem svojoj obitelji, koja je uvijek pa i tijekom pisanja ovog rada koji je od mene iziskivao potpunu predanost, bila uz mene. Posebno se zahvaljujem svojoj supruzi Sonji koja je bila uz mene u Baselu i aktivno je sudjelovala u radu u laboratoriju.

Damir Hudetz

U Zagrebu, 2009.

SADRŽAJ:

1. POPIS OZNAKA I KRATICA	1
2. UVOD	2
3. IMPLANTATI U ORTOPEDIJI	5
3.1. Povijesni pregled	5
3.2. Vrste implantata	7
3.2.1. Implantati za osteosintezu	7
3.2.2. Endoprotetski implantati	9
3.3. Materijali za izradu implantata	11
3.4. Površine biomaterijala	13
3.5. Indikacije za ugradnju implantata	16
3.6. Minimalno invazivni pristup	17
3.7. Komplikacije	19
4. INFEKCIJE OKO IMPLANTATA	21
4.1. Uvod i epidemiološki čimbenici	21
4.2. Najčešći uzročnici	22
4.3. Patogeneza	25
4.4. Klasifikacija infekcije	29
4.5. Dokazivanje infekcije	31
4.6. Liječenje infekcije	33
4.7. Eksperimentalni modeli	38
5. STAFILOKOKNA INFEKCIJA	
5.1. Uvod	40
5.2. Biofilm	42
5.3. Stafilocoki i površine implantata	45
6. HIPOTEZA	48
7. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA	48
8. MATERIJALI I METODE	50
8.1. Oblikovanje istraživanja	50
8.2. Mjesto istraživanja	50
8.3. Etički aspekt istraživanja	50
8.4. Postupci	50
8.4.1. Priprema materijala za implantaciju	50

8.4.2. Priprema sojeva stafilokoka	52
8.4.3. In vitro model adhezije stafilokoka	53
8.4.4. Miševi i „tissue cage model“	53
8.4.5. Pretražni elektronski mikroskop (SEM-„scanning electron microscope“)	56
9. STATISTIČKA ANALIZA	57
10. REZULTATI	58
10.1. Hrapavost površine biomaterijala – profilometrija	58
10.2. Rana adhezija <i>S.aureus</i> na različite biomaterijale in vitro	59
10.3. Rana adhezija <i>S.epidermidis</i> na različite biomaterijale in vitro	64
10.4. Jača adhezija biofilm pozitivnih <i>S.epidermidis</i> nego <i>S.aureus</i> za valjke izrađene od titanija i čelika in vitro	66
10.5. Jednako visoke koncentracije planktonskih biofilm pozitivnih i negativnih <i>S.aureus</i> nakon poslijeoperacijske infekcije titanijskih i čeličnih implantata	72
10.6. Male koncentracije adherentnih biofilm pozitivnih i negativnih <i>S.aureus</i> na valjcima od titanija i čelika in vivo	74
10.7. Skroman utjecaj <i>ica</i> gena i snažan utjecaj vremena inokulacije na infekciju titanijskih i čeličnih implantata sa <i>S.epidermidis</i>	75
10.8. Visok omjer adherentnih <i>S.epidermidis</i> nakon perioperacijske infekcije kod svih implantata	78
10.9. Infiltracija leukocita i njihovo preživljavanje	
11. RASPRAVA	79
12. ZAKLJUČAK	82
13. SAŽETAK	87
14. SUMMARY	89
15. LITERATURA	90
16. ŽIVOTOPIS	91

1. POPIS OZNAKA I KRATICA

EP	endoproteza
TEP	totalna endoproteza
AO	„Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen“, njem. udruga za pitanja osteosinteze
IM	intramedularni
VF	vanjski fiksator
MSCRAMM	„microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“, engl. komponente mikrobijalne površine koje prepoznaju molekule adhezivnog matriksa
CRP	C reaktivni protein
PCR	„polymerase chain reaction“, engl. lančana reakcija polimeraze
CT	kompjutorizirana tomografija
MR	magnetska rezonanca
PET	„positron emission tomography“, engl. tomografija emisije pozitrona
EPS	egzopolisaharid ili „extracellular polymeric substance“, engl. ekstracelularna polimerna tvar
PIA	polisaharidni intercelularni adhezin
ECM	ekstracelularni matriks
MRSA	meticilin rezistentni <i>S.aureus</i>
TSB	„tryptic soy broth“, engl. triptikaza soja bujon
CFU	„colony forming units“, engl. jedinice koje stvaraju kolonije
SEM	„scanning electron microscope“, engl. pretražni elektronski mikroskop

2. UVOD

Posljednjih nekoliko desetljeća broj kirurških zahvata na lokomotornom sustavu prilikom kojih se ugrađuju implantati u stalnom je porastu. Predviđanja su da se ovaj trend neće promijeniti nego će se bilježiti još veći porast broja pacijenata s ugrađenim implantatima.

Ortopedske implantate dijelimo u različite grupe prema funkciji i namjeni. Razvojem tehnologije proizvodnje implantati postaju sve složeniji po svojoj strukturi i izgledu. Materijali korišteni za izradu implantata nazivaju se biomaterijali zbog nužnosti da zadovoljavaju stroge biološke kriterije kod ugradnje. Najčešća primjena implantata u ortopediji svodi se na pružanje potpore ili zamjenu funkcije dijela lokomotornog sustava odnosno kosti i zglobova. Potporna funkcija implantata koristi se kod osteosinteze za vrijeme koje je potrebno za proces cijeljenja kosti na mjestu prijeloma ili osteotomije. Za ovu svrhu upotrebljavaju se pločice, vijci, žice, intramedularni čavli i sl. Za zamjenu patološki promijenjenih zglobova koriste se endoproteze. Primjeri najupotrebljavanijih biomaterijala su nehrđajući čelik, titanij, legure krom molibdena, polietilen, keramika, silikonski polimeri, hidroksiapatit, polilaktična kiselina i različiti kompozitni materijali.

Nezadrživi tehnološki napredak snažno utječe na razvoj osteosintetske, endoprotetske i rekonstruktivne kirurgije lokomotornog sustava. Unatoč velikom broju kosti u ljudskom organizmu, gotovo da ne postoji lokalizacija koja nije opskrbljena specifičnim implantatom za osteosintezu. Liječenje prijeloma dobiva velike mogućnosti razvojem novih, bolje prilagođenih, biokompatibilnijih implantata što pozitivno utječe na kvalitetu rezultata. Endoprotetska kirurgija je još propulzivnija od osteosinteske zbog većeg zamašnjaka industrije koja pruža logističku potporu i osigurava razvoj novih tipova endoproteza. Rekonstruktivna kirurgija je primarno bila vezana uz zglob koljena i prednji križni ligament,

međutim danas su nove rekonstruktivne procedure obuhvatile sve veće zglobove. U domeni fiksacije presadaka kod rekonstruktivne kirurgije također se proizvode raznovrsni implantati.

Sve navedene grane ortopedske kirurgije koriste implantate i danas se provode gotovo rutinski operacijski zahvati diljem svijeta. Uz mnogobrojne, nesumnjivo pozitivne rezultate, jedan dio operacijskih zahvata može završiti s određenim komplikacijama. Povećanjem apsolutnog broja operiranih pacijenata povećava se i incidencija komplikacija. Kad su u pitanju metalni implantati moguće je pucanje implantata, korozija, galvanizirajuća korozija kod primjene različitih metala, povećano trenje i trošenje materijala, infekcija i vrlo rijetko maligna alteracija [2]. Infekcija implantata jedna je od najčešćih komplikacija prisutna u svim granama ortopedije.

Metal ne može izazvati infekciju, ali može pospješiti razvoj infekcije nudeći prihvatljiv supstrat za rast bakterija i onemogućavajući dreniranje [2]. U ortopediji i traumatologiji se koriste implantati izrađeni najčešće od različitih vrsta nehrđajućeg čelika ili titanija. Spomenuti materijali osim različitosti po kemijskom sastavu, primjenjuju se u raznim oblicima završne obrade ovisno o svojoj površnoj strukturi. Površna struktura materijala definirana je kao hrapavost. Hrapavost biomaterijala određuje veličinu ukupne površine implantata što pak utječe na brojna svojstva, određuje biokompatibilnost s organizmom domaćina i potencijalnim uzročnikom infekcije.

Infekcija može biti uzrokovana kolonizacijom za vrijeme operacije odnosno ugradnje implantata što nazivamo intraoperacijskom infekcijom [3]. U kasnijoj fazi, već 14 dana poslije operacije, infekcija može nastati hematogenim putem. Neposredno nakon ugradnje implantata bakterije, proteini iz plazme i stanice domaćina „natječu se za zauzimanje“ površine [4, 5]. Površina implantata brzo se pokriva s proteinima i stanicama. Svako nekrotično ili slabo prokrvljeno tkivo kao i ekstracelularna tekućina koji se nalaze u prostoru

između implantata i zdravog tkiva, stvaraju pogodno stanište za adheziju bakterija i njihov rast[6].

Adherencija bakterija na površinu implantata odvija se u dvije faze[3]. U prvoj fazi bakterije adheriraju posredstvom egzopolisaharida na svojoj površini te posredstvom komponenti na površini koje prepoznaju molekule adhezivnog matriksa (MSCRAMM) kao što su fibronektin, fibrinogen i proteini vezani uz kolagen. Nakon toga bakterije se grupiraju u višeslojnim strukturama biofilma posredstvom egzopolisaharida [7, 8]. Biofilm čini bakterije manje osjetljivim u odnosu na imunološki sistem domaćina kao i prema antibioticima [7, 9]. Infekcije oko implantata često su uzrokovane bakterijama koje rastu u biofilmu [10].

Uloga biofilma u stafilokoknoj infekciji oko čeličnih i titanijskih implantata nije potpuno jasna. Zbog toga je u ovom radu korišten dobro istražen model infekcije na mišu s rešetkastim valjkom uz primjenu najčešće upotrebljivanih komercijalnih materijala kao što su titanij i nehrđajući čelik, kvalitete primjerene izradi implantata. Osjetljivost ovih materijala na infekciju biofilm pozitivnim i biofilm negativnim *S.aureus* i *S.epidermidis* istražuje se na modelu miša *in vivo* mjerenjem minimalno infektivne doze dostatne za razvoj trajne infekcije te mjerenjem plivajućih i adheriranih bakterija *ex vivo* na rešetkastim valjcima. Trajna infekcija definira se kao slučaj u kojem je za čitavo vrijeme trajanja pokusa moguće dokazati prisutnost bakterija. Prije ispitivanja na animalnom modelu osjetljivost različitih materijala testira se u *in vitro* pokusima.

3. IMPLANTATI U ORTOPEDIJI

3.1. Povijesni pregled

Kirurgija lokomotornog sustava evoluirala je u devetnaestom i dvadesetom stoljeću više nego u dva tisućljeća koja su njima prethodila. Svakodnevni život prožela su tehnološka dostignuća. Tehnologija je stoljećima prije imala malu ulogu u medicinskoj praksi, a praktične procedure provodili su manje sposobni, niže rangirani liječnici. Nakon industrijske revolucije znanost i tehnologija postali su nerazdvojno povezani. Od tog trenutka kreće i ubrzano uvođenje tehnoloških rješenja u medicinsku praksu [11].

Početak današnje ortopedije veže se uz pionirska nastojanja Jean André Venel-a da osnuje prvu specijaliziranu ustanovu za pružanje medicinske skrbi djeci sa skeletalnim deformacijama. Godine 1780. osnovan je prvi ortopedski institut u mjestu Orbe pokraj Ženeve u Švicarskoj [11]. Naziv ortopedije prvi puta se pojavljuje u frankofonskom prostoru (složenica od dviju grčkih riječi značenja: uspravan i dijete) objavljivanjem Nicholas Andry-eva djela: „*L'Orthopédie, ou l'art de prévenir et de corriger dans les enfants, les difformités du Corps*“, 1741. g. u Parizu. Prvotno je primjenjivano konzervativno liječenje i prevencija. Izvođenjem vježbi najčešće su liječeni deformiteti kralješnice. Sredinom 19-og stoljeća ortopedska kirurgija postala je priznata kao kirurška grana istovremeno s oftalmologijom. Snažan impuls razvoju kirurških tehnika liječenja daju okolnosti u kojima se javlja sve više ranjenika iz brojnih ratova. Za vrijeme srednjeg vijeka ranjenici su liječeni zavojima natopljenim krvlju ranjenih konja koji su nakon zgrušavanja bili dovoljno kruti da mogu imobilizirati ozlijeđeni ekstremitet. Povremeno su se javljali pokušaji operacijskog liječenja koji su najčešće završavali smrtonosnom sepsom. Zbog takvih okolnosti kirurško liječenje bilo je orijentirano prema spašavanju života odnosno amputacije ekstremiteta, a ne kompromitiranja izgleda za preživljavanje procedurama s velikom stopom komplikacija.

Uvođenjem tehnologije u medicinu počeo se mijenjati i princip edukacije liječnika pa obrazovanje na medicinskim školama u potpunosti istiskuje prenošenje znanja unutar obitelji „s koljena na koljeno“. U 18-om stoljeću velik doprinos znanju iz ortopedije dali su Percivall Pott, John Hunter i William John Little. 1846.g. Henry Jacob Bigelow i Dr. J.C. Warren izvode prvu ortopedsku operaciju u anesteziji eterom. Termin „anestezija“ uveo je Oliver Wendell Holmes [12]. Otkriće i primjena anestezije uz kontrolu boli snažno je potaklo daljnji razvoj ortopedije i povećalo broj izvedenih zahvata.

Slijedeći problem koji se počeo nametati bila je prevelika učestalost infekcije i sepse. U početku se čak smatralo da je infekcija jedan od stadija cijeljenja rane. Joseph Lister 1865.g. prvi je počeo koristiti spoznaje Louisa Pasteura primjenom karbonske kiseline u aerosolu s namjerom da spriječi pristup mikroorganizama rani. Mjere antiseptike se vrlo brzo razvijaju i proširuju na sterilne rukavice, kape i maske kao i na procedure sterilnog pranja i pokrivanja čime se rizik od infekcije značajno smanjuje [13].

Novo razdoblje u razvoju ortopedskih implantata javlja se 40-tih i 50-tih godina dvadesetog stoljeća kada zdravstvena osiguranja počinju postavljati pitanje kako je moguće da prijelom zacijeli za 6-12 tjedana, a pacijentu je potrebno 6-12 mjeseci da se potpuno funkcionalno oporavi. Od tada se počinje financirati znanstveno-istraživački rad koji je između ostalog doveo i do stvaranja AO grupe („Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen“ njem. Udruga za osteosintezu) 1958.g. u Švicarskoj.

Ovaj doktorat bavi se temom koja je nastala upravo zbog posljedice tehnološkog napretka kao i napretka medicine. Tehnološki napredak uveo je implantate u medicinu, a usavršavanjem kirurških postupaka njihova upotreba postaje sve češća. Usprkos nezadrživom napretku komplikacije liječenja uz pomoć implantata se javljaju. Jedna od najozbiljnijih komplikacija je infekcija.

3.2. Vrste implantata

Ortopedski implantati moraju zadovoljiti brojne zahtjeve. Moraju biti dovoljno snažni kako bi izbjegli pucanje, moraju biti konstruirani od biokompatibilnih materijala i imati dugi vijek trajanja bez održavanja. Primjena implantata mora biti moguća kroz što jednostavnije operacijske procedure uz minimalnu poslijeoperacijsku bolnost i vrijeme oporavka. Današnji implantati namijenjeni su specifičnoj upotrebi. Većina truda pri proizvodnji implantata usmjerena je na geometriju i izbor materijala koji je biokompatibilan uz pružanje dovoljno snage i krutosti. Krutost materijala jedna je od temeljnih strojarskih vrijednosti koja se uzima u obzir pri odabiru materijala.

3.2.1. Implantati za osteosintezu

Osteosinteza podrazumijeva kirurški zahvat kojim se spajaju i učvršćuju fragmenti kosti nakon prijeloma ili osteotomije. U liječenju prijeloma kosti postoje temeljni principi: točno namještanje prijeloma, zadržavanje položaja fragmenata dok ne srastu čvrstim kalusom i mogućnost rane rehabilitacije. Metoda osteosinteze u potpunosti ispunjava te temeljne principe. Za ovu svrhu koriste se žice, vijci, čavli, pločice (slika 1.), vanjski fiksatori itd [14]. AO grupa je osnovana s namjerom da promiče interes i znanje u zbrinjavanju pacijenata s ozljedama skeleta i posljedičnim tegobama. Danas se AO grupa razvila u svjetski značajno znanstveno-kirurško udruženje koje nastoji ponuditi algoritme u liječenju i zbrinjavanju pacijenta s fokusom na što bržu rehabilitaciju i povratak funkcije [1]. Idealan implantat za osteosintezu ispunjava dvije funkcije: 1) repozicija ulomaka za vrijeme operacije i 2) stabilizacija ulomaka za vrijeme cijeljenja.

Pločice za osteosintezu nakon kirurške ekspozicije kosti dolaze na periost i ostaju ispod mišićnog tkiva gdje djeluju kao udlage koje omogućavaju cijeljenje kosti. Osnovna im je funkcija stabilizacija koštanih fragmenata, a proizvode se najčešće od titanija ili

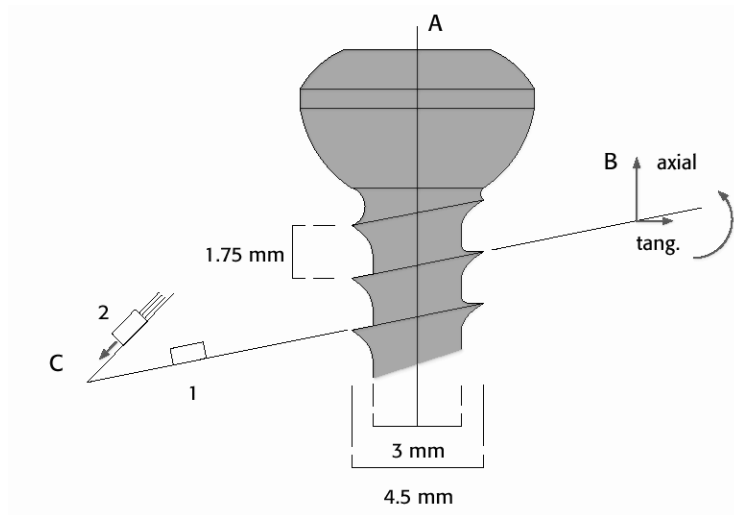
nehrđajućeg čelika. Brojni su proizvođači i pojavni oblici koji su u upotrebi. Pločice se razlikuju po veličini i prilagođenosti posebnim anatomskim regijama. Funkcionalno postoje potporne pločice, DCP (engl. „dynamic compression plate“; dinamičko kompresivne pločice), LC-DCP (engl. „limited contact -dynamic compression plate“; dinamičko kompresivne pločice smanjene kontaktne površine), LCP (engl. „locking compression plate“; zaključavajuće kompresivne pločice), rekonstrukcijske, zakrivljene ili tubularne, pritezne i pločice specifične za pojedine anatomske regije (npr. radijus, humerus, kralješnica itd.) [1]. S aspekta ovog istraživanja bitno je razlikovati dvije vrste pločica: 1) stariji dizajn kod kojeg je pločica većinom svoje površine u kontaktu s podliježećom kosti i 2) noviji dizajn kao npr. LC-DCP kod kojeg je pločica odmaknuta od kosti i pri tome manje kompromitira biologiju kosti. Kod novije konstrukcije pločica za osteosintezu manja je mogućnost da se stvori slabije prokrvljeno tkivo uz mjesto prijeloma. U ishemijskim uvjetima veća je mogućnost nekroze što povećava i mogućnost infekcije. S druge strane u okolnostima gdje pločica odstoji od kosti stvara se virtualni prostor ispunjen međustaničnom tekućinom sve dok se ne popuni vezivnim tkivom. U ovoj ranoj fazi pločice koje odstoje od kosti mogu biti podložnije kolonizaciji bakterijama.



Slika 1. Primjer pločice za osteosintezu izrađene od titanija

Vijci služe kao izvrstan alat za fiksaciju prijeloma metodom interfragmentarne kompresije ili stabilizacijom konstrukcije koja djeluje poput udlage (npr. ploča, IM čavao ili

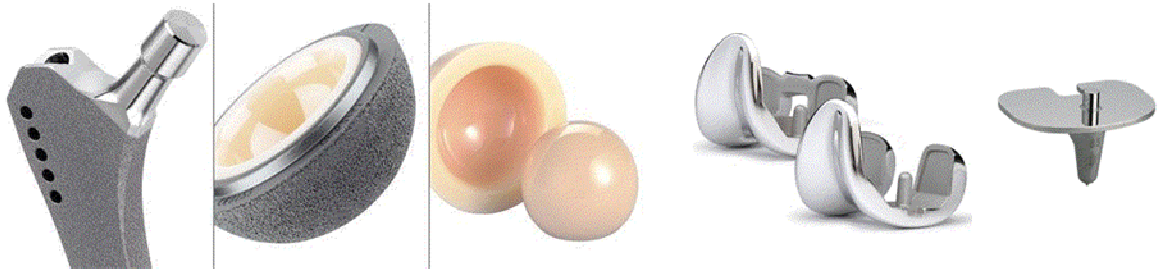
vanjski fiksator VF). Mehaničke konstrukcijske osobine vijka mogu se iskoristiti na način da okretanjem vijka u smjeru kazaljke na satu postizemo aksijalnu kompresiju zbog kosine ravnina navoja (Slika 2.). Pri tome vijak dolazi u neposredan kontakt s kosti, dok je glava vijka pritegnuta ili u kost ili u neku od dodatnih fiksacijskih konstrukcija [15]. Postoje dvije osnovne vrste vijaka: kortikalni i spongiozni.



Slika 2. Primjer konstrukcije vijka za osteosintezu[1]

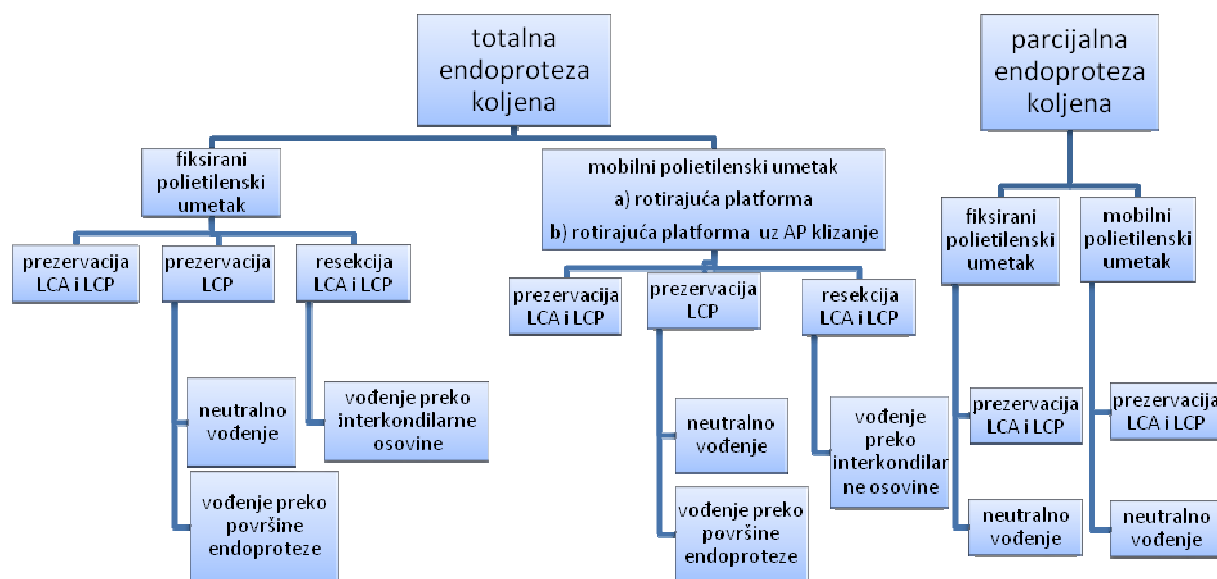
3.2.2. Endoprotetski implantati

Kirurški zahvat kojim se formira zglob koji morfološki i funkcionalno odgovara normalnome zglobovima naziva se artroplastikom. Artroplastika se prvenstveno odnosi na ugradnju umjetnih zglobova, endoproteza što se preciznije naziva aloartoplastika (Slika 3.). Postoje brojne opcije dizajna endoproteza[16]. Kao primjer prikazuje se endoproteza koljena iz kojeg se vidi koliko je složen izbor implantata ovisno o indikaciji za ugradnju [17] (Slika 4.). Anatomski gledano gotovo svi veći zglobovi mogu biti zamijenjeni, najčešće se međutim ugrađuju EP kuka, koljena pa ramena. Broj ovakvih operacija svake godine raste kao i broj centara u kojima se izvode.



Slika 3. Dijelovi EP zgloba kuka i koljena s potencijalnim površinama za kolonizaciju mikroorganizama

Endoproteze su razvrstane prema različitim kriterijima, mogu biti djelomične ili parcijalne i potpune ili totalne. Parcijalna EP nadomješta samo jedan najčešće konveksni dio zgloba, a totalna EP zamjenjuje oba zglobna tijela. Prema načinu fiksacije EP dijelimo na bescementne, cementne i hibridne. Važna razlika između cementnih i bescementnih EP je u njihovom obliku i površinama. Cementne EP imaju potpuno glatke površine, dok bescementne moraju biti hrapave s makro i mikro porama u koje kasnije urasta kost. Prema indikacijama za ugradnju endoproteze se dijele u primarne ili standardne, revizijske ili sekundarne, inverzne (zamjena konveksnog i konkavnog zglobnog tijela npr. ramena) i specijalne ili tumorske. Postoje još i primarne EP koje se primjenjuju u slučajevima kada nije moguće izvršiti uspješnu osteosintezu frakturiranih ulomaka pa se iste nazivaju trauma EP.

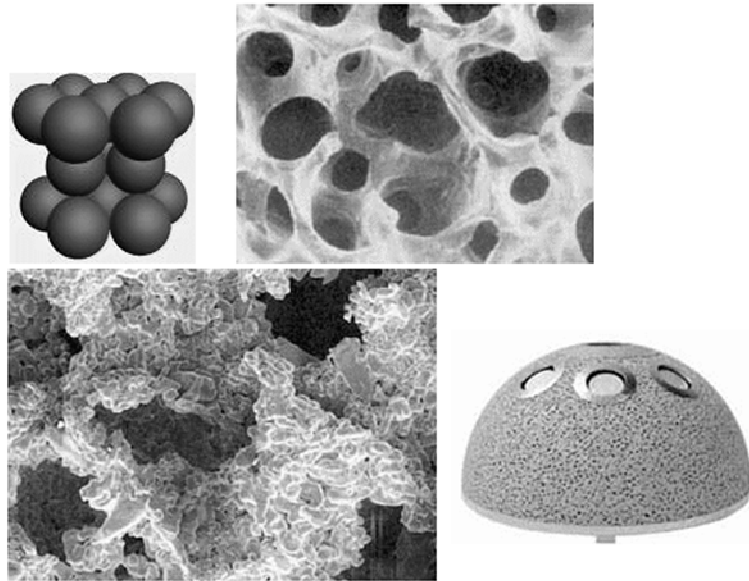


Slika 4. Mogućnosti dizajna endoproteza koljena

3.3. Materijali za izradu implantata

Materijali su tijekom razvoja ortopedije predstavljali stavku koja je, u početku, ograničavala inženjere i kirurge. Napredak je bio ograničen slabim razumijevanjem fizike i biologije ljudskog organizma pa su korišteni materijali poput običnog čelika s velikim udjelom ugljika i životinjske kosti. Snažna negativna biološka reakcija na ove materijale uvela je znanost u područje istraživanja biokompatibilnosti. Zbog korozije metalni implantati nisu bili prihvatljivi sve do pojave nehrđajućeg čelika. Mijenjanjem i prilagođavanjem dizajna uz detaljno razvijen postupak proizvodnje određenih implantata maksimalno se iskorištavaju kapaciteti materijala. Biomaterijali moraju posjedovati određenu čvrstoću (lom, zamor materijala itd.), postojanost na oštećenja (trošenje zglobnih površina i koroziju), dobru biološku podnošljivost (reakcija na strano tijelo – toksičnost te kemijske, kancerogene i imunološke reakcije). Prilikom sterilizacije ne smiju biti narušene osobine endoproteze.

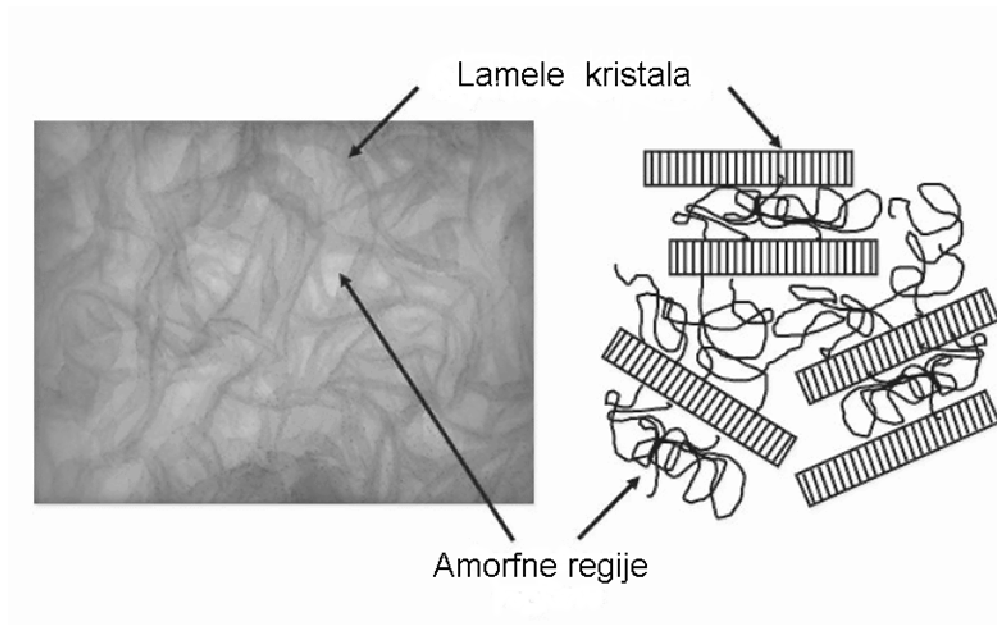
Legure kobalta postaju dostupne 30-tih godina dvadesetog stoljeća. Titanij i njegove legure počinju se upotrebljavati 80-tih godina i zbog svoje biokompatibilnosti u usporedbi s ostalim materijalima koriste se vrlo često (Slika 5.). Legura titanija Ti-6Al-4V je u širokoj upotrebi u gotovo svakoj endoprotezi (EP) [18].



Slika 5. Strukture titanija: kristalna struktura, trodimenzionalna rešetkasta struktura pri manjem i većem povećanju, implantat

Sintetski polimeri zauzimaju značajno mjesto pri konstruiranju i upotrebi implantata. U početku su se koristili materijali poput poliamida, politetrafluoretilena (PTFE) i polimetilmetakrilata (PMMA) koji su imali ograničena fizikalna i kemijska svojstva. Boljim kontroliranjem procesa proizvodnje i sinteze dobiveni su bolji materijali poput ultra visoko molekularnog polietilena (UHMWPE) (Slika 6.) koji danas predstavlja materijal izbora za proizvodnju komponenti endoproteza [18]. Danas su vrlo često u upotrebi i implantati izrađeni od PLLA (poli-L-laktid), posebno u zoni gdje nema velikog opterećenja. PLLA se najčešće koristi za izradu vijaka kojima se fiksiraju transplantati ligamenata i tetiva.

Mehanička svojstva, biokompatibilnost i dizajn implantata odražavaju se direktno na ishod liječenja pacijenata.



Slika 6. Kombinacija amorfno – kristalne strukture ultra visoko molekularnog polietilena UHMWPE [18]

3.4. Površine biomaterijala

Nehrđajući čelik, titanij i legure titanijske najčešće su upotrebljavani materijali za osteosintezu. Razlike između ovih materijala su dobro dokumentirane te povezuju nehrđajući čelik s većom stopom infekcije u odnosu na titanij [19] [20-22]. Pokazano je da je adhezija i proliferacija fibroblasta na površini titanijskih implantata inhibirana što može u in vivo uvjetima omogućiti rast bakterija [23]. Malo je dostupnih podataka o ponašanju i reakciji bakterija u prisustvu legura titanijske. U in vitro uvjetima rad Delmi i sur. te Ha i sur. pokazuje

opsežno adheriranje i stvaranje biofilma *S.aureus* i *S.epidermidis* na površini implantata od legure titanija za razliku od površine izrađene od nehrđajućeg čelika [24, 25]. Gracia i sur. nisu pak našli značajne razlike u adheziji *S.aureus* na površine implantata od titanija i nehrđajućeg čelika[26].

Kako bi se biomaterijali učinili manje interaktivnim s bakterijama potrebno je napraviti specifične promjene u dizajnu same površine. Različiti postupci u završnoj obradi površina biomaterijala korišteni su za promjenu topografije i kemijskih svojstava titanija i njegovih legura [23, 27]. Jedan smjer prema postizanju manje interakcije s bakterijama uključuje poliranje metalnih površina obzirom da je poznato kako hrapavi implantat pospješuje bakterijsku adheziju zbog veće ukupne površine [28, 29]. Elektropoliranjem titanija i titanijevih legura dobivene su površine koje su biokompatibilnije za fibroblaste od standardnih površina u uvjetima statičkih kultura [23]. Nasuprot tome pokazano je da nema značajne razlike između adhezije *S.aureus* na mikrohrapavi standardni titanij i na elektropolirani glatki standardni titanij u statičkim uvjetima in vitro [30]. Ista grupa pokazala je da legura Ti-6Al-7Nb elektropoliranjem postaje manje pogodna za prijanjanje *S.aureus* što može biti korisno za izradu intramedularnih čavla. Postoji mogućnost presvlačenja titanija ili nehrđajućeg čelika dušikovim ionima što povećava otpornost i kemijsku topografiju površine [31]. Dušikovi ioni na površini titanija pospješuju vezanje i rast fibroblasta [32, 33] i istovremeno smanjuju adheziju *S.aureus* [30], *S.epidermidis* [31], *Streptococcus mutans* i *Pseudomonas aeruginosa* [31]. Ovakva završna obrada i površina implantata pogodna je za osteosintezu.

Presvlačenje implantata slojevima odbojnim za proteine omogućava smanjenu adsorpciju proteina, smanjen razvoj biofilma i smanjeno prijanjanje bakterija. Takav učinak može se postići presvlačenjem implantata proteinima poput heparina i albumina, modifikacijom površine hidrofiličnim lancima, fosforil-kolin modificiranim polimernim slojem

ili slojem polietilenglikola (PEG) [28, 34-38]. Slojevi na površini implantata koji sadrže hidrofilne proteine (npr. albumin) inhibiraju adheziju *S.aureus* i *S.epidermidis* zbog ometanja hidrofobne interakcije između staničnih stijenka bakterija i površine metala [39]. Osim inhibicije adhezije bakterija takva vrsta završnog sloja na površini implantata inhibira i adheziju proteina što može koristiti kod prijeloma gdje nije poželjna ni adhezija tkiva kao npr. tetiva kod prijeloma distalnog radijusa. Zaštitni sloj različitih koncentracija fibronektina na površini implantata može optimizirati adheziju fibroblasta bez stimulacije adhezije bakterija [40]. PLL-g-PEG (poli-l-lizin-polietilenglikol) sloj na površini implantata vrlo je učinkovit u smanjivanju adsorpcije krvnog seruma, plazme i proteina poput albumina i fibrinogena [41]. U in vitro pokusima PLL-g-PEG pokazao se kao sloj koji učinkovito smanjuje adheziju *S.aureus*, *S.epidermidis*, *P.aeruginosa*, *Streptococcus mutans* [42, 43]. Hijaluronska kiselina pokazuje također svojstva koja su vrlo korisna za površni sloj implantata za osteosintezu. Ona kao hidrofilna makromolekula inhibira adsorpciju proteina, fibroblasta i bakterija [44].

Infekcije povezane s implantatima liječe se kirurškim čišćenjem i antibioticima, međutim sistemska primjena antibiotika povezana je s nuspojavama kao posljedicom njihove toksičnosti, ali i slabim prodiranjem do mjesta gdje je potrebno njihovo djelovanje [45]. Lokalna primjena antibiotika pokazala se uspješnom u liječenju infekcija pa se opravdanom pokazala želja za presvlačenjem osteosintetskih implantata (izrađenim od nehrđajućeg čelika i titanija) tankim slojem polimera s antibiotikom. Biokompatibilni i biorazgradivi polimeri koji se koriste za ovu svrhu su PLGA (polilaktična-glikolna kiselina) i PDLLA (poli-D,L-laktid) [46-52]. Ideja ovog pristupa sastoji se u polaganom lokalnom otpuštanju antibiotika paralelno s razgradnjom polimernog sloja. Istraživanja su provedena s gentamicinom, ciprofloksacinom i vankomicinom te se kao glavna opasnost nametnula mogućnost razvoja rezistencije na antibiotike. Kako bi se izbjegla ova neželjena posljedica mora se izbjegavati

upotreba kombinacije antibiotika, a koncentracija otpuštenog antibiotika mora trajno biti iznad minimalno inhibitorne koncentracije [8].

Alternativa upotrebi antibiotika je korištenje antiseptika na površini implantata. Antiseptici kao klorheksidin ili kvartarne soli amonijaka imaju široki spektar aktivnosti protiv Gram pozitivnih i negativnih bakterija [53, 54]. Antiseptici imaju nuspojave u smislu preosjetljivosti tkiva domaćina te djeluju letalno na fibroblaste istim mehanizmom kojim razgrađuju staničnu stijenku bakterija, ali mogu razviti i rezistenciju bakterija [53, 55].

Veliki broj istraživanja proveden je s ionima srebra kao površnim slojem na implantatima za osteosintezu. Poznato je da ioni srebra imaju široki spektar antibakterijskih svojstva [56, 57]. Istraživanja su provedena s polimernim i metalnim implantatima, posebno onim za primjenu kod vanjskih fiksatora [58, 59]. Srebrom presvučeni pinovi za vanjske fiksatore od nehrđajućeg čelika pokazali su smanjenu adheziju i kolonizaciju *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli* i *P.aeruginosa* [60, 61]. Postoje i rezultati istraživanja koji pokazuju da ioni srebra mogu biti i citotoksični te da uzrokuju jaku upalnu reakciju [62, 63]. Zbog citotoksičnosti počele su se istraživati nano čestice srebra veličine 5 do 50 nm, a in vitro istraživanja su pokazala djelotvornost protiv MRSA i MRSE bez znakova citotoksičnosti [61].

3.5. Indikacije za ugradnju implantata

Postavljanje indikacije za operacijski zahvat u smislu osteosinteze odnosi se na pacijente koji su doživjeli neku vrstu traume. Muskuloskeletalne ozljede vrlo često su udružene s drugim ozljedama pa je svakog pacijenta potrebno cjelovito dijagnostički obraditi, promatrati ga u kontekstu politraume i donijeti odluku na temelju cjelovite slike. Prema redoslijedu važnosti u kirurškom zbrinjavanju ozljeda lokomotornoga sustava prioriteta su: 1) spašavanje života i vitalnih funkcija, 2) spašavanje ozlijeđenog ekstremiteta, 3) spašavanje zgloba i 4) vraćanje funkcije. Pri stvaranju plana liječenja nije važno samo odrediti tip

prijeloma već i odrediti stupanj ozljede mekih tkiva. Potonje je od velike važnosti za prosudbu potencijalne opasnosti od infekcije [1].

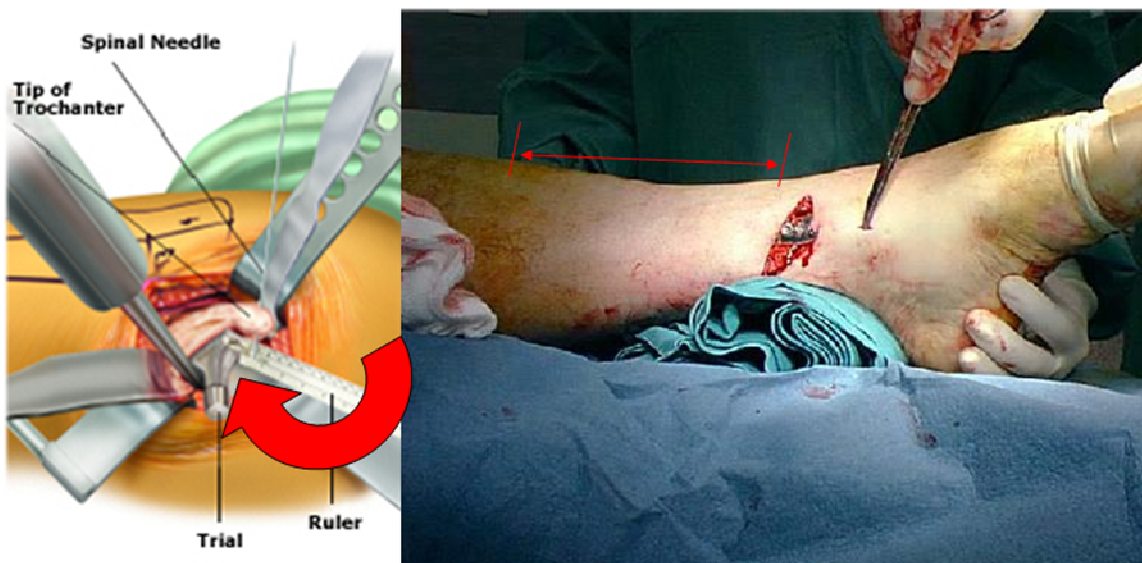
Deformacije osovine kosti vrlo često predstavljaju problem u ortopedskoj praksi. Kao metoda izbora u liječenju u obzir dolazi metoda izvediva u različitim anatomskim regijama pod nazivom korektivna osteotomija. Kod ove metode osnovni princip sastoji se u operacijski stvorenoj pukotini na kosti kako bi se postigla što bolja korekcija osovine. Za stabilizaciju nastalih ulomaka koriste se implantati za osteosintezu. Razlika između traumatiziranog pacijenta i pacijenta za korektivnu osteotomiju, s aspekta potencijalne infekcije sastoji se u činjenici da kod korektivne osteotomije kirurški pristup minimalno traumatizira meka tkiva za razliku od traumatološkog pacijenta koji je već ozlijeđivanjem dobio podlogu za moguću infekciju.

Indikacije za primjenu artroplastike su fibrozno ili koštano ankilozirani zglobovi te degenerativno, traumatski ili upalno destruirani zglobovi. Umjetni se zglobovi ugrađuju u tijelo umjesto patološki promijenjenih ili razorenih zglobova[14].

3.6. Minimalno invazivni pristup

Evolucijom materijala i dizajna implantata mijenjaju se i tehnike ugrađivanja. Osnovna težnja ortopedskog liječenja je što brži oporavak i vraćanje funkcije. Novi trend u kirurgiji kojim se želi postići ovaj cilj naziva se minimalno invazivna kirurgija. Kod ove tehnike kirurški pristup nastoji biti što pošteniji u smislu ozlijeđivanja tetiva, mišića i ostalih mekotkivnih struktura, uz pristup između ravnina inervacije različitih živaca. Složenost kirurških procedura, vrijeme rehabilitacije i poslijeoperacijske boli može se značajno reducirati ovim pristupom. Minimalno invazivne kirurške procedure razvijene su za brojne

rutinske operacije. Većina ovih procedura fokusirane su na mekotkivne operacije (kardiokirurgija, abdominalna kirurgija ...). Nesrazmjerno malo operacija razvijeno je kako bi se smanjila veličina i oblik incizija potrebnih da se implantat postavi na kost. Postoji čitav niz praktičnih razloga koji uzrokuju kašnjenje koštanozglobne kirurgije za ovim trendom. Neke ozljede kao prijelomi rezultiraju pojavom velikog broja malih fragmenata koji se moraju izvaditi s mjesta ozljede. Potpuna vizualizacija i odstranjivanje može se postići u ovim slučajevima jedino potpunom ekspozicijom koštanog tkiva. Drugi razlozi sporijeg razvoja minimalno invazivne kirurgije nalaze se u području razvoja instrumentarija za ugradnju implantata i materijala od kojih se sami implantati proizvode. Većina implantata još uvijek su izrađeni od metala koji imaju veliku krutost pa samim time ograničavaju mogućnosti razvoja tehnike operiranja. Unatoč navedenim preprekama danas postoje brojne procedure osteosinteze i endoprotetike koje poštuju načela minimalne invazivnosti (Slika 7.). Kod ovakvih procedura kao neželjene posljedice javljaju se produženi kontakt instrumentarija i implantata s površinom kože za vrijeme trajanja operacijskog zahvata. U usporedbi s klasičnim tehnikama operiranja potrebne su brojnije distrakcijske kuke i pomoćni instrumenti. Jedna od najvažnijih pretpostavki kolonizacije implantata bakterijama i kasnije infekcije jest transfer bakterija među različitim površinama u operacijskoj dvorani[64]. Kod minimalno invazivne tehnike operiranja upravo je povećana potencijalna mogućnost transfera bakterija između površina instrumentarija, rukavica, operacijske odjeće i drške svjetla zbog produženog i prisnijeg kontakta s kožom.



Slika 7. Minimalno invazivne tehnike ugradnje implantata: 1) endoproteza zgloba kuka s 5 kuka za retrakciju tkiva (lijevo); 2) pločica za osteosintezu potkoljenice postavljena na kost kroz manju poprečnu inciziju

3.7. Komplikacije

Komplikacije primjene ortopedskih implantata mogu se podijeliti prema funkciji implantata. Postoje brojne komplikacije povezane sa samim operacijskim liječenjem, međutim ovdje se ograničavamo isključivo na one povezane s primjenom implantata. Najmanje učestala komplikacija primjene implantata je pucanje samog implantata. Mala učestalost upućuje na kvalitetu i čvrstoću materijala koji su primjeni. Slijedeća komplikacija vezana uz implantate je razlabavljenje implantata kao posljedica nepravilne primjene ili kod endoproteza nakon dužeg vremena opterećivanja. Komplikacije vezane uz osteosintetske implantate su produženo koštano cijeljenje i pseudartroza. Gotovo najčešća komplikacija svih vrsta implantata akutne su i kronične infekcije[1]. Vrlo rijetko moguća je komplikacija u smislu alergijske reakcije na ugrađeni biomaterijal. Kompatibilnost pacijenta s uputama

liječnika operatera također može utjecati na ishod liječenja odnosno na razvoj komplikacije u slučaju ne slijeđenja uputa poslijeoperacijskog protokola.

Etiologija aseptičkog poremećenog koštanog cijeljenja je poremećaj vaskularne opskrbe i nestabilnost koštanih ulomaka. Svi prijelomi nose sa sobom problem prekida krvne cirkulacije, što je energija prijeloma veća, veća je destrukcija pa samim time i oštećenje krvnih žila. Operacijska tehnika može značajno utjecati na potencijalni razvoj ove vrste komplikacija. Sve više se javlja tendencija da uz određeni implantat bude predstavljena i kompletna operacijska tehnika kako bi se minimalizirao štetni utjecaj kirurškog pristupa na razvoj avaskularnih komplikacija. Dokazano je da postoji ishemija većih areala zglobova kao posljedica kirurškog pristupa čak i kod najuobičajenijih procedura kao npr. ugradnje TEP koljena [65].

4. INFEKCIJE OKO IMPLANTATA

4.1. Uvod i epidemiološki čimbenici

Infekcije povezane s implantatima za osteosintezu javljaju se s prevalencijom od 5-10% prema literaturi [3]. Postoje tri glavne karakteristike koje doprinose mogućnosti razvoja infekcije oko implantata za osteosintezu [66]. U zadnjih deset godina ovaj se koncept nije mijenjao, ali se spoznaja o važnosti svake stavke vrlo detaljno nadograđivala. Prva karakteristika odnosi se na specifičnost same ozljede te uzima u obzir: vrstu prijeloma (otvoreni / zatvoreni), brojnost udruženih ozljeda, stupanj mekotkivnih ozljeda, energiju koja je dovela do prijeloma, stupanj krvožilnih ozljeda, potencijalnu kontaminaciju s mjesta ozlijeđivanja i aspekt pacijenta (dob, diabetes, uzimanje steroida, pušenje, alkohol, droga, komunikacija s liječnikom). Slijedeća karakteristika odnosi se na kvalitetu operacijskog zahvata i mogućnosti zdravstvene ustanove u kojoj se pacijent liječi. U ovoj kategoriji značajno mjesto zauzimaju kirurg, kirurška tehnika, minimalna invazivnost, kvalitetan debridement nekrotične miškulature i onečišćenja rane, ispiranje, poslijeoperacijska zdravstvena njega i razina higijene u bolnici. Kao treća značajna karakteristika uzima se vrsta sredstva koje se koristi za osteosintezu. Biokompatibilnost je jedno od najvažnijih svojstva materijala koji se koriste, a podrazumijeva promociju ili inhibiciju adhezije tkiva i/ili bakterija na površinu. Svojstva površine implantata, dizajn implantata, broj mogućih „mrtvih prostora“, funkcija, trajni ili privremeni implantati, blizina susjednih tkiva kao tetiva npr. dodatno utječu na osjetljivost prema infekciji.

U slučaju endoprotetske kirurgije stopa infekcije se kreće od 0,5-4% prema literaturi [67]. Kod ove grupe pacijenata rizik od infekcije povezan je sa svime navedenim za osteosintetske implantate osim sa specifičnim karakteristikama ozljede. Zbog značaja ove stavke rizik od infekcije ipak je značajno manji kod operacija ugradnje endoprotetskih implantata u odnosu na osteosintetske.

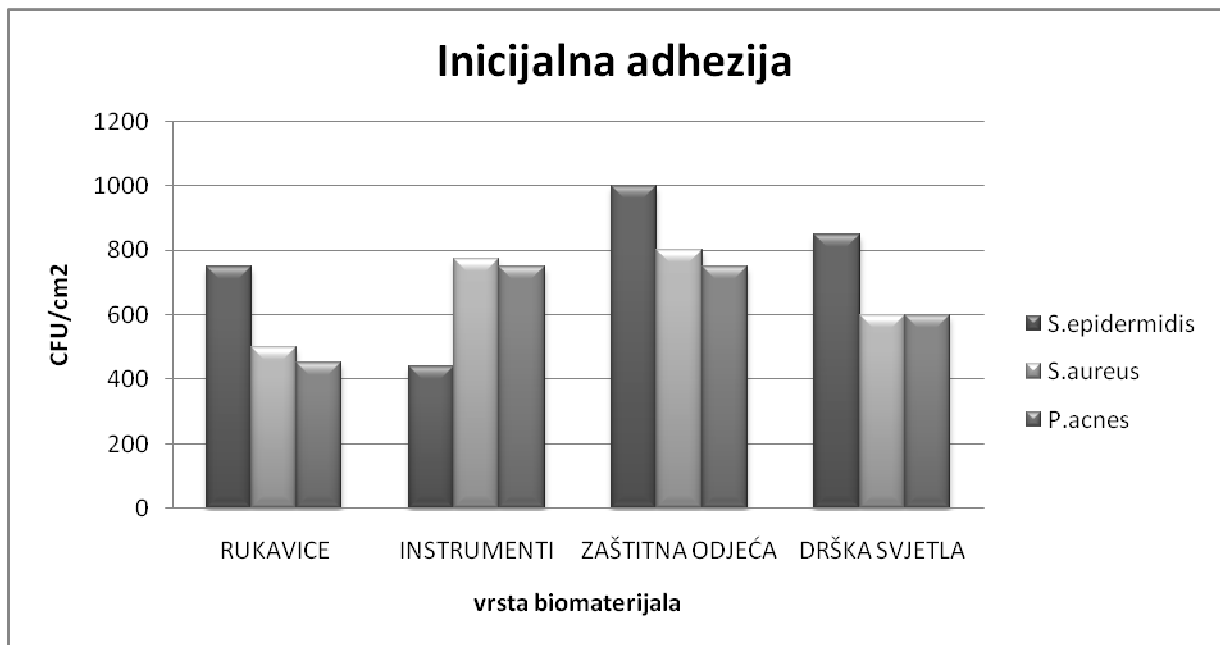
4.2. Najčešći uzročnici

Implantati stvaraju lokalno uvjete imunodeficijencije na način da ometaju funkciju ekstravaskularnih granulocita. Endogeni proteini ekstracelularnog matriksa kao npr. fibronektin, povećavaju adhezenciju patogena na metalne ili plastične površine implantata. Stafilocoki su najčešći patogeni koji se dovode u vezu s infekcijom implantata. Većina epidemioloških istraživanja stavlja stafilokoke na prvo mjesto među uzročnicima, jedina razlika se odnosi na udio *S.aureus* i *S.epidermidis* među ostalim uzročnicima. Adhezija bakterija na implantate i transfer između izloženih površina za vrijeme operacije je složen proces. Izvor infekcije najčešće su kontaminirani implantat, rukavice kirurga, poremećaj cijeljenja rane, hematogena diseminacija i najvažnije koža operiranog pacijenta. Stafilocoki se mogu naći na koži djeteta već nekoliko sati nakon rođenja. Kod odraslih ljudi stafilocoki naseljavaju kožne i mukozne površine gornjeg dijela dišnog sustava. 30% do 50% stanovnika nosi na sluznici nosa stafilokoke, a da ne pokazuju znakove bolesti [68]. Ovakvi kliconoše nazivaju se asimptomatskim te postaju opasni za pacijenta ako rade u blizini operacijske sale ili u dodiru s operacijskim instrumentima i implantatima. Stafilocoki se nalaze i na predmetima pa je tako najopasniji *S.aureus* ubikvitaran.

Studije bakterijske adhezije i transfera ne smiju biti ograničene na površine biomaterijala u ljudskom tijelu već se moraju odrediti prema površinama u operacijskoj sali gdje su pronađeni brojni uzročnici infekcije implantata. Studija Knobben i sur. fokusirala se na razmjenu bakterija između gumenih rukavica operacijskog tima, površina ortopedskih instrumenata, sterilne operacijske odjeće i drški operacijskih svjetla. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da na transfer uzročnika infekcije utječe soj bakterija, vlažnost inokuluma, primjena trenja između ispitivanih površina i konačno karakteristike samih površina [64]. Iz ovog istraživanja također je vidljivo da zaštitna odjeća kirurga privlači

najviše bakterija (Slika 8.). Početno prijanjanje *S.aureus* i *Propionibacterium acnes* na različite materijale je slično, međutim *S.epidermidis* značajno više prijanja na rukavice, zaštitnu odjeću i ručke svjetla.

Kako bi utvrdili relativnu važnost različitih faktora rizika u infekciji ortopedskih implantata sa *S.aureus* Kalmeijer i sur. su proveli kohortnu studiju pri čemu su došli do zaključka da je jedini značajni nezavisni faktor rizika svojstvo nositelja *S.aureus* u nosu operatera[69].



Slika 8, Grafikon prikazuje inicijalnu adheziju tri najčešće bakterije koje se javljaju u operacijskoj dvorani, na površinama koje su najviše u neposrednom ili posrednom kontaktu s implantatom[64]

Pored stafilokoka brojni drugi uzročnici posredstvom proteina koji omogućuju vezanje za biomaterijale odnosno adhezina izazivaju infekcije implantata. U skupini ostalih uzročnika na uzorku inficiranih endoproteza iz Mayo klinike nađeni su: *Propionibacterium*, enterokoki, *Corynebacterium*, streptokoki, *Bacteroides*, *Aspregillus*, *Penicillium*, *Actinomyces*, Gram-

pozitivni anaerobi, *Enterobacter cloacae*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas picketti*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Clostridium subterminale*, *Serratia marcescens*, Gram-pozitivni bacili, *Prevotella bivia*, *Alcaligenes xylooxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter*, *Veilolonella parvula*, *Neisseria meningitidis*, *Brucella*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium genavense* i *Haemophilus influenzae* [70].

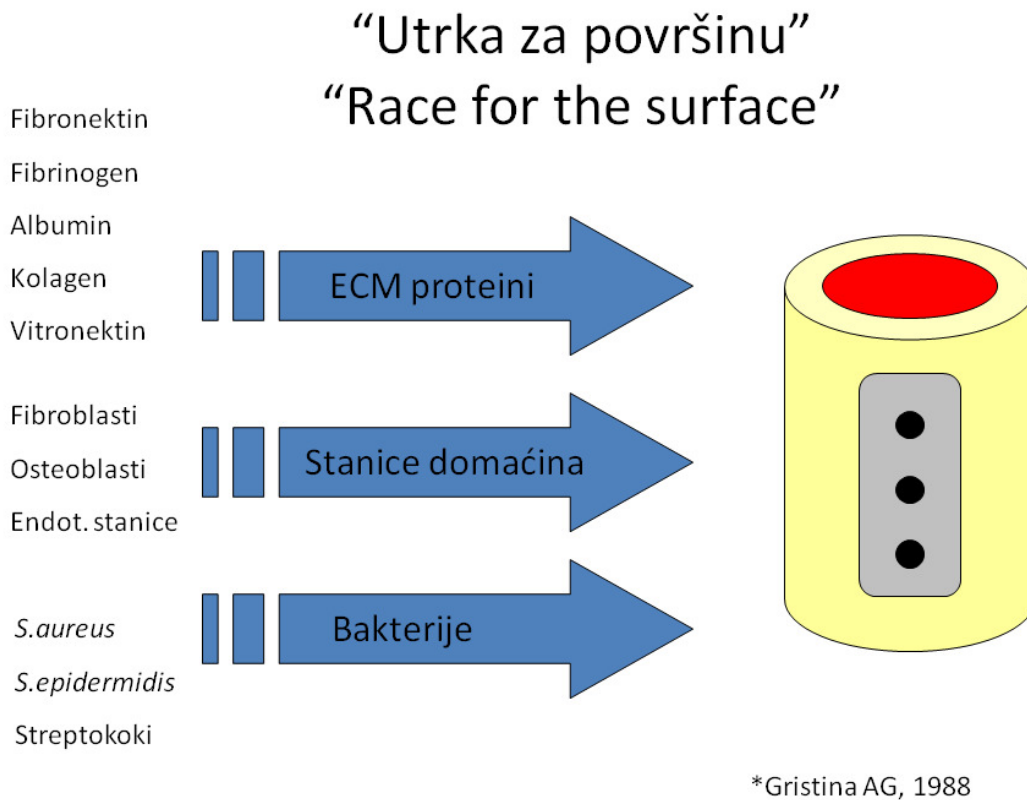
MIKROORGANIZAM	UČESTALOST (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	30
Koagulaza negativni stafilokoki	22
Gram-negativni bacili	10
Anaerobi	5
Enterokoki	3
Streptokoki	1
Miješana flora	27
Nepoznati	2

Tablica 1. Najčešći uzročnici infekcije ortopedskih implantata [71]

4.3. Patogeneza

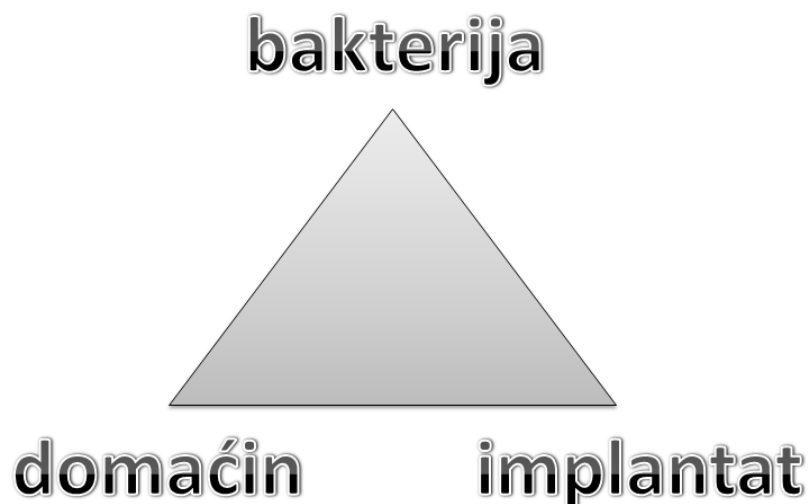
Infekcije povezane s ortopedskim implantatima tipično uzrokuju mikroorganizmi koji rastu unutar biofilma[10]. Ovi mikroorganizmi žive okupljeni u jako hidratiziranom ekstracelularnom matriksu koji je priljubljen uz površinu implantata. Manjak tvari potrebnih za normalan metabolizam i nakupljanje otpadnih produkata unutar biofilma tjera mikroorganizme da uđu u sporo rastuće ili stacionarno stanje. Ovako pritajeni, unutar biofilma, mikroorganizmi su do 1000 puta otporniji prema većini antimikrobijalnih djelovanja od istovrsnih mikroorganizama koji se nalaze slobodni, planktonski [72, 73].

Nakon ugradnje ortopedskog implantata nastaje utrka za površinu u kojoj sudjeluju proteini ekstracelularnog matriksa, stanice domaćina, ali i bakterije [4] (Slika 9.). Prijanjanje mikroorganizama za površine implantata uključuje specifične i nespecifične čimbenike. U nespecifične faktore važne za incijalnu adheziju ubrajaju se površinski napon, hidrofobna svojstva, elektrostatske i Van der Waals-ove sile[3]. Adhezini su grupa proteina koju na svojoj površini nose mikrororganizmi, a najvažniji su kao specifični faktori uključeni u proces brzog prijanjanja. Nakon početne faze slijedi faza akumulacije za vrijeme koje se bakterijske stanice međusobno povezuju u trodimenzionalnu strukturu i tvore biofilm. Prisustvo stranog tijela u organizmu značajno povećava osjetljivost prema infekciji. Ova je teza dokazana u brojnim istraživanjima pa je primjerice minimalna infektivna doza *S.aureus* za izazivanje abscesa kod zamoraca 100000 puta manja u prisutnosti potkožnog implantata nego u zamoraca bez implantata[74]. Mehanizmi fagocitoze induciraju lokalno stečeni defekt granulocita čime se povećava osjetljivost prema infekciji [75].



Slika 9. Shematski prikaz teorije koju su opisali Gristina i sur. 1988. g.

Infekcije povezane s implantatima za osteosintezu najčešće nastaju egzogeno zbog same penetrirajuće traume (preoperativno), za vrijeme umetanja osteosintetskog implantata (intraoperativno) ili za vrijeme cijeljenja rane (postoperativno) [76-78]. Kod infekcije endoprotetskih implantata moguć je intraoperativni i postoperativni nastanak infekcije. Hematogene infekcije su rjeđe i najčešće nastaju zbog bakterijemije uzrokovane infektom na koži, dentalno te respiratornog ili urinarnog sustava[79]. Najčešće su infekcije implantata uzrokovane jednim mikroorganizmom, a u 27% slučajeva više mikroorganizama uzrokuje infekciju [71].



Slika 10. Infekcija implantata kao rezultat trostrane interakcije [3]

Infekcije povezane s implantatima rezultat su interakcije između bakterija, implantata i čimbenika domaćina (Slika 10.). Bakterijski čimbenici su vjerojatno najvažniji u patogenezi infekcija implantata, dok su čimbenici samih implantata podložni promjenama kao posljedica težnje da se prevenira infekcija. Različite bakterije imaju različita specifična svojstva adhezije. Svojstva najčešćih uzročnika razmotrena su u poglavlju o stafilokoknoj infekciji.

Detaljna analiza bakterijske adhezije i modifikacije površine implantata dovodi do slijedećih zaključaka: (1) različite bakterije mogu različito adherirati na isti materijal za izradu implantata; (2) ista bakterija može različito adherirati na različite materijale; (3) ista bakterija može različito adherirati na isti materijal implantiran pod različitim okolnostima, uključujući medij u koji je uronjen materijal (hidrofobni ili hidrofilni), vrstu gibanja (dinamički ili stacionarno) i temperaturu; (4) in vitro inhibicija kolonizacije implantata ne jamči in vivo anti- infektivnu efikasnost; (5) klinička svrha i korist određene modifikacije površine implantata može varirati ovisno o primjeni samog implantata. Postoje i brojni čimbenici implantata koji utječu na bakterijsku adheziju kao porijeklo materijala, površina i oblik implantata [3].

Vrsta materijala za izradu implantata
Polivinil-klorid pospješuje bakterijsku adheziju više od teflona
Polietilen pospješuje bakterijsku adheziju više od poliuretana
Lateks pospješuje bakterijsku adheziju više od silikona
Silikon pospješuje bakterijsku adheziju više od politetrafluoretilena
Nehrđajući čelik pospješuje bakterijsku adheziju više od titanija
Porijeklo materijala za izradu implantata: sintetski materijali pospješuju bakterijsku adheziju više od biomaterijala
Površina implantata
Neppravilna površina pospješuje bakterijsku adheziju više od pravilne površine
Hrapava, reljefna površina pospješuje bakterijsku adheziju više od glatke površine
Hidrofobna površina pospješuje bakterijsku adheziju više od hidrofilne površine
Oblik implantata: cijevasti oblik pospješuje bakterijsku adheziju više od žičano-mrežastog oblika

Tablica 2. Karakteristike implantata koje utječu na infekciju [3]

Čimbenici domaćina mogu se podijeliti u dvije grupe: one koji utječu na adheziju bakterija na implantat i one koji potiču ili inhibiraju otpornost već adheriranih bakterija na površini implantata. U čimbenike domaćina koji utječu na adheziju ubrajaju se ligandi koji omogućavaju vezanje MSCRAMM-pozitivnih bakterija na različite implantate. Istraživanja su pokazala da se *S.aureus* jače veže za površine eksplantiranih implantata od nekorištenih implantata zbog postojećih liganda iz tkiva domaćina koji se nalaze na samoj površini korištenih implantata. Jednako tako bolje adheriranje bakterija se uspjelo pokazati s kateterima koji su presvučeni fibrinogenom i fibronektinom za razliku od nepresvučenih

katetera. Imunološki sustav domaćina može pospješiti preživljavanje bakterija na implantatu ako je smanjena aktivnost komplementa ili leukocita u tkivima oko implantata [74]. Najviše proučavani imunološki medijator koji može spriječiti preživljavanje bakterija na implantatu je IFN- γ . Ovaj medijator utječe na preživljavanje *S.epidermidis* unutar makrofaga i inhibira kolonizaciju kao što može aktivirati mononuklearne fagocite i regulirati humoralni imunološki odgovor [80].

4.4. Klasifikacija infekcije

Infekcije implantata nakon osteosinteze klasificiraju se prema vremenu pojavljivanja simptoma: 1) u one s ranim nastankom - unutar 2 tjedna, 2) odgođene infekcije – 2 do 10 tjedana od ugradnje te 3) kasne infekcije - više od 10 tjedana od ugradnje implantata [81-83]. Odgođene i kasne infekcije se svrstavaju u jednu zajedničku grupu zbog toga što su njihovo kliničko pojavljivanje, liječenje i prognoza slični.

Vodeći klinički znakovi rane infekcije su trajna lokalna bolnost, crvenilo, otok, poremećaj u cijeljenju rane, veliki hematomi i febrilitet. Izrazito virulentni mikroorganizmi (npr. *S.aureus*, Gram-negativni bacili) češće uzrokuju ranu infekciju. Kod lokalnih problema s cijeljenjem rana te nekrozom rubova rana i poslijeoperacijskih hematoma potrebno je liječenje aktivno usmjeriti prema rješavanju ovih komplikacija [84, 85].

Simptomi odgođene i kasne infekcije su trajna i rastuća bolnost, pseudartroza, razlabavljenje implantata i povremeno pojavljivanje secernirajućih fistula. Ponekad, klinički znakovi i simptomi mogu potpuno izostati. Odgođenu i kasnu infekciju najčešće uzrokuju mikroorganizmi manje virulentnosti (npr. koagulaza-negativni stafilokoki). Ponekad se odgođene infekcije mogu javiti zbog toga što inicijalno liječenje nije bilo dovoljno za potpunu eradikaciju mikroorganizma. Kasna infekcija može biti uzrokovana i manjim inokulumom ili

manje virulentnim mikroorganizmima koji su unešeni penetrirajućom traumom ili perioperativno s podmuklim pojavljivanjem lokalnih i sistemskih simptoma. Za razliku od infekcija osteosintetskih implantata, infekcije endoprotetskih implantata se često mogu javiti nakon diseminacije mikroorganizama hematogenim putem [86].

KLASIFIKACIJA	KARAKTERISTIKE
Prema putu širenja infekcije	
Perioperativna	Inokulacija mikroorganizama u kiruršku ranu za vrijeme operacije ili neposredno nakon
Per continuitatem	Kontaminacija rane zbog penetrirajuće traume (otvoreni prijelomi) ili iz susjednog žarišta infekcije (lezije kože i mekih tkiva)
Hematogena	Širenje mikroorganizama putem krvi ili limfe iz udaljenih žarišta infekcije (npr. koža, pluća, urinarni trakt)
Prema trenutku pojavljivanja simptoma	
Rana infekcija (<2 tjedna)	Najčešće nastaje za vrijeme traume ili operacije ugradnje implantata, uzrokovane jako virulentnim mikroorganizmima (npr. <i>S.aureus</i> , Gram negativni bacili)
Odgodena infekcija (2-10 tjedana) i kasna infekcija (>10 tjedana)	Najčešće nastaje za vrijeme traume ili operacije ugradnje implantata, uzrokovane slabo virulentnim mikroorganizmima (npr. koagulaza negativni stafilokoki); rjeđe nastaje hematogenim rasapom iz udaljenih žarišta

Tablica 3. Klasifikacija infekcije prema putu širenja i prema trenutku pojavljivanja simptoma [87]

RANA INFEKCIJA*	KASNA INFEKCIJA
<p>Najčešći uzročnici</p> <ul style="list-style-type: none"> • Koagulaza-negativni stafilocoki • <i>S.aureus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Adheriranje mikroorganizama na površine implantata za vrijeme operacije, često ostaju pritajeni na duže vrijeme: koagulaza-negativni stafilocoki
<p>Rjeđi uzročnici</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Propionibacterium</i> • <i>Corynebacterium</i> • <i>Enterococcus</i> i <i>Streptococcus</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Enterobacteriaceae</i> • Ostali anaerobi • <i>Candida</i> • <i>Mycobacterium</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Hematogeno širenje mikroorganizama iz udaljenih žarišta infekcije u tijelu, patogeni odgovaraju primarnom izvoru infekcije, najčešće su gram-negativni uzročnici
<p>* Pojam rane infekcije u literaturi nije precizno definiran, ali se prema nekim autorima uzima za ranu infekciju ona koja se razvije unutar 3 mjeseca od operacije</p>	

Tablica 4. etiologija infekcije ortopedskih implantata [88]

4.5. Dokazivanje infekcije

Ne postoji jedinstveni pojedinačni test kojim se može dovoljno precizno utvrditi dijagnoza infekcije implantata. Zbog toga su za dokazivanje infekcije najčešće nužne kombinacije kliničkih, laboratorijskih, mikrobioloških i oslikavajućih metoda pretraga.

Laboratorijski znakovi infekcije uključuju broj leukocita i diferencijalu krvnu sliku, međutim nedovoljno su specifični da predvide infekciju. Nakon operacije, C reaktivni protein (CRP) pokazuje povišene vrijednosti te se nakon nekoliko tjedana vraća na normalne vrijednosti. Zbog ove činjenice korisna su višestruka ponavljana mjerenja vrijednosti CRP-a, a ne pojedinačni testovi. Sekundarno povišenje CRP-a nakon što je već došlo do snižavanja vrijednosti upućuje na infekciju.

Preoperativna aspiracija tekućine s mjesta infekcije kao i intraoperacijsko uzimanje kulture tkiva osiguravaju najpreciznije uzorke za otkrivanje uzročnika. Potrebno je uzeti uzorke tkiva s najmanje tri intraoperativna područja za mikrobiološku i histopatološku analizu. Stupanj infiltracije s akutnim upalnim stanicama može značajno varirati između uzoraka istog pacijenta pa je potrebno uzorkovati najupadljivije promijenjena područja. Uzimanje brisa se treba što rjeđe primjenjivati zbog niske osjetljivosti. Potrebno je prekinuti antimikrobnu terapiju ako je moguće najmanje 14 dana prije uzimanja uzoraka [89]. Perioperativna antibiotska profilaksa ne smije se davati prije nego što se uzmu uzorci za kulturu [90]. Ako se implantirani materijal odstrani, može se poslati na daljnju analizu i kultivirati u bujonu. Kod ovog postupka postoji velika opasnost od kontaminacije. Upotreba sonikacije odnosno ultrazvuka za odvajanje mikroorganizama s površine implantata može značajno povećati osjetljivost kulture ispitivanja [91, 92]. Kvantitativne molekularne metode kao PCR (lančana reakcija polimeraze) mogu pospješiti postavljanje dijagnoze zbog svoje visoke osjetljivosti [93].

Oslikavajuće metode imaju skromnu ulogu kod ranih infekcija, dok su kod kasnih infekcija korisne za procjenjivanje opsega infekcije i zahvaćenosti kosti i spoja između kosti i implantata. Ispitivanje serijski u određenim vremenskim intervalima snimanjem klasičnih Rtg snimaka je korisno, ali nije specifično niti dovoljno osjetljivo. Razlabavljenje implantata može upućivati na nestabilnost ili infekciju, a kod ranog razlabavljenja infekcija je vjerojatniji

uzrok. Slično tome proširenje prijelomne pukotine može biti urokovano slabom vaskularizacijom koštanih ulomaka ili infekcijom. Ultrazvuk može otkriti akumulaciju tekućine oko implantata te može pomoći pri aspiraciji iste u dijagnostičke svrhe [87].

Slijedeća dijagnostička pretraga je scintigrafija. Troetapna scintigrafija tehnecijem ima malu vrijednost kod akutnih faza u liječenju prijeloma i ranog poslijeoperacijskog tijeka. Ova metoda otkriva koštano remodeliranje koje je normalno prisutno nakon prijeloma i oko implantata u najmanje prvoj godini poslije operacije. Nedostatak nakupljanja ^{99m}Tc upućuje na devaskularizaciju i mrtvu kost. Skeletalna scintigrafija ne može razlikovati aseptičko razlabavljenje od infekcije. Scintigrafija monoklonskim protutijelima obilježenim s ^{99m}Tc pokazuje veću preciznost u u detekciji infekcije. Tehnike nuklearne medicine su osjetljive, ali nisu dovoljno specifične pa je njihova primjena od ograničenog značaja.

Kompjutorizirana tomografija – CT daje dodatnu informaciju o opsegu koštane nekroze. Magnetska rezonanca – MR pokazuje poboljšanu rezoluciju u prikazivanju mekih tkiva i njihove patologije u odnosu na CT ili klasičnu Rtg pretragu. Glavni nedostatak CT-a i MR-a je stvaranje artefakata u blizini metalnih implantata. Tomografija emisije pozitrona PET i PET-CT pokazuju se kao vrlo vrijedne dijagnostičke metode za dokazivanje osteomijelitisa [94]. One se zasnivaju na detekciji radijacije koja nastaje zbog emisije pozitrona emitiranih iz radioaktivne tvari koja se daje pacijentu. Kombinirane slike PET-CT-a rezultiraju značajno manjim brojem lažnih dijagnoza.

4.6. Liječenje infekcije

Istraživački radovi „evidence-based“ medicine u području infekcija implantata vrlo su brojni. Primjenom meta-analiza, zadnjih se godina polako kristaliziraju smjernice za antibiotsku profilaksu i antibiotsku terapiju infekcija implantata u ortopedskoj i

traumatološkoj kirurgiji. Vrijednost antibiotske profilakse u odnosu na incidenciju infekcije implantata može se mjeriti težinom određene infekcije ovisno o lokalizaciji i tipu implantata. Kod ugradnje totalne endoproteze kuka profilaksa smanjuje kasni poslijeoperacijski morbiditet. Kod većine ostalih operacijskih zahvata profilaksa može smanjiti rani poslijeoperacijski morbiditet. Kirurška antibiotska profilaksa ima potencijal za skraćivanje dužine boravka u bolnici. Rizici primjene antibiotika u profilaktičke svrhe povezani su s iracionalnom upotrebom što dovodi do rezistencije, proljeva povezanih s antibioticima ili superinfekcije s *Clostridium*. Racionalizacija primjene antibiotika je od iznimne važnosti zbog čega postoji potreba za postavljanjem jasnih međunarodnih kriterija i smjernica. Uprkos postojanju brojnih studija, kliničkih istraživanja i preglednih radova na evropskoj razini ne postoji jedinstveni protokol za primjenu antibiotske profilakse. Dvije nacionalne sistematizirane preporuke za korištenje profilakse, njemačka[95] (tablica 5.) i škotska [96] (tablica 6.), vrlo precizno razrađuju primjenu antibiotika.

INDIKACIJA	POSTUPANJE
Trajni implantati (npr. endoproteze) Otvoreni prijelomi tip I i II zbrinuti unutarnjom fiksacijom Sekundarni operacijski zahvati (trajni implantati, nakon ugradnje endoproteze) Operacije sa širokim prikazom velikih zglobova Osteosinteza kod imunosuprimiranih pacijenata i ekstenzivnih ozljeda mekih tkiva	Jednokratna doza cefuroxim (1,5 g i.v.)
Otvoreni prijelomi tip III	Višekratna doza npr. aminopenicilin/inhibitor beta laktamaze* - Unutar 72h od ozlijeđivanja - Unutar 24h od zatvaranja mekih tkiva rane (npr. pokrivanje sl. režnjem)
*ampicilin/sulbaktam 3g svakih 8h ili amoksicilin/klavulonska kiselina 2,2 g svakih 8h	

Tablica 5. Preporuke za antibiotsku profilaksu u ortopedskoj i traumatološkoj kirurgiji u Njemačkoj [95]

INDIKACIJA	PREPORUKA
Ugradnja endoproteza	Nužno - antibiotska profilaksa
	Preporuča se upotreba koštanog cementa pomiješanog s antibiotikom
	Preporuča se 24 satna antibiotska profilaksa
Otvoreni prijelomi	Nužno
Zatvoreni prijelomi liječeni otvorenim kirurškim pristupom	Nužno
Osteosinteza kuka	Nužno
Ortopedska kirurgija bez ugradnje implantata	Ne preporuča se
Amputacija ekstremiteta	Preporuča se
Kirurgija mekih tkiva šake	Preporuča se
<p>Antibiotici za profilaksu trebali bi se i.v. aplicirati ≤ 30 min prije incizije.</p> <p>Nužno – profilaksa nedvojbeno smanjuje morbiditet od infekcija, smanjuje troškove bolničkog liječenja i vjerojatno smanjuje sveukupnu potrošnju antibiotika.</p> <p>Preporuča se – profilaksa smanjuje morbiditet u periodu neposredno nakon operacije, vrlo vjerojatno smanjuje općenito morbiditet od infekcija nakon operacije, smanjuje troškove bolničkog liječenja i vjerojatno smanjuje sveukupnu potrošnju antibiotika.</p> <p>Ne preporuča se – profilaksa se nije pokazala klinički efektivnom, posljedica morbiditeta od infekcije je kratkotrajno oboljevanje, povećavaju se troškovi bolničkog liječenja za malu kliničku opravdanost .</p> <p>Izbor antibiotika treba uvažiti mogućnost lokalne rezistencije.</p> <p>Kod većeg intraoperacijskog gubitka krvi (≥ 1500ml) dodatna doza antibiotika treba se dati nakon nadoknade tekućine.</p> <p>Svi slučajevi u kojima antibiotska profilaksa nije aplicirana moraju se precizno opisati i pohraniti.</p>	

Tablica 6. Smjernice škotskog konsenzusa SIGN za antibiotsku profilaksu u kirurgiji , u tablici je prikazan dio koji se odnosi na ortopediju i traumatologiju [96]

U traumatologiji se primjena antibiotske profilakse razlikuje u odnosu na osnovnu podjelu tipa prijeloma prema ozlijeđenosti mekih tkiva na zatvorene i otvorene prijelome. Kod zatvorenih prijeloma liječenih operacijski, jednokratna doza antibiotika značajno smanjuje duboku infekciju kao i površnu infekciju rane, urinarnog i respiratornog trakta. Višekratna doza antibiotika u ovoj grupi pacijenata ima jednaki učinak na sprječavanje duboke infekcije, bez značajnog učinka na urinarni i respiratorni trakt [97]. Razvoj infekcije kod otvorenih prijeloma ovisi o brojnim čimbenicima. Analizom 948 otvorenih prijeloma liječenih prema suvremenim načelima Suedkamp i sur. [98] zaključili su da osteitis predstavlja najvažniju komplikaciju ovih ozljeda. Prognostički čimbenici koji utječu na razvoj osteitisa su količina izgubljenog koštanog tkiva, tip prijeloma, vrsta mikroorganizama koji uzrokuju kontaminaciju, duboki defekti mekih tkiva, kompartment sindrom, krvožilne ozljede i infekcije mekih tkiva. Temeljem retrospektivnih studija profilaksa je smanjila incidenciju infekcija implantata. Većina radova ne dovodi u pitanje protektivnu ulogu antibiotske profilakse kod otvorenih prijeloma nego pristupa s različitim argumentima dužini davanja. Preoperativno davanje antibiotika čim prije po ozlijeđivanju pokazalo se značajno utjecajnim iz rezultata randomiziranih kliničkih studija [99]. Pacijenti s tipom III otvorenih prijeloma (Tablica 7.) trebali bi dodatno biti pokriveni antibioticima za Gram-negativne bakterije, kao što bi posebno trebalo pokriti visokim dozama penicilina ozljede kontaminirane fecesom i/ili klostridijama. Kod otvorenih prijeloma tip I i II (Tablica 8.) preporuča se prekidanje profilakse nakon 24 sata od zatvaranja rane. Pregledni rad Gosselina i sur. [100] potvrđuje prethodno navedene zaključke u smislu protektivne uloge antibiotika u suzbijanju rane infekcije.

TIP	OPIS
I	Čista rana, laceracija \leq 1cm, minimalna ozljeda mekih tkiva
II	Čista rana, laceracija \geq 1cm
III	Opsežna ozljeda mekih tkiva uz nagnječenje
IIIa	Frakturirana kost adekvatno je pokrivena mekim tkivom unatoč velikoj laceraciji ili reznju kože, traumi visoke energije ili veličini same rane
IIIb	Opsežna mekotkivna ozljeda sa skidanjem periosta, izlaganjem kosti i značajnom kontaminacijom rane. Potreban je transfer mišića za pokrivanje rane.
IIIc	Otvorena ozljeda s lezijom arterije koja zahtijeva rekonstrukciju

Tablica 7. Klasifikacija otvorenih prijeloma prema Gustilo Anderson

OSNOVNA PRAVILA I KONCEPTI LIJEČENJA INFEKCIJA IMPLANTATA
<ul style="list-style-type: none"> • Antibiotiska terapija mora biti kombinirana s kirurškim čišćenjem ili odstranjivanjem implantata (osim u posebnim slučajevima)
<ul style="list-style-type: none"> • Implantati se mogu ostaviti in situ u slučaju da nisu razlabavljeni i ako je infekcija rano započela
<ul style="list-style-type: none"> • Ako se temeljem in vitro testiranja pokaže opravdanim, antibiotska terapija treba uključivati rifampicin, nikad kao monoterapiju već u kombinaciji s drugim antibioticima
<ul style="list-style-type: none"> • Fluorokinoloni su se pokazali kao dobra terapija u kombinaciji s rifampicinom
<ul style="list-style-type: none"> • Incijalna terapija trebala bi sadržavati antibiotike za inhibiciju sinteze stanične stijenke (npr. parenteralno β-laktamski antibiotici ili visoke doze vankomicina) kroz najmanje 14 dana
<ul style="list-style-type: none"> • Ukupno trajanje terapije kod primarnog zadržavanja implantata ili zamjene u jednom aktu minimalno je 3 mjeseca; u slučaju zamjene implantata kroz dva akta, antibiotska terapija prije ponovne ugradnje implantata mora trajati najmanje 4 tjedna; kulture tkivnog bioptata nužne su za primjenu ciljane antibiotske terapije

Tablica 8. Osnovna pravila i koncepti za optimizirano liječenje infekcija implantata [88]

4.7. **Ekperimentalni modeli**

Odabir eksperimentalnog modela za određeno znanstveno istraživanje predstavlja iznimno važan korak zbog toga što svaki model sa sobom nosi određena ograničenja koja treba vrlo dobro poznavati kako bi se rezultati mogli ispravno interpretirati. Infekcija ortopedskih implantata kako je već opisano predstavlja značajan problem u kliničkoj praksi pa je samim time ovo područje važno i za istraživanja. Eksperimentalne modele dijelimo na in vitro i in vivo modele.

In vitro modeli infekcije mogu biti vrlo raznovrsni i uglavnom su usmjereni na proučavanje jednog vrlo specifičnog dijela cijelog procesa patogeneze infekcije ili terapijskog djelovanja određenih tvari. Animalni modeli koriste se za istraživanje patogeneze bakterija, ponašanja biofilma, utjecaja biomaterijala na osjetljivost prema infekciji, utjecaja biomaterijala na stopu infekcije i utjecaja infekcije na površine biomaterijala. Većina modela pogodni su za istraživanje minimalne infektivne doze, za morfološke studije mikrobnog uzročnika ili za analizu lokalnog uništavanja bakterija uz prisutnost antibiotika ili bez antibiotika. Glavni nedostaci većine modela su visoki troškovi eksperimentalnih životinja i nužnost primjene sofisticirane kirurške tehnike. Slijedeći problemi sastoje se od nemogućnosti ispitivanja imunološkog odgovora domaćina i nemogućnosti kontinuiranog praćenja parametara kroz tijek infekcije [101].

Da bi određeni animalni model infekcije bio klinički relevantan za proučavanje patogeneze, prevencije i liječenja infekcija, mora preslikati najvažnije osobine humane bolesti. Ovo načelo podrazumijeva laganu mogućnost kolonizacije i infekcije implantata te nemogućnost spontanog izliječenja[101]. Model koji najbolje reproducira kliničke karakteristike humane infekcije implantata je model „tissue cage“ infekcije (infekcija rešetkastih valjaka [101]. Ovaj model moguće je primjeniti na različitim životinjama kao što su zamorci, miševi, štakori, psi i telad za proučavanje patogeneze, antimikrobne profilakse te

kratkoročne i dugoročne terapije. Biološke karakteristike ovog modela mogu se vrlo lako pratiti za vrijeme trajanja eksperimenta jer se tekućina koja se nalazi u implantatu jednostavno aspirira. Moguće je pratiti kako utječe prisutnost stranog tijela na patogenost piogenih mikroorganizama [74, 102]. Omogućava praćenje mehanizama i uloge bakterijske adherencije in vivo te ispitivanje različitih biomaterijala. Analiza hematogene diseminacije i infekcije implantata, također je moguća u ovom modelu kao i proučavanje učinkovitosti antimikrobijalne profilakse i liječenja.

5. STAFILOKOKNA INFEKCIJA

5.1. Uvod

Infekcije oko implantata često su uzrokovane bakterijama koje rastu unutar biofilma [10]. Najčešći uzročnici infekcija ortopedskih implantata su *S.aureus* i *S.epidermidis* [103, 104]. *S.aureus* je uzročnik infekcija povezanih s metalnim biomaterijalima, kostima i zglobovima te mekim tkivima [103, 105]. *S.epidermidis* je češće povezan s infekcijama polimernih implantata [104].

Stafilokoki su Gram-pozitivni, nepokretni, fakultativni anaerobi koji ne stvaraju spore te rastu aerobnom respiracijom ili fermentacijom. Veličina stafilokoka je u prosjeku 0.5 – 1.5 µm. Karakterizira ih pojavljivanje individualnih koka koji se dijele u više od jedne ravnine tvoreći grozdaste nakupine. Stafilokoki se mogu naći kao dio normalne flore na ljudskoj koži i sluznicama. Stanična stijenka stafilokoka sastavljena je od peptidoglikana i teikoične kiseline te se na njoj nalaze adhezini i egzotoksini. Brojni sojevi stafilokoka proizvode biofilm. Patogeniji stafilokoki su karakterizirani mogućnošću proizvodnje koagulaze i zgrušavanja krvi [106]. Ova karakteristika dijeli stafilokoke u: 1) koagulaza-pozitivne kao što su *S.aureus*, *S.intermedius* i *S.hyicus* te 2) koagulaza-negativne kao što su *S.epidermidis*, *S.lugdunensis*, *S.haemolyticus* i *S.saprophyticus*. *S.aureus* i koagulaza negativni stafilokoki se razlikuju i po boji i obliku kolonija: *S.aureus* imaju zlatno-žutu boju kada rastu na solidnim medijima dok koagulaza-negativni stafilokoki proizvode blijedo-sivo-bijele kolonije [107].

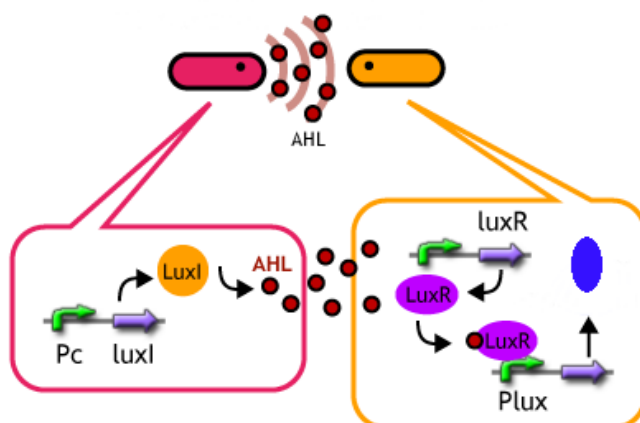
S.aureus se smatra glavnim patogenom koji kolonizira i inficira hospitalizirane pacijente smanjenog imuniteta kao i zdrave imunokompetentne ljude. Iako se *S.aureus* nalazi i kao dio flore na koži te u nazofarinksu, okruženje u bolnici posebno podržava dobivanje rezistentnih sojeva *S.aureus*. Koža i sluznica su odlične lokalne barijere protiv invazije *S.aureus*, međutim njihovim oštećivanjem uslijed traume ili kirurškog postupka *S.aureus* može prodrijeti u dublje slojeve tkiva tvoreći karakteristične apscese [108]. Ako *S.aureus*

usprije prodrijeti do limfnih žila i krvi može izazvati septikemiju. Više od 4% pacijenata primljenih u neku od 96 bolnica u Engleskoj između 1997. i 1999. dobili su nozokomijalnu infekciju koja se definira kao infekcija za koju nije bilo dokaza prisustva ili inkubacije prije same hospitalizacije [109]. Ista studija pokazala je da je 81% infekcija uzrokovano sa *S.aureus* od čega 61% čini meticilin rezistentni *S.aureus* (MRSA). MRSA su rezistentni na β -laktamske antibiotike uključujući i treću generaciju cefalosporina, streptomycin, tetraciklin i sulfonamide [107]. Nakon izlaganja vankomicinu i ostalim glikopeptidnim antibioticima neki MRSA sojevi mogu postati otporni i na njih [110]. U većini slučajeva otpornost prema antibioticima je kodirana genima koji se nalaze na plazmidima što doprinosi brzo rasprostiranju rezistentnih bakterija [111].

S.epidermidis je najčešće izolirani koagulaza-negativni stafilocok povezan s inficiranim ortopedskim implantatima. Prije su se koagulaza-negativni stafilocoki svrstavali u saprofite, međutim dokazano je da su neki sojevi oportunistički patogeni kod ljudi [112]. Koagulaza-negativni stafilocoki, posebno *S.epidermidis* povezani su s nozokomijalnom i hospitalnom infekcijom te su otporniji prema antibioticima od *S.aureus* [113, 114]. *S.epidermidis* proizvodi ekstracelularne toksine i proteaze, ali je značajno manje citotoksičan od *S.aureus* [115]. Karakteristika *S.epidermidis* koja objašnjava učinkovitost u vezanju za površinu kože je mogućnost stvaranja lantibiotika [115]. Lantibiotike proizvode brojne Gram-pozitivne bakterije i djeluju baktericidno. Sastoje se od policikličkih peptida koji se razlikuju po prisutnosti tioeteričnih aminokiselina lantionina i metil-lantionina te djeluju protiv drugih Gram-pozitivnih bakterija, ali ne i Gram-negativnih [116]. Proizvodnja lantibiotika može utjecati na kompeticiju između *S.epidermidis* i drugih bakterija osjetljivih na lantibiotike prilikom zauzimanja površina na koži i sluznici [115]. *S.epidermidis* proizvodi i PGA (poli- γ -DL-glutamska kiselina) koja pospješuje rast i preživljavanje na čovjeku [117]. PGA štiti *S.epidermidis* od visokih koncentracija soli na ljudskoj koži.

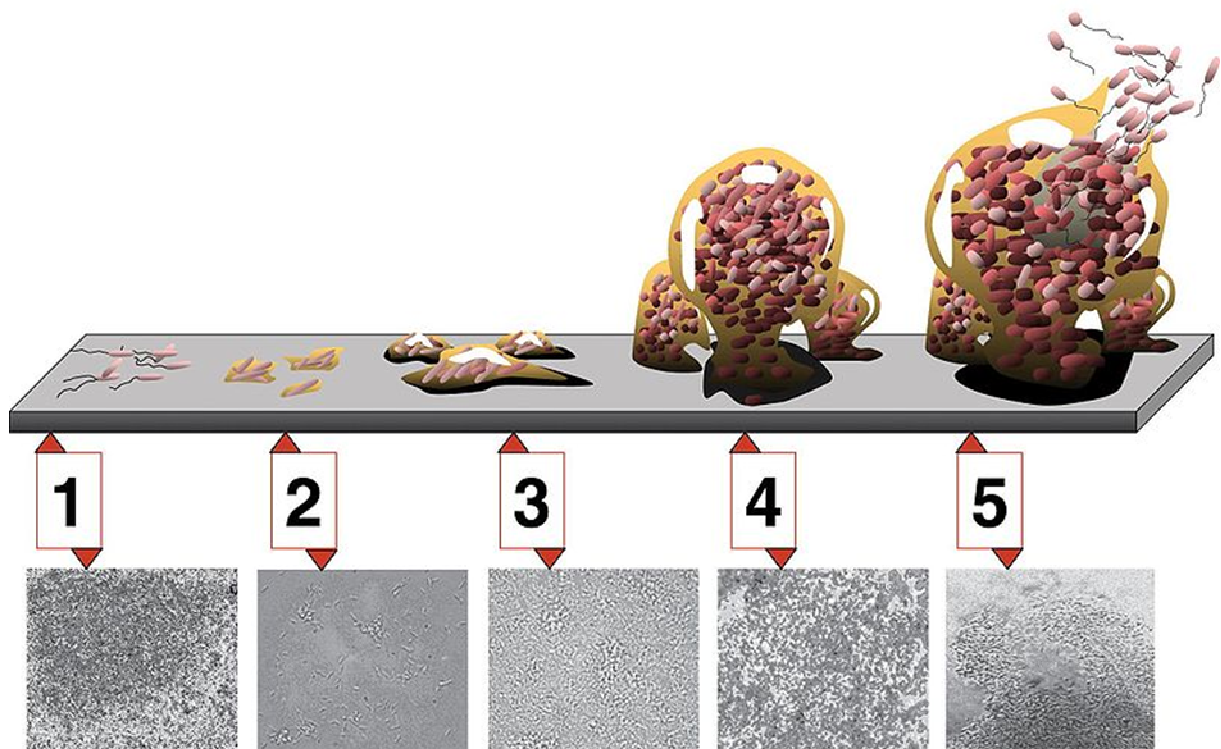
5.2. Biofilm

Biofilm je strukturirana zajednica mikroorganizama, adherirana na živu ili inertnu površinu unutar polimernog matriksa kojeg su mikroorganizmi sami stvorili. Biofilm razlikujemo prema načinu vezanja za različite površine, strukturi, genetici, kompleksnim interakcijama između mikroorganizama i vrsti ekstracelularnog matriksa. Pojedinačni jednostanični mikroorganizmi pokazuju dva različita oblika života. Prvi oblik je slobodni plutajući ili planktonski u kojem pojedinačne stanice plutaju ili plivaju samostalno u tekućem mediju. Drugi oblik pojavljivanja je stanje u kojem su mikroorganizmi adherirani za površinu, tijesno povezani međusobno tvoreći solidnu tvorbu. Promjena između ova dva oblika pojavljivanja ovisi o brojnim čimbenicima koji se razlikuju među različitim bakterijama. Jedan od opisanih mehanizama komunikacije između bakterija naziva se „quorum sensing“ engl. „osjećaj grupe,, . To je akcija signalizacije bakterija na razini između pojedinih stanica. Bakterije detektiraju prisutnost i gustoću stanica iste vrste te upravljaju ponašanjem svoje grupe. Postoje razne signalne molekule, npr. Gram negativne bakterije koriste autoinduktore kao AHL (acil-homoserin-lakton), uz pomoć kojih se ostvaruje komunikacija među bakterijama [118] (Slika 11.).



Slika 11. „quorum sensing“ komunikacija među bakterijama

Stvaranje biofilma počinje prijanjanjem planktonskih mikroorganizama za površinu. Prve bakterije se vežu za površinu van der Waals-ovim silama koje su reverzibilne i slabe. Ako bakterije ne budu otklonjene s površine mogu se učvrstiti trajnije za samu površinu upotrebom struktura koje se nazivaju pili. Prve bakterije pospješuju dolazak novih bakterija pružajući više različitih površina za adheziju te stvaranjem matriksa koji drži biofilm na okupu. Neke vrste bakterija nisu sposobne prilijepiti se za površinu samostalno pa koriste matriks ili samu površinu drugih bakterija. Za vrijeme ove faze kolonizacije bakterije komuniciraju putem „quorum sensing“ oblika signalizacije. Kada jednom krene proces kolonizacije biofilm raste brojnim dijeljenjem stanica. Završna faza stvaranja biofilma naziva se razvoj (od engl. „development“) u kojoj postojeći biofilm može mijenjati oblik i veličinu što omogućava bakterijama da budu otpornije na antibiotike.



Slika 12. Stvaranje biofilma na primjeru *P.aeruginosa* u 5 faza: 1. Početno prijanjanje na površinu; 2. Ireverzibilno prijanjanje; 3. Sazrijevanje I; 4. Sazrijevanje II; 5. Diseminacija; svaki crtež popraćen je mikrofotografijom biofilma

Biofilmovi se najčešće nalaze na čvrstim površinama koje su uronjene ili izložene tekućim otopinama. Kada se zadovolje uvjeti biofilm može vrlo brzo postati makroskopski vidljiv. Bakterije iz biofilma upotrebljavaju različite strategije za obranu od dezinficijensa, antibiotika, fagocita i imunološkog sustava. Bakterije koje su organizirane u biofilm proizvode bioaktivne tvari koje pojedinačno nisu u stanju proizvesti [118].

Strukturu biofilma na okupu drži ekstracelularni matriks kojeg izlučuju bakterije, a sastoji se od polimernih komponenti koje se nazivaju EPS (skraćeno od egzopolisaharid ili engl. „extracellular polymeric substance“). Ekstracelularni matriks štiti stanice i pospješuje komunikaciju posredstvom biokemijskih signala. Unutar nekih biofilmova pronađeni su kanali za protok molekula vode koji ujedno omogućavaju protok hranjivih tvari i signalnih molekula.

Bakterije koje žive unutar biofilmova po brojnim se svojstvima značajno razlikuju od planktonskih bakterija iste vrste zbog toga što ih gusta struktura biofilma štiti od okoline i omogućava raznovrsnu interakciju. Vanjski slojevi biofilma omogućavaju značajno veću otpornost prema deterdžentima i antibioticima unutarnjih slojeva zajednice bakterija. U nekim slučajevima otpornost prema antibioticima može se povećati i do 1000 puta [73].

Procjenjuje se da 80% svih mikrobijalnih infekcija u organizmu čine one u koje je uključeno stvaranje biofilma [118]. Najčešće infekcije povezane sa stvaranjem biofilma su: infekcije urinarnog trakta, infekcije katetera, infekcije srednjeg uha, stvaranje zubnog plaka, gingivitis, endokarditis, infekcije kod cistične fibroze i infekcije kod trajnih implantata kao što su endoproteze, osteosintetski implantati i umjetni srčani zalisci.

Biofilm stafilokoka sastoji se od polisaharidnog intercelularnog adhezina (PIA), čija je sinteza kodirana *ica* genima [9]. PIA je vrlo važan za stvaranje biofilma kod *S.epidermidis* te uzrokuje hemaglutinaciju i agregaciju bakterija [119, 120]. Doprinos PIA je značajan u obrani *S.epidermidis* od fagocitoze i ostalih dijelova imunološkog sustava [121]. Pokazano je da su

na životinjskom modelu stranog tijela s rešetkastim valjkom izrađenim od teflona biofilm negativni stafilocoki manje virulentni od izogeničnih biofilm pozitivnih sojeva [122-124]. Na ovom modelu inokulumi od 10^3 i 10^4 cfu *S.aureusa* te 10^5 *S.epidermidisa* bili su dostatni za razvoj trajne infekcije [125, 126]. Stvaranje biofilma kod *S.epidermidis* je izraženije u odnosu na *S.aureus* [127].

5.3. Stafilocoki i površine implantata

Različite bakterije koriste svoje specifične adhezine odnosno proteine koji im pomažu u vezanju za površinu implantata. Nakon implantacije biomaterijala dolazi do utrke za površinu koja uključuje proteine ekstracelularnog matriksa, stanice domaćina (fibroblaste, osteoblaste, endotelijalne stanice) i bakterije[5]. Nakon ugradnje implantati bivaju presvučeni slojem proteina ekstracelularnog matriksa[128]. Ekstracelularni matriks (ECM) je biološki aktivni sloj sastavljen od složene mješavine makromolekula kao što su fibronektin, fibrinogen, albumin, vitronektin i kolagen. Adhezija, migracija, proliferacija i diferencijacija stanica domaćina ovise o sastavu i strukturalnoj organizaciji ekstracelularnog matriksa [129]. Interakcija između stanica domaćina i ekstracelularnog matriksa je posredovana specifičnim receptorima integrinima koji vežu ECM proteine za stanični citoskelet [129]. ECM ne služi samo za vezanje stanica domaćina već omogućava i bakterijama da koloniziraju površinu. U slučaju da fibroblasti i ostale stanice domaćina stignu na površinu biomaterijala prvi te uspostave čvrste kemijske veze, bakterije se moraju suprostaviti živoj staničnoj površini. Razne bakterije kao npr. *S.aureus* imaju različite površinske adhezine koji pospješuju vezanje za proteine plazme i ECM-a [130, 131].

Prijanjanje *S.epidermidis* za površinu implantata je proces koji se odvija postupno. Početno se bakterije lijepe za površinu implantata posredstvom nespecifičnih faktora kao što su površinska napetost, hidrofobnost i elektrostatske sile te specifičnih adhezina poput

autolizina proteina (kodiranog *atlE* genom) i kapsularnog polisaharidnog intercelularnog adhezina PIA (kodiranog *ica* operonom) [123]. Ova početna faza prijanjanja *S.epidermidis* za površinu implantata je praćena fazom akumulacije u kojoj bakterije prijanjaju jedna na drugu i stvaraju biofilm u čemu posreduje polisaharidni intercelularni adhezini PIA [132]. Do danas je izolirano malo adhezina od *S.epidermidis* koji prepoznaju ECM, među njima su adhezini za fibronektin, fibrinogen, vitronektin i kolagen [133]. Teikoična kiselina koja se nalazi u staničnoj stijenci *S.epidermidis* uključena je u inicijalnu adheziju za površine presvučene fibronektinom što upućuje na važnost teikoične kiseline u početnim koracima patogeneze [134].

Za razliku od *S.epidermidis* koji koristi dobro poznate adhezine na svojoj površini za prijanjanje bakterije na bakterije i bakterije na implantate, *S.aureus* jako ovisi o prisustvu liganda u domaćina kao što su fibronektin, fibrinogen i kolagen. *S.aureus* se veže za ove ligande tkiva domaćina posredstvom genetski definiranih proteina mikrobne površine koji se u literaturi nazivaju MSCRAMM (skraćeno od engl. „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“) [135, 136]. Najvažniji MSCRAMM-ovi su FnbpA i FnbpB koji se vežu za fibronektin, faktor zgrušavanja koji se veže za fibrinogen i konačno adhezini za kolagen koji se veže za kolagen [135, 136]. Uloga MSCRAMM-ova u patogenezi infekcija povezanih s implantatima nije u potpunosti jasna i posebno je kod ortopedskih implantata kontroverzna. Mutirani soj *S.aureus* kojem nedostaje protein za vezanje fibronektina pokazao se manje virulentnim od divljeg soja na modelu zeca s hematogeno stečenim septičkim artritismom [136]. Nasuprot tome mutirani soj *S.aureus* kojem nedostaju proteini za vezanje fibonektina, fibrinogena i kolagena pokazao se jednako virulentnim kao i divlji soj koji ima sve MSCRAMM-ove na modelu zeca s lokalno stečenim septičkim artritismom i osteomijelitisom [135]. Moguće je da varijacije u doprinosu MSCRAMM-ova virulentnosti u studijama koje su koristile izogenične *S.aureus* sojeve ovise o modelu koji je

primjenjen. Vjerojatno je teže dokazati razliku u virulentnosti između MSCRAMM-pozitivnih i MSCRAMM-negativnih *S.aureus* sojeva kada se veliki inokulumi bakterija dovode direktno na površinu implantata u životinjskom modelu lokalno stečene infekcije [135].

6. HIPOTEZA

Temeljna hipoteza ovog rada jest da mogućnost stvaranja biofilma utječe značajnije na razvoj stafilokokne infekcije od vrste ugrađenih materijala i vremena u kojem je apliciran inokulum.

7. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Svrha ovog istraživanja je testiranje postavljene hipoteze. Kroz testiranje hipoteze odrediti ćemo koji biomaterijal izaziva slabiju upalnu reakciju i koji se može teže kolonizirati najčešćim uzročnicima infekcije. Istovremeno ćemo ispitati ponašanje *S.aureus* i *S.epidermidis* u prisutnosti tri različita biomaterijala u ovisnosti o mogućnosti stvaranja biofilma i o vremenu inokulacije.

Ciljevi ovog istraživanja su :

1. Ispitati životinjski model na mišu za usporedbu tri vrste metala za izradu implantata prema uzoru na «Tissue cage model»
2. Ispitivanje krivulja rasta biofilm pozitivnih i biofilm negativnih *S.aureus* te biofilm pozitivnih i biofilm negativnih *S.epidermidis* u in vitro uvjetima
3. Uspoređivanje in vitro adherencije stafilokoka na tri različita materijala za proizvodnju implantata: a) koncentracijom klica nakon ultrazvučnog skidanja, b) brojanjem i analizom strukture biofilma bakterija u vidnom polju raster elektronskog mikroskopa (SEM)
4. Uspoređivanje koncentracija stafilokoka potrebnih za razvoj trajne infekcije oko tri različite vrste implantata in vivo na modelu miša

5. Uspoređivanje utjecaja hrapavosti i vrste materijala na osjetljivost implantata prema infekciji in vitro i in vivo na modelu miša
6. Uspoređivanje koncentracije stafilokoka izraženih u danima nakon infekcije (1,2,5,8,14) oko tri vrste implantata in vivo na modelu miša
7. Uspoređivanje upalne reakcije leukocita domaćina na titanij i nehrđajući čelik in vivo

8. MATERIJALI I METODE

8.1. Oblikovanje istraživanja

Provedeno istraživanje dio je projekta „Titanium and steel in a mouse tissue cage model“ koji se provodi u Znanstveno istraživačkom centru Sveučilišne kliničke bolnice u Baselu, Švicarska. Radi se o in vitro ispitivanju adhezije bakterija na tri različita biomaterijala te o in vivo ispitivanju istih biomaterijala na mišu primjenom modela „tissue cage“ infekcije.

8.2. Mjesto istraživanja

Cjelokupno istraživanje in vitro i in vivo provedeno je u Laboratoriju za infektivne bolesti Znanstveno istraživačkog centra Sveučilišne kliničke bolnice u Baselu, Švicarska. Ispitivanje raster elektronskim mikroskopom provedeno je u Biocentru, Sveučilišta u Baselu.

8.3. Etički aspekt istraživanja

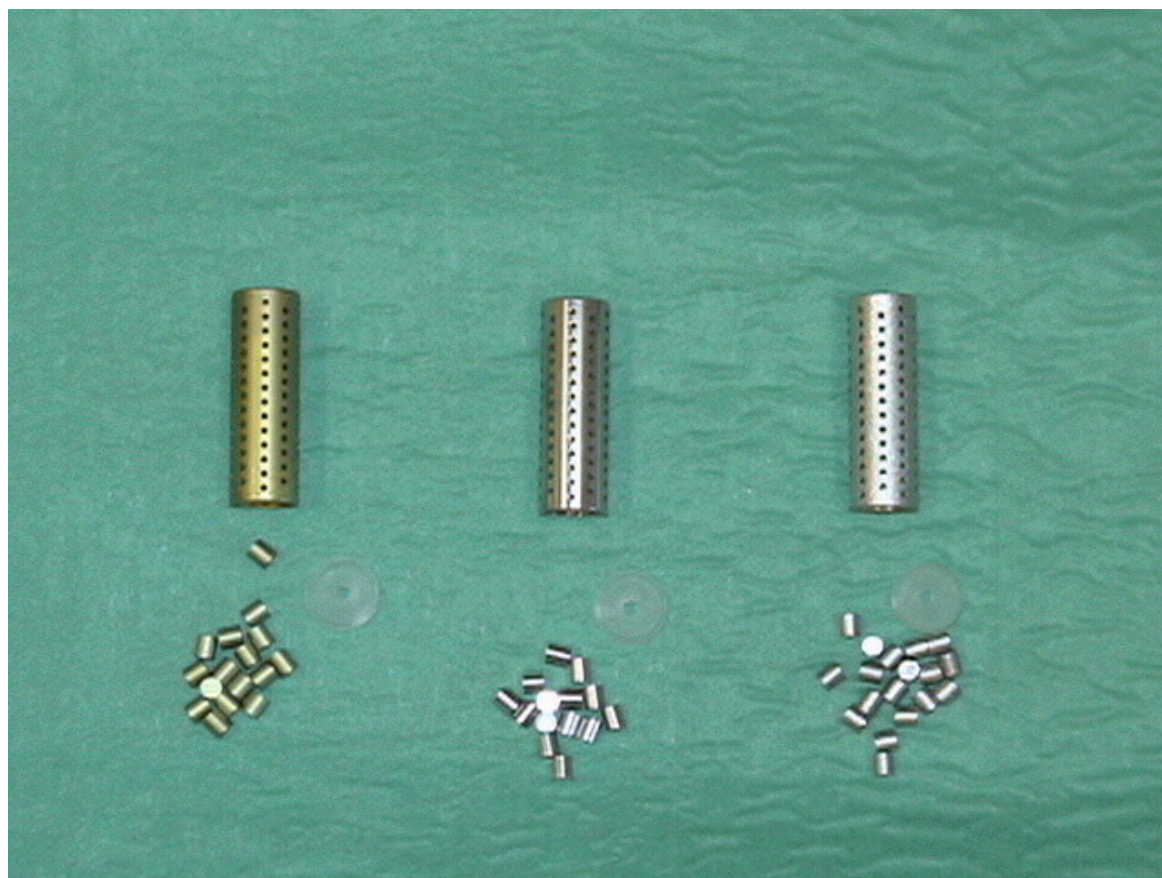
Ovo je istraživanje odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u skladu sa švicarskom veterinarskim zakonom te uz odobrenje Etičke komisije Sveučilišne kliničke bolnice u Baselu.

8.4. Postupci

8.4.1. Priprema materijala za implantaciju

Materijali koji se koriste za izradu rešetkastih valjaka su komercijalni čisti titanij (cpTi ISO 5832-2), elektropolirani i pjeskareni nehrđajući čelik (SS; 1.4441, ISO 5832-1). Glatka čelična površina rešetke dobiva se vibracijskom obradom površine i elektropoliranjem, dok se hrapava površina dobiva pjeskarenjem bijelim korundom (Al_2O_3 , velične granula 0.84-1.2

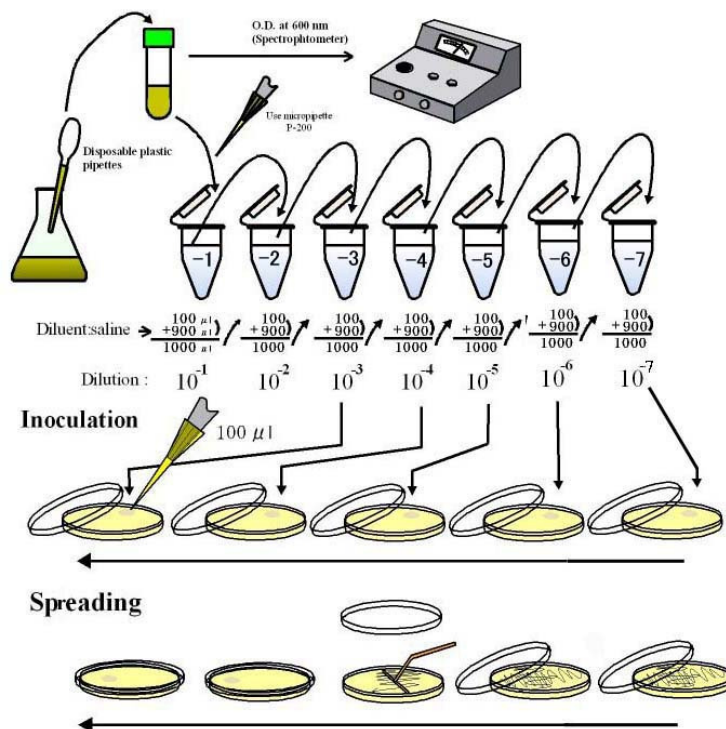
mm). Rešetkasti valjci su veličine 8.5 x 30 mm, obujma 1.9 mL, svaki valjak perforiran je s 130 ravnomjerno raspoređenih rupa promjera 1mm s metalnim dnom i teflonskim poklopcem (Slika 13.) [101]. Na dnu i na poklopcu nalazi se po jedna rupa promjera 2mm. Tri puna valjka izrađena od titanija ili čelika, veličine 3x3.25mm su postavljena u rešetkasti valjak od odgovarajućeg materijala. Za in-vitro ispitivanja koriste se okrugle pločice 4.8mm u promjeru. Površna topografija svih materijala kvantificirana je nekontaktnim profilometrom (FRT MicroProf 200; Fries Research & Technology, Germany). Prosječna hrapavost (Ra – aritmetička sredina apsolutnih vrijednosti svih točaka profila) se mjeri u zoni 1x1 mm s gustoćom točki mjerenja od 500 točaka/mm.



Slika 13. Prikaz rešetkastih valjaka koji se implantiraju miševima s tri puna valjka manjeg promjera zatvorenih teflonskim poklopcem u lumen većeg valjka. Slijeva su prikazani implantati od titanija, glatkog i hrapavog čelika

8.4.2. Priprema sojeva stafilokoka

S.aureus ATCC3556 (S.a. 113) [137] i izogeničan ica⁻ soj, kao i *S.epidermidis* 1457 i izogeničan ica⁻ soj korišteni su za in vitro pokuse i za infekciju na modelu miša. Sojevi stafilokoka su uzgojeni iz smrznutih kultura koje su pripremljene uz pomoć kuglica za kriokulturu (Microbank System; Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Canada). Jedna kuglica za kriokulturu od svakog soja inkubirana je u 1 mL TSB-a 8 sati na 37°C bez miješanja. Kulture su razrijeđene u omjeru 1:100 u 5-10 ml TSB-a u 15 mililitarskim Falcon epruvetama. Subkulture su pripremane 16 sati bez miješanja, centrifugirane, oprane 3 puta u 0.9%NaCl, na pH 7.4 i resuspendirane u fiziološkoj otopini neposredno prije primjene. Koncentracija inokuluma je određena razmazivanjem serijskih razrijeđenja na agar ploče s Mueller-Hinton bujonom (MHB). Pojedinačne kolonije bakterija pobrojane su nakon 24 sata inkubacije na 37°C.



Slika 14. Shematski prikaz tehnike određivanja inokuluma i koncentracije bakterija razrjeđenjem i razmazivanjem na agar ploče.

Za potrebe evaluacije pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM), metalne pločice su uronjene u 8ml subkulture u ploči sa 6 bazena (6 well tissue culture plate; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Pločice su inkubirane 16 sati na 37°C bez miješanja.

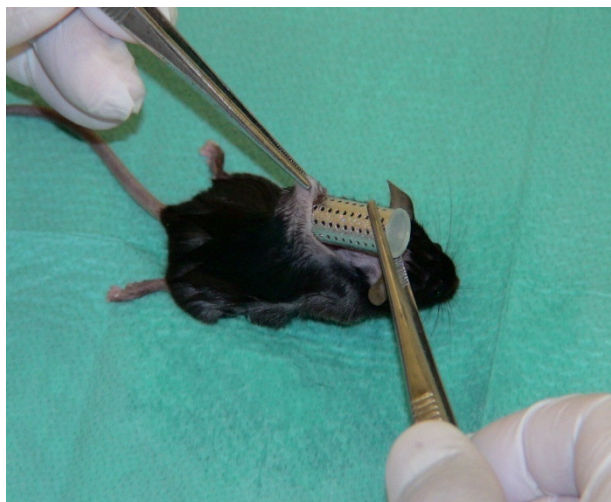
8.4.3. In vitro model adherencije stafilokoka

Pripremljene pločice od titanija, nehrđajućeg čelika glatke i nehrđajućeg čelika hrapave površine inkubiraju se 24 sata u humanoj plazmi alikvotiranoj po 50 ml s inokulumom 10^7 cfu biofilm pozitivnih *S.aureus* i *S.epidermdis* uz miješanje od 50 okr/min na temperaturi od 37°C. U vremenima ½ sata, 3 sata, 6 sati i 24 sata nakon inokulacije pločice se vade u aseptičnim uvjetima te se adherentne bakterije skidaju u sonifikatoru metodom sonifikacije sa 150 kW. Koncentracija bakterija cfu mjeri se razmazivanjem razrijeđenja na MHB agar ploče. U svakom navedenom vremenu aspiriraju se i plivajuće (planktonske bakterije) iz humane plazme te se na isti način razmazivanjem razrijeđenja na MHB agar ploče određuje broj cfu.

8.4.4. Miševi i «tissue cage model»

Ženke C57BL/6 miševi, stare 10-12 tjedana, prosječne težine 29 ± 2 g su čuvane u specifičnim uvjetima bez patogena u štali Odjela za istraživanje, Sveučilišne bolnice u Baselu, Švicarska, prema švicarskom veterinarskom zakonu i uz odobrenje etičke komisije Sveučilišne bolnice. Miševi su anestetizirani intraperitonealnom injekcijom 100mg/kg ketamina (Ketalar; Pfizer AG, Zurich, Switzerland) i 20 mg/kg xylazina (Xylasol; Graeub AG, Bern, Switzerland). Sterilni rešetkasti valjci implantirani su subkutano pod aseptičkim uvjetima na leđa miševima [126, 138, 139]. Inokulumi od 200µl sadržavaju 10^2 - 10^4

S.aureus i 10^4 - 10^6 *S.epidermidis* i injiciraju se preko „25-gauge“ igle perkutano ili intraoperativno ili postoperativno (14 dana nakon implantacije valjaka). U literaturi je već objavljeno da miševi nikad ne razvijaju bakterijemiju i ne pokazuju gubitak težine za vrijeme pokusa [4, 101].



Slika 15. Implantacija rešetkastog valjka



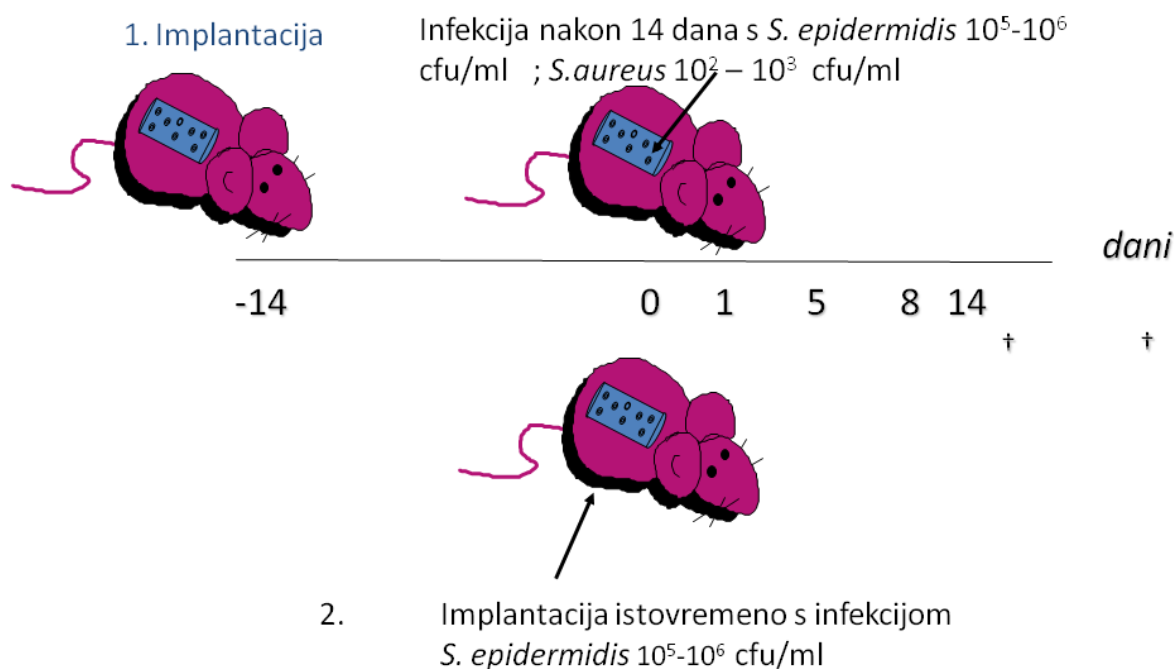
Slika 16. Aspiracija upalne tekućine

Aspirat iz valjka (TCF – tissue cage fluid) uziman je 1. , 5. , 8. i 14. dan nakon infekcije pomoću sterilne perkutane aspiracije. Za aspiraciju su miševi anestezirani isofluranom (Isofluran; Abbot, Wiesbaden, Germany) te je aspirat prebačen u sterilne epruvete s 15 μ L 0.9% NaCl i 1.5%EDTA (pH 7.4) kako bi se izbjeglo zgrušavanje.

Broj plutajućih (planktonskih) bakterija se određuje iz TCF-a razmazivanjem u serijskim razrijeđenjima od 50 μ L na MHB agar pločama, a cfu su brojane nakon 24 sata inkubacije na 37°C . Stafilokoki adherirani na valjke i metalne pločice odvojeni su kako je drugdje opisano

[101]. Ukratko, nakon sterilne eksplantacije rešetkastih valjaka i ispiranja u fiziološkoj otopini, pločice i valjci su sonificirani u otopini 0.9% NaCl, 0.15% EDTA i 0.1% Triton-X-100, pH 7.4. Više od 95% adherentnih bakterija odvaja se od površine ovim postupkom. Nakon dodatnog miješanja na vortexu serijska razrijeđenja su razmazana na MHB agar ploče za kvantifikaciju cfu.

Protokol “Tissue cage” infekcije

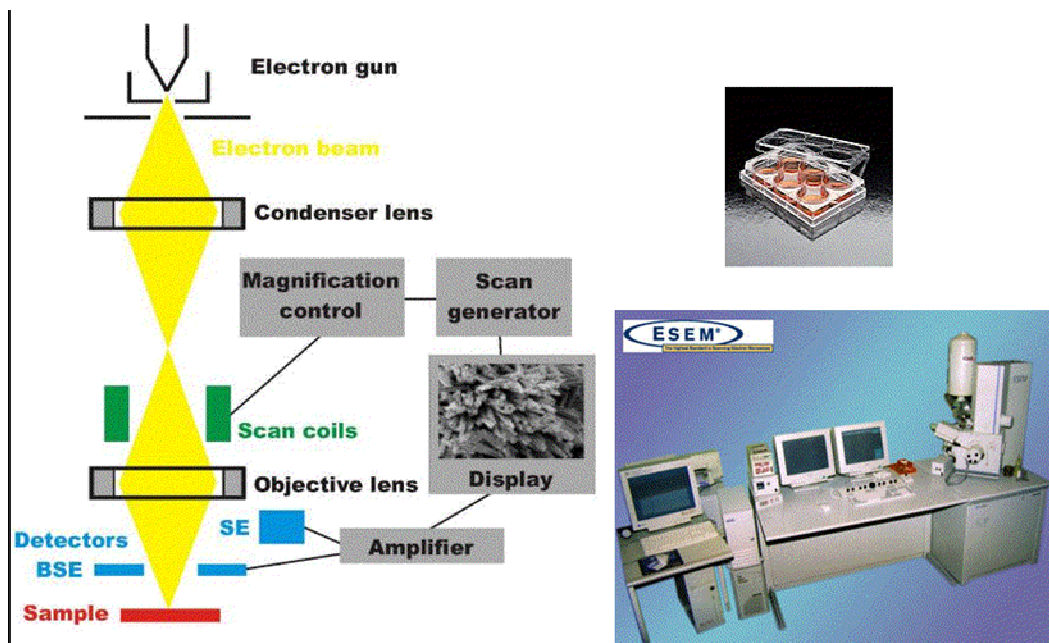


Slika 17. Shema implantacije rešetkastih valjaka i infekcije

Leukociti iz TCF-a se broje na brojaču stanica (Coulter counter, Coulter Electronics, Krefeld, Germany). Postotak živih leukocita određuje se bojanjem s trypan plavilom. Diferencijacija leukocita u TCF-u izvodi se bojanjem centrifugiranih stanica tzv. citospinova (Diff-Quick: Dade Behring, Düringen, Switzerland) te pregledom pod jakim svjetlosnim mikroskopom.

8.4.5. Pretražni elektronski mikroskop (SEM – „scanning electron microscope“)

Uzorci za SEM položeni su po dva od svakog materijala u ploče sa šest bunara. Inkubirani su 3 sata ili 16 sati na 37°C u TSB bez miješanja. Nakon toga su fiksirani u PBS-u koji sadrži 2.5% glutaraldehyd kroz 2 sata na sobnoj temperaturi. Slijedi pranje u PBS-u i H₂O te dehidracija u serijskim razrijeđenjima etanola. Poslije sušenja, pločice s adheriranim bakterijama presvučene su česticama zlata veličine 2-5 nm u trajanju 30 minuta. Uzorci su stavljeni na ljepljive nosače za SEM. Oslikavanje se radi na pretražnom elektronskom mikroskopu (Philips XL 30 FEG ESEM; FEI, Eindhoven, Netherlands) pod tlakom od 2mBar, akceleracijskim naponom od 5000 V i radnom distancom od 6800µm.



Slika 18. Shematski prikaz djelovanja raster elektronskog mikroskopa, ploče sa šest bunara u kojoj su inkubirani uzorci i SEM uređaja uz pomoć kojeg je učinjeno istraživanje

9. STATISTIČKA ANALIZA

Kod in vitro pokusa u grafovima je prikazan medijan vrijednosti dobivenih iz 6 različitih mjerenja za svako pojedino vrijeme. Odstupanje od medijana prikazano je 1. i 3. kvartilom.

Kod in vivo pokusa u grafovima je prikazana aritmetička sredina \pm SD (standardna devijacija). Koncentracija biofilm pozitivnih i negativnih bakterija u različitim vremenima uspoređivana je dvostrukim dvostrukim ANOVA testom za ponavljana mjerenja. Vrijednost $p < 0.05$ uzeta je kao statistički značajna.

10. REZULTATI

Rezultati su prikazani odvojeno za pokuse in vitro i in vivo koristeći iste biofilm pozitivne i biofilm negativne sojeve *S.aureus* i *S.epidermidis*. Korišteni su identični biomaterijali za oba dijela istraživanja.

10.1. Hrapavost površine biomaterijala – profilometrija

U ovom istraživanju korišteni su biomaterijali od kojih se najčešće izrađuju implantati za osteosintezu. Kako bi se kvantitativno utvrdila hrapavost titanija, nehrđajuć čelika glatke i nehrđajuć čelika hrapave površine učinjena je profilometrijska analiza nekontaktnim svjetlosnim profilometrom. Tri različita biomaterijala u obliku rešetkastih valjaka (veličine 8,5x30 mm) i punih valjaka (veličine 3,25x3 mm) podvrgnuti su ispitivanju. Implantati su ispitivani bez bilo kakve dodatne obrade nakon isporuke od proizvođača. U tablici 9. prikazane su vrijednosti prosječne hrapavosti (**Ra** engl. skraćeno od roughness average) za svaki materijal posebno. Vrijednost hrapavosti dobiva se mjerenjem površine 1x1 mm gustoćom od 500 mjernih točaka po milimetru, nakon čega se izračunava aritmetička sredina za svaki materijal od svih mjerenja. Vrijednost Rmax predstavlja najveću dubinu neravnine izmjerenu za određeni biomaterijal. Vrijednost Rt predstavlja najveću udaljenost od izbočenja do udubljenja izmjerenu za pojedini materijal.

METAL	TITANIJ		GLATKI ČELIK		HRAPAVI ČELIK	
Objekt	Rešetkasti valjak	Puni valjak	Rešetkasti valjak	Puni valjak	Rešetkasti valjak	Puni valjak
Ra [μm]	0,66	0,96	0,26	0,12	2,90	3,50
Rmax [μm]	9,85	13,97	4,24	3,11	54,13	47,96
Rt [μm]	9,96	14,14	4,39	3,17	61,00	48,51

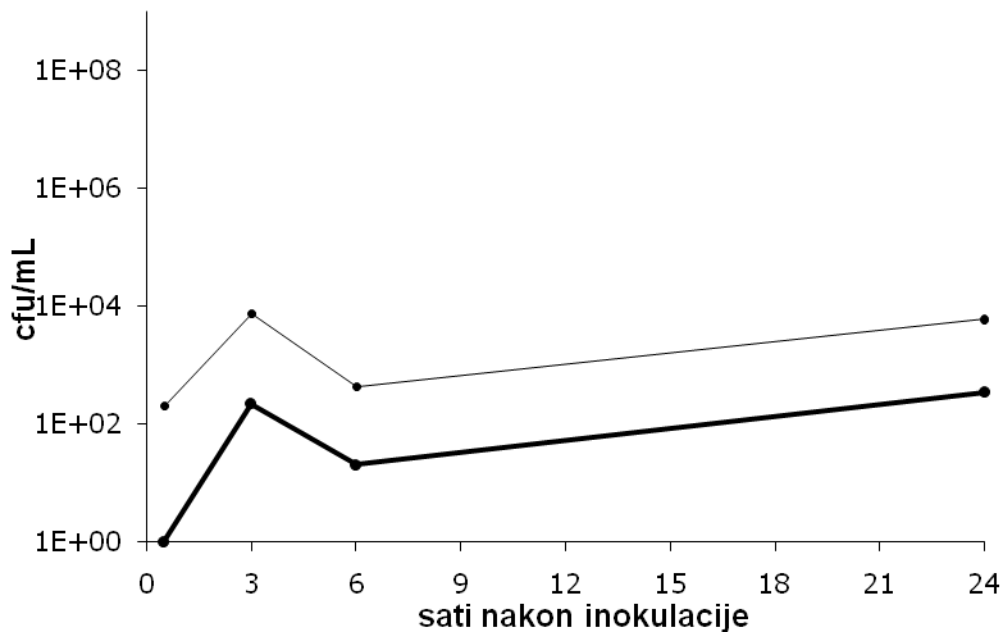
Tablica 9. Rezultati profilometrijskih mjerenja

Rezultati ovog mjerenja pokazuju da najveću hrapavost ima površina hrapavog čelika, koju slijedi titanij pa glatki čelik. Što je veća hrapavost veća je i apsolutna površina svakog biomaterijala pa je samim time i izloženost kolonizaciji veća.

10.2. Rana adhezija *S.aureus* na različite biomaterijale in vitro

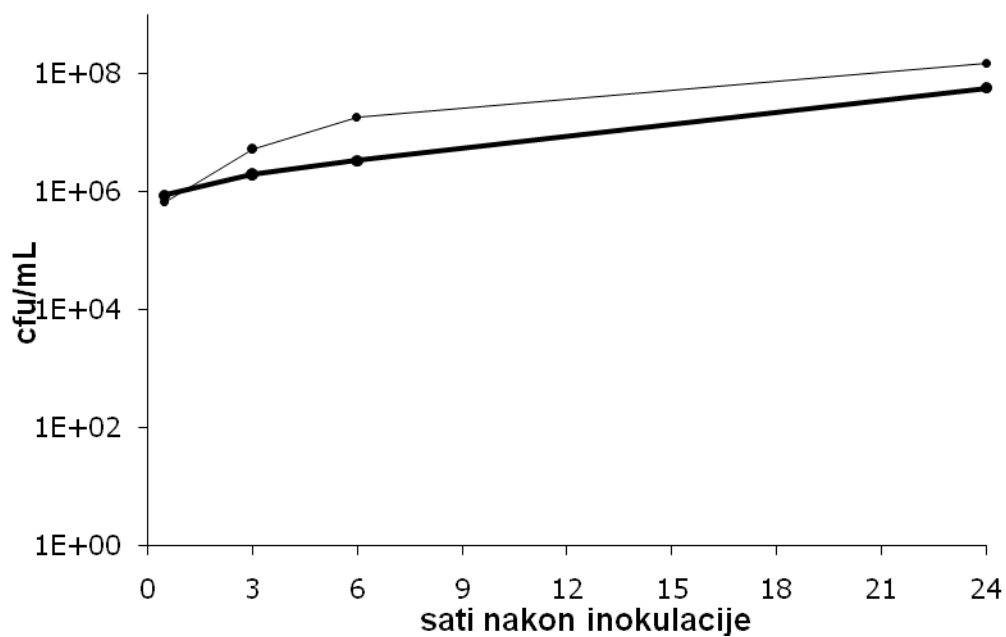
Kao što je opisano u poglavlju o patogenezu infekcije, postoji nekoliko faza u stvaranju biofilma. U ranoj fazi adhezije ulogu imaju nespecifični i specifični faktori vezanja za površinu implantata. Ovaj dio istraživanja proučava biofilm pozitivni *S.aureus* i njegovu kolonizaciju u vremenu ½ sata, 3 sata, 6 sati i 24 sata od inokulacije na titaniju, glatkom i hrapavom čeliku. Metalni valjci uronjeni su u medij koji sadrži 50 ml TSB-a ili 50 ml alikvotirane humane plazme te su uz lagano miješanje 50 okr/min inkubirani na temperaturi od 37°C kako bi se bakterije adherirale ravnomjerno na sve površine implantata. Kao inokulum u medij je stavljeno 10^7 *S.aureus* koji stvaraju biofilm. Grafički su prikazane vrijednosti koje su dobivene izračunavanjem medijana za 6 implantata od svakog materijala posebno (Slika 19. – 24.). U svakom vremenu je mjerena koncentracija cfu adheriranih na implantate i planktonskih u mediju. Za sva tri materijala je pokazano da postoji značajna razlika između TSB i humane plazme kao medija u kojem se inkubiraju bakterije. Za planktonske bakterije jednostavno je objašnjivo da se postižu veće koncentracije cfu primjenom TSB-a jer se radi o mediju koji je optimalniji za rast stafilokoka.

In vitro adherentni *S.aureus* WT na T valjcima



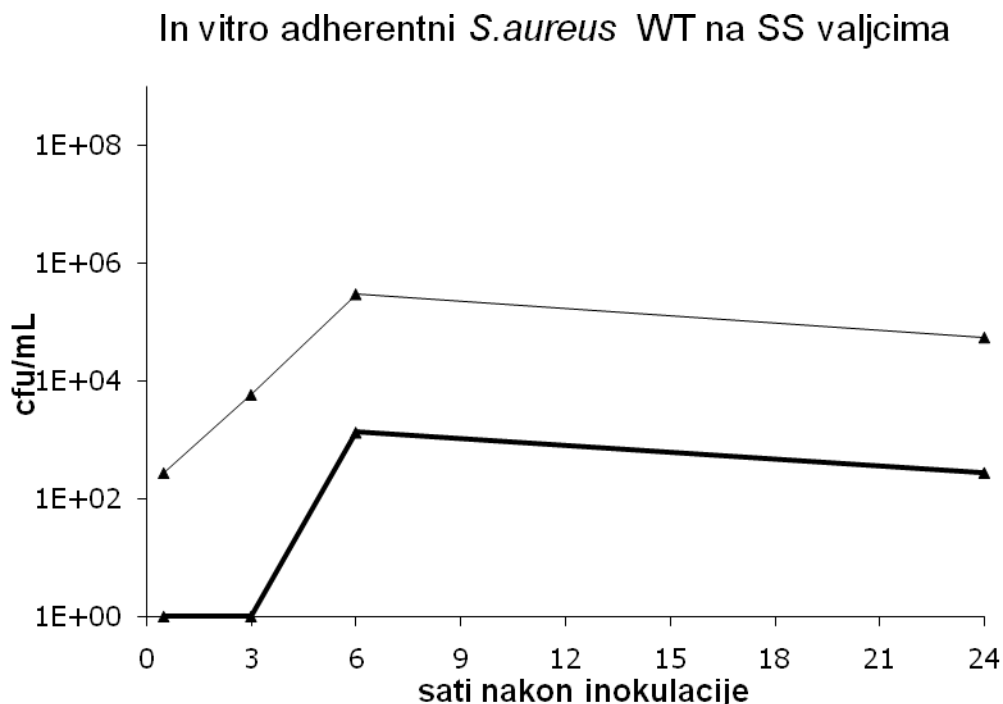
Slika 19. Titanijski valjci, prikaz adherentnih bakterija (*S.aureus* koji stvara biofilm) : tanka linija prikazuje TSB kao medij, debela linija prikazuje humanu plazmu

In vitro planktonski *S.aureus* WT na T valjcima

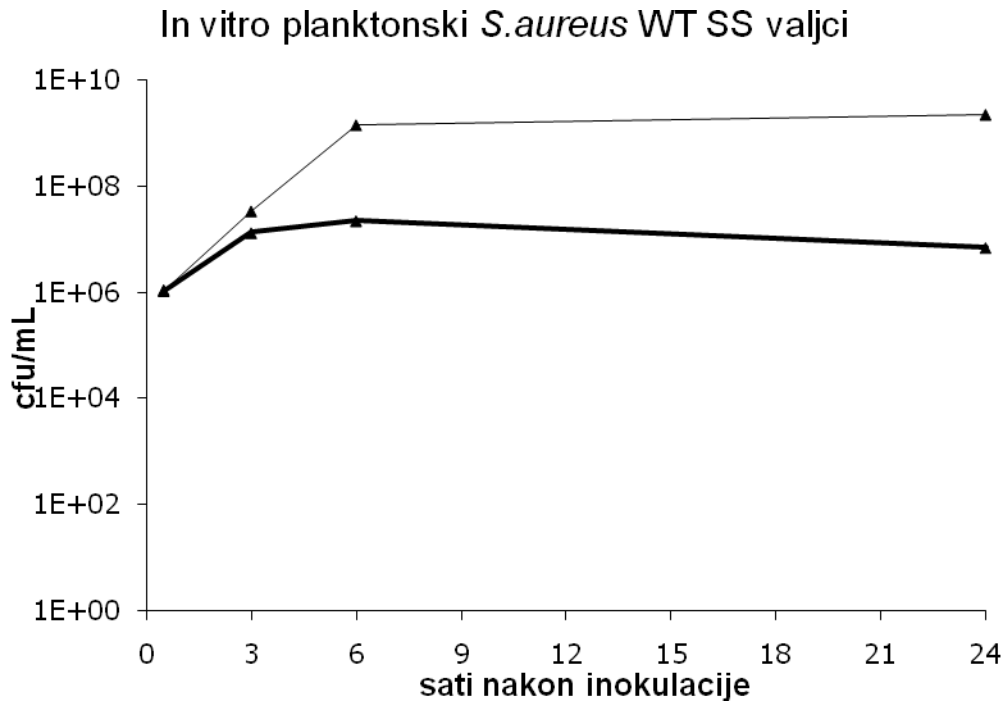


Slika 20. Titanijski valjci, prikaz planktonskih bakterija (*S.aureus* koji stvara biofilm) : tanka linija prikazuje TSB kao medij, debela linija prikazuje humanu plazmu

Opisanoj razlici u koncentraciji između adheriranih bakterija u TSB i humanoj plazmi doprinosi veća koncentracija koja je postignuta među planktonskim bakterijama, odnosno onima koje se nalaze oko implantata. Međutim, iznimno je interesantan podatak koji je dobiven za sva tri materijala u fazi rane kolonizacije implantata ½ sata nakon inokulacije. U ovom vremenu postoje razlike u koncentraciji adheriranih bakterija, naime 100 puta je veća koncentracija cfu za sva tri materijala uronjena u TSB od koncentracije postignute za materijale uronjene u humanu plazmu. Razlike u planktonskim bakterijama nisu uopće primjetne ½ sata nakon inokulacije. Kasnije, u vremenima 3, 6 i 24 sata nakon inokulacije postoje velike razlike i u koncentraciji planktonskih bakterija. Ovaj podatak govori u prilog tome da postoji natjecanje za površinu implantata između proteina iz humane plazme i bakterija, posebno u ranoj fazi kolonizacije.



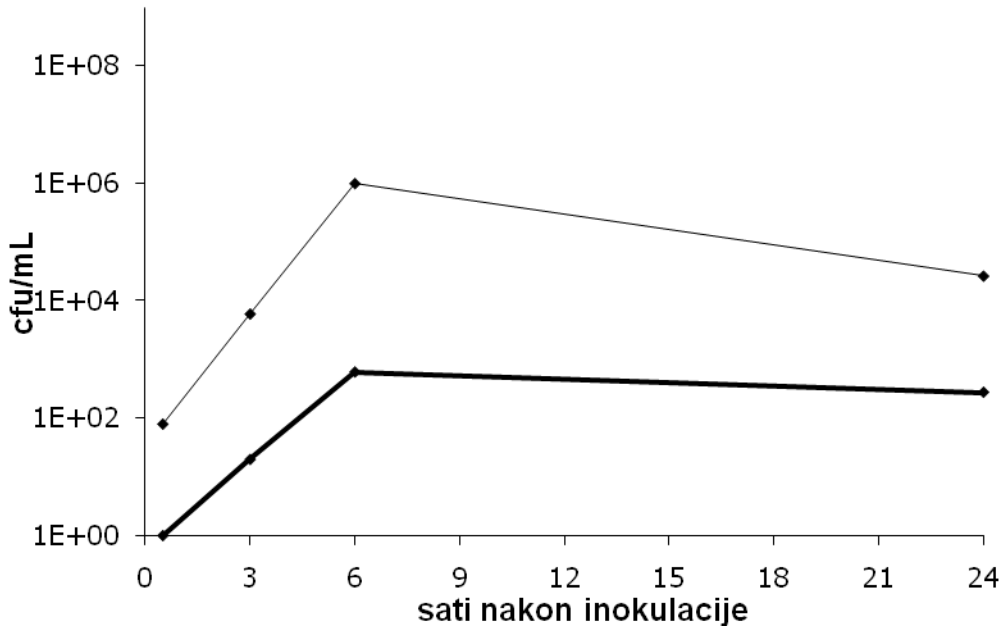
Slika 21. Valjci od glatkog nehrđajućeg čelika, prikaz adherentnih bakterija (*S.aureus* koji stvara biofilm) : tanka linija prikazuje TSB kao medij, debela linija prikazuje humanu plazmu



Slika 22. Valjci od glatkog nehrđajućeg čelika, prikaz planktonskih bakterija (*S.aureus* koji stvara biofilm) : tanka linija prikazuje TSB kao medij, debela linija prikazuje humanu plazmu

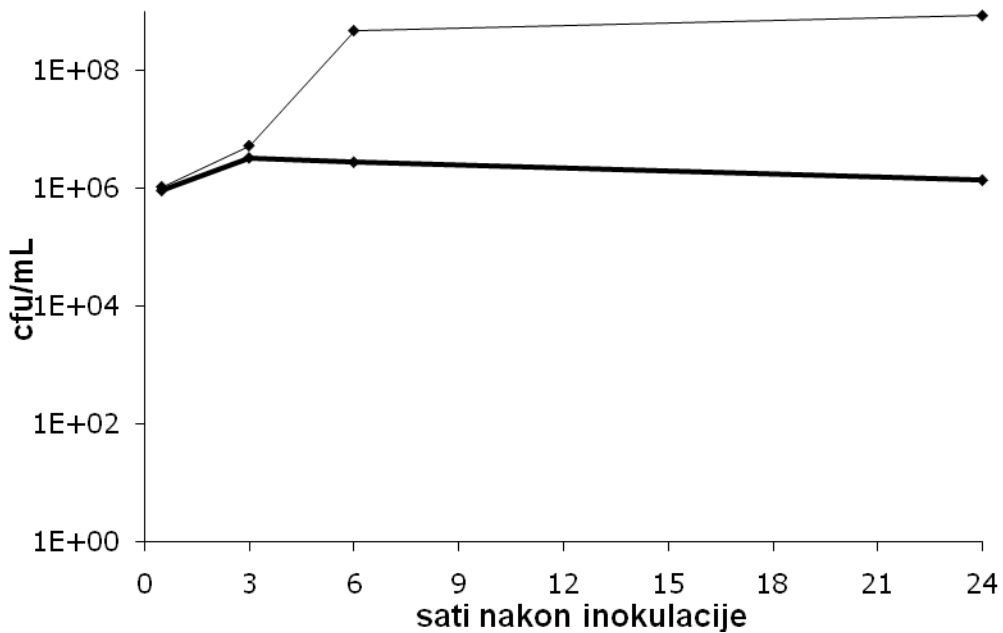
Razlike adhezije bakterija na titanij i čelik vidljive su do 6 sati nakon inokulacije, a nakon tog vremena koncentracije cfu se ujednačavaju za sva tri materijala. *S.aureus* pokazuje vrlo brzu početnu adheziju za površine titanijskih valjaka do 3 sata nakon inokulacije, nakon čega je koncentracija u blagom padu u vremenu 6 sati od inokulacije te konačno pokazuje rast nakon 24 sata do vrijednosti koje su bile postignute nakon 3 sata. *S.aureus* pokazuje eksponencijalni rast do 6 sati nakon inokulacije na valjcima od hrapavog nehrđajućeg čelika te se nakon tog vremena pokazuje blagi pad koncentracije.

In vitro adherentni *S.aureus* WT SR valjci



Slika 23. Valjci od hrapavog nehrđajućeg čelika, prikaz adherentnih bakterija (*S.aureus* koji stvara biofilm) : tanka linija prikazuje TSB kao medij, debela linija prikazuje humanu plazmu

In vitro planktonski *S.aureus* WT SR valjci



Slika 24. Valjci od hrapavog nehrđajućeg čelika, prikaz planktonskih bakterija (*S.aureus* koji stvara biofilm) : tanka linija prikazuje TSB kao medij, debela linija prikazuje humanu plazmu

Na valjcima izrađenim od glatkog nehrđajućeg čelika adhezija bakterija se dokazuje tek nakon 3 sata, broj cfu raste do 6 sati nakon čega lagano pada do 24 sata od inokulacije. Sva tri materijala postižu maksimalnu koncentraciju adheriranih bakterija 3 sata nakon inokulacije.

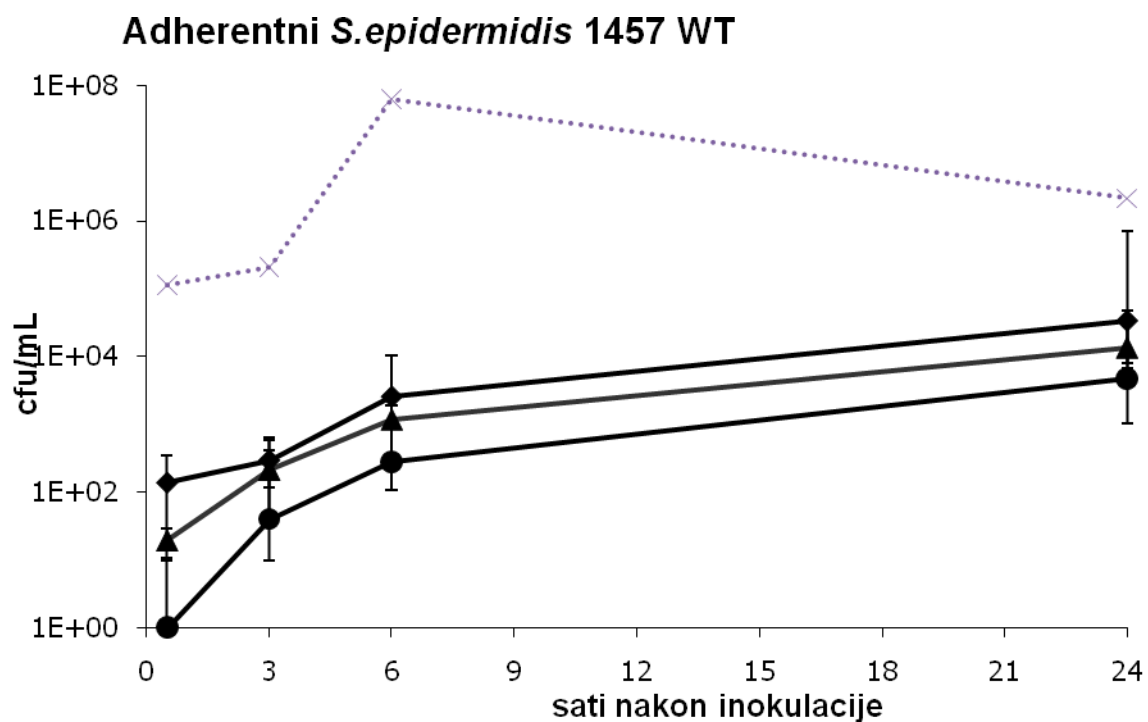
10.3. Rana adhezija *S.epidermidis* na različite biomaterijale in vitro

Biofilm pozitivni *S.epidermidis* i njegovu kolonizaciju u vremenu ½ sata, 3 sata, 6 sati i 24 sata od inokulacije na titaniju, glatkom i hrapavom čeliku proučavali smo na isti način kao što je opisano prethodno sa *S.aureus*. Metalni valjci uronjeni su u medij koji sadrži 50 ml TSB-a ili 50 ml alikvotirane humane plazme te su inkubirani na temperaturi od 37°C uz lagano miješanje 50 okr/min kako bi se bakterije adherirale ravnomjerno na sve površine implantata. U pilot studiji bez miješanja, bakterije su adherirale uglavnom na gornju površinu implantata. Kao inokulum u medij je stavljeno 10^7 *S.epidermidis* koji stvaraju biofilm. Grafički su prikazane vrijednosti koje su dobivene izračunavanjem medijana vrijednosti koncentracije cfu dobivenih mjerenjem za 6 valjaka od svakog materijala posebno (Slika 25. I 26.). Dva odvojena grafikona pokazuju adherentni (Slika 25.) i planktonski (Slika 26.) *S.epidermidis* za titanij, glatki nehrđajući čelik i hrapavi nehrđajući čelik. U svakom vremenu mjerena je koncentracija bakterija adheriranih na implantate i planktonskih bakterija u mediju.

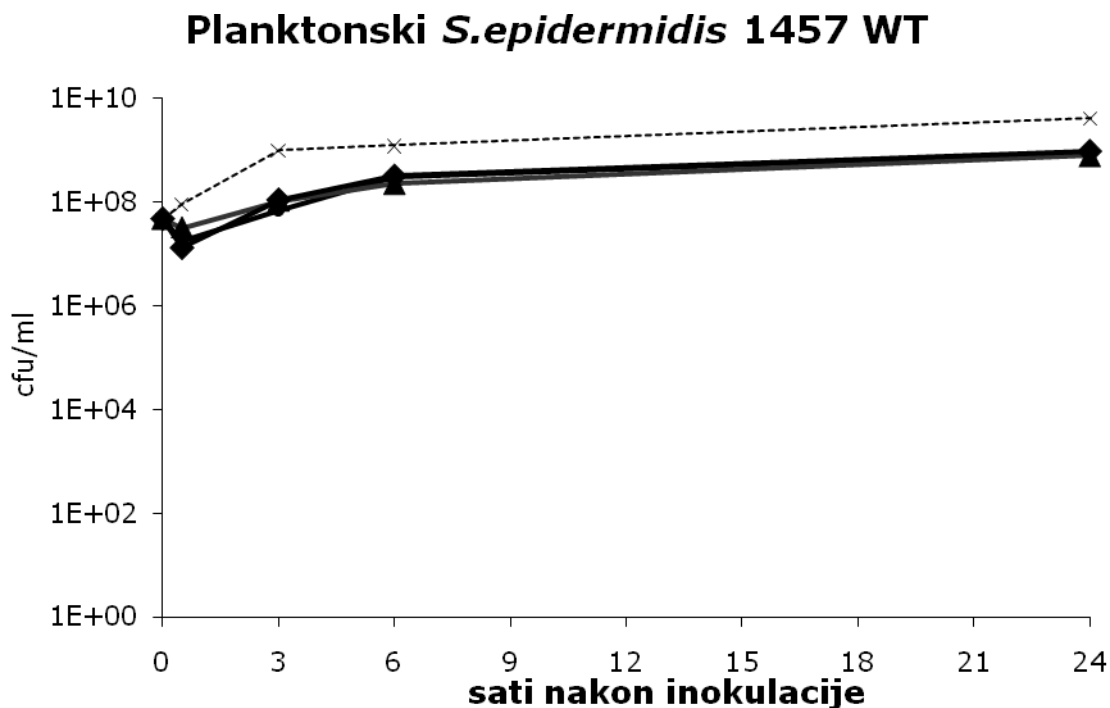
S.epidermidis u in vitro uvjetima pokazuje razliku između tri materijala kada su mjerene adherentne bakterije. Titanij se kao biomaterijal pokazuje najmanje pogodnim za kolonizaciju *S.epidermidis*. Izmjerene vrijednosti za titanij u prosjeku su 10 puta manje od onih koje su izmjerene za čelik u svakom vremenu. Hrapavi čelik pokazuje na primjeru *S.epidermidis* važnost ukupne površine biomaterijala. Vrijednosti koje su dobivene profilometrijskim mjerenjima koreliraju s rezultatima mjerenja koncentracija cfu adherentnih bakterija.

Rast broja planktonskih bakterija kroz promatrano vrijeme kod *S.epidermidis* pokazuje gotovo identične krivulje za titanij i čelik.

Koncentracije mjerenih cfu u TSB kao mediju i humane plazme kao mediju za titanij u usporedbi adherentnih i planktonskih bakterija nisu proporcionalne. TSB se kao medij pokazao pogodnijim za veći rast broja cfu kod *S.epidermidis* u odnosu na humanu plazmu. Očekivano je da se razlika u cfu prati kada su mjerene planktonske bakterije jer je TSB podloga koja je namijenjena rastu bakterija, ali koncentracija cfu u TSB je samo 10 puta veća u odnosu na *S.epidermidis* u humanoj plazmi. Adherentni *S.epidermidis* pokazuje oko 10000 puta veću koncentraciju cfu u svakom mjenom vremenu u TSB u odnosu prema humanoj plazmi.



Slika 25. Prikaz adherentnih bakterija (*S.epidermidis* koji stvara biofilm) : isprekidana linija prikazuje TSB kao medij za titanij, puna linija prikazuje humanu plazmu, kružni simbol predstavlja titanij, trokut predstavlja glatki čelik, romb predstavlja hrapavi čelik. Svaka točka predstavlja medijan vrijednosti od mjerenja 6 različitih valjaka

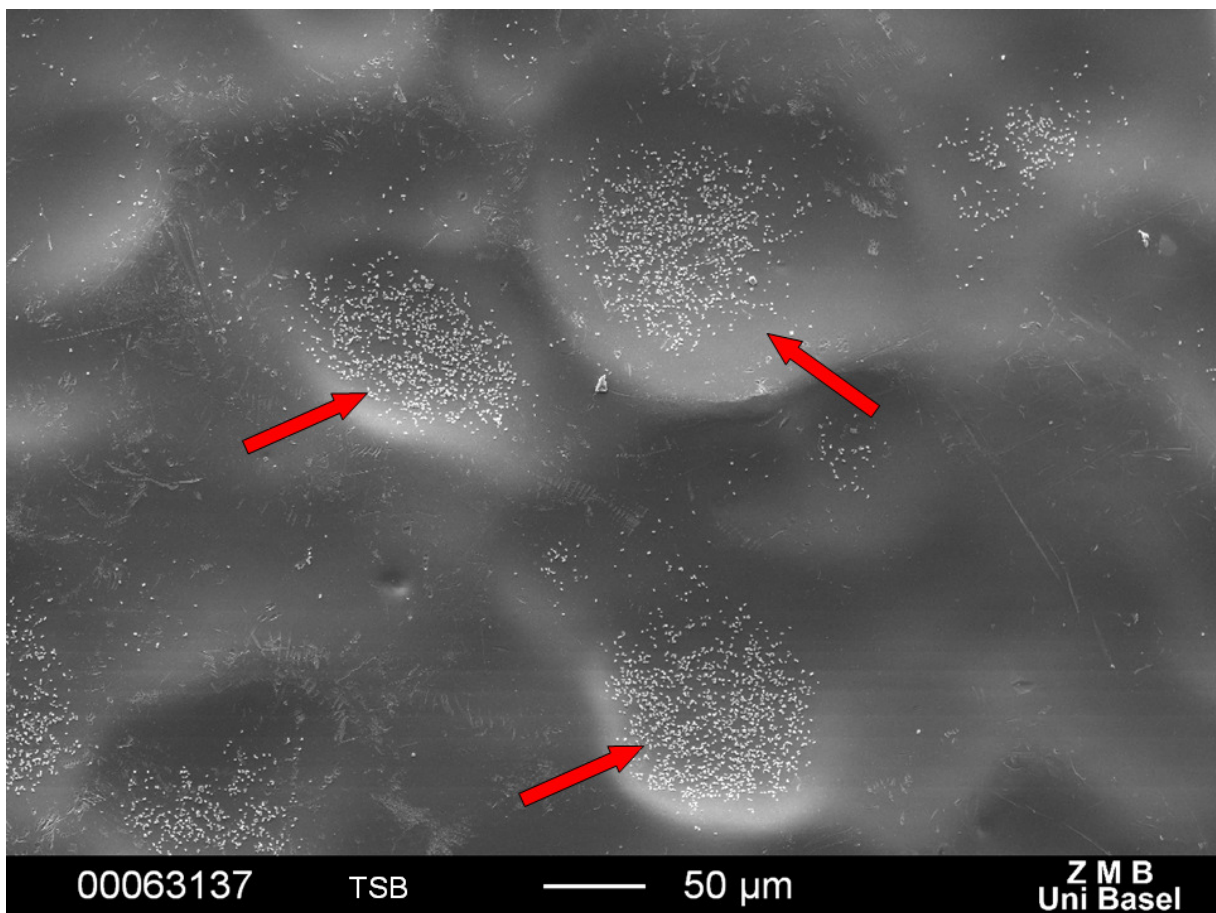


Slika 26. Prikaz planktonskih bakterija (*S.epidermidis* koji stvara biofilm) : isprekidana linija prikazuje TSB kao medij za titanij, puna linija prikazuje humanu plazmu, kružni simbol predstavlja titanij, trokut predstavlja glatki čelik, romb predstavlja hrapavi čelik. Svaka točka predstavlja medijan vrijednosti od mjerenja 6 različitih valjaka

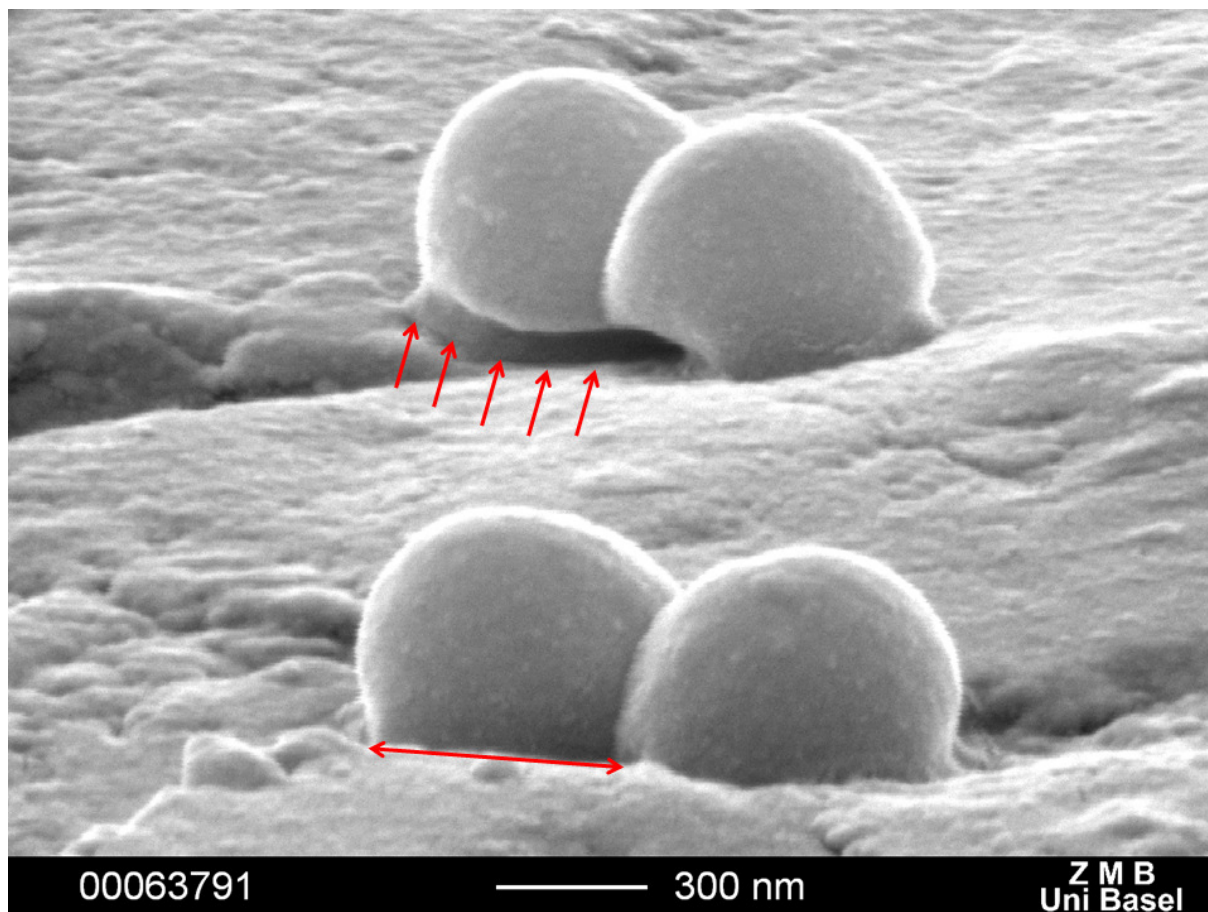
10.4. Jača adhezija biofilm pozitivnih *S.epidermidis* nego *S.aureus* za valjke izrađene od titanija i čelika in vitro

Za ispitivanje stvaranja biofilma i morfoloških karakteristika biofilma in vitro korištena je analiza raster elektronskim mikroskopom (SEM). Ovom metodom uspoređivali smo važnost *ica* gena za stvaranje biofilma kod divljeg soja bakterija i biofilm negativnih bakterija nakon kratke inkubacije (3 sata) i inkubacije preko noći (16 sati) na različitim metalima. Za postizanje kvalitetnih vizualnih zapisa trebalo je titrirati svaki korak koji je opisan u metodama kroz više serija pilot uzoraka zbog iznimne osjetljivosti tehnologije ove metode.

Slika 27. prikazuje ranu adheziju i raspoređivanje biofilm pozitivnih *S.aureus* na površini hrapavog čelika. U početnoj fazi nakon inokulacije bakterije se nalaze u planktonskom obliku plivajući u tekućini oko implantata. Neravnine i udubine na samoj površini implantata, kao što je to slučaj kod prikazanog hrapavog čelika, pogoduju nakupljanju bakterija koje koriste nespecifične mehanizme vezanja za površinu implantata. U ovoj fazi nije još stvoren biofilm i udubine na implantatu smanjuju mogućnost odnošenja bakterija uslijed gibanja fluida odnosno TSB medija.



Slika 27. Fotografija raster elektronskim mikroskopom (SEM) prikazuje površinu hrapavog nehrđajućeg čelika nakon 3 sata inkubacije *S.aureus*: strelice ukazuju na udubine u kojima se bakterije u početnoj fazi nakupljaju



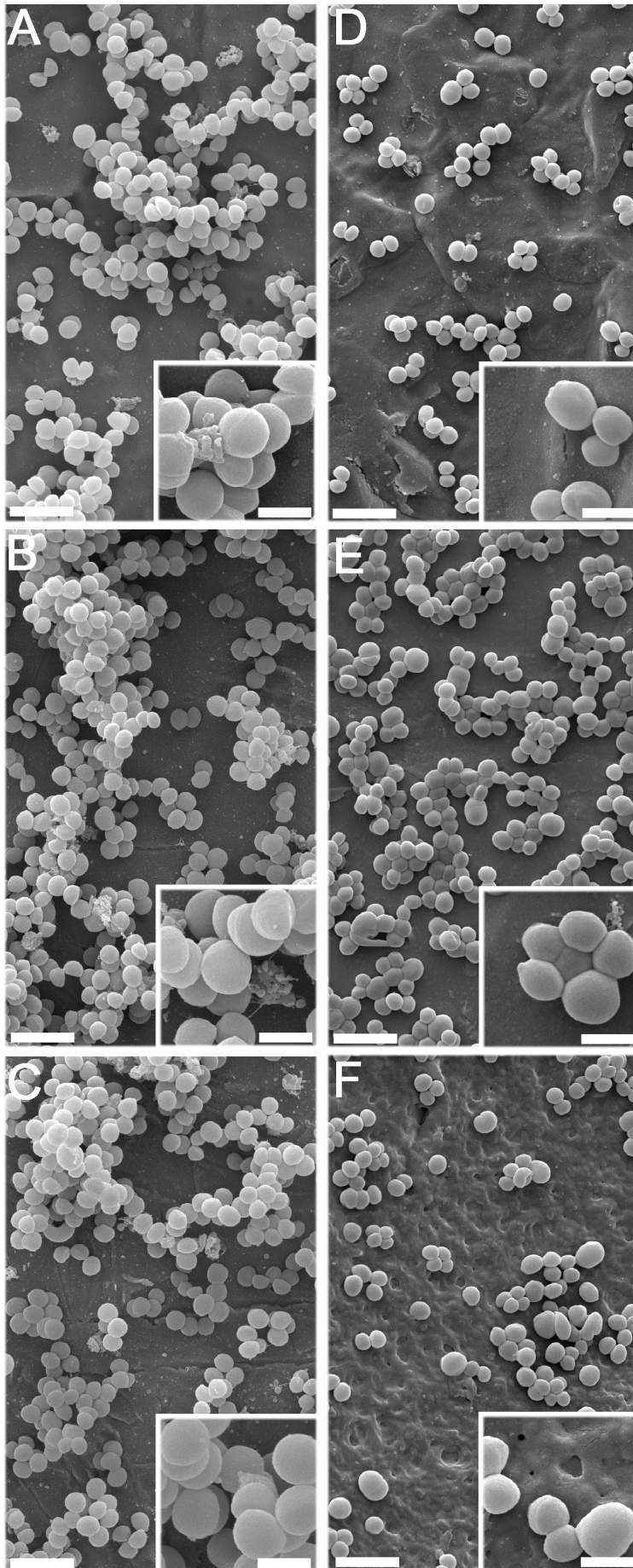
Slika 28. Fotografija raster elektronskim mikroskopom (SEM) prikazuje biofilm negativni *S.aureus* nakon 3 sata inkubacije na površini titanija: strelice pokazuju kontaktnu površinu između bakterije i metalne površine, vide se proširene površine okruglih bakterija na mjestu kontakta s površinom biomaterijala što odgovara mehanizmima nespecifične adhezije (van der Waalsove i elektrostatske sile). Ovaj soj bakterija nema *ica* gen pa se ne vide specifični egzopolimeri.

Pretražni elektronski mikroskop dozvoljava ispitivanje cijele površine implantata osim one koja je zalijepljena za nosač. Sam implantat moguće je rotirati u tri ravnine tako da je uz tlocrtni prikaz okomito iz visine moguće snimiti i kose snimke bakterija na površini implantata. Na ovaj način dobivene su trodimenzionalne snimke koje daju više informacija o spoju površina bakterija i implantata što se naziva engl. „interface“. Ovakav pogled nismo pronašli opisan u dostupnoj literaturi. Slika 28. prikazuje biofilm negativni *S.aureus* nakon 3 sata inkubacije na površini titanija. U faktore važne za incijalnu adheziju ubrajaju se

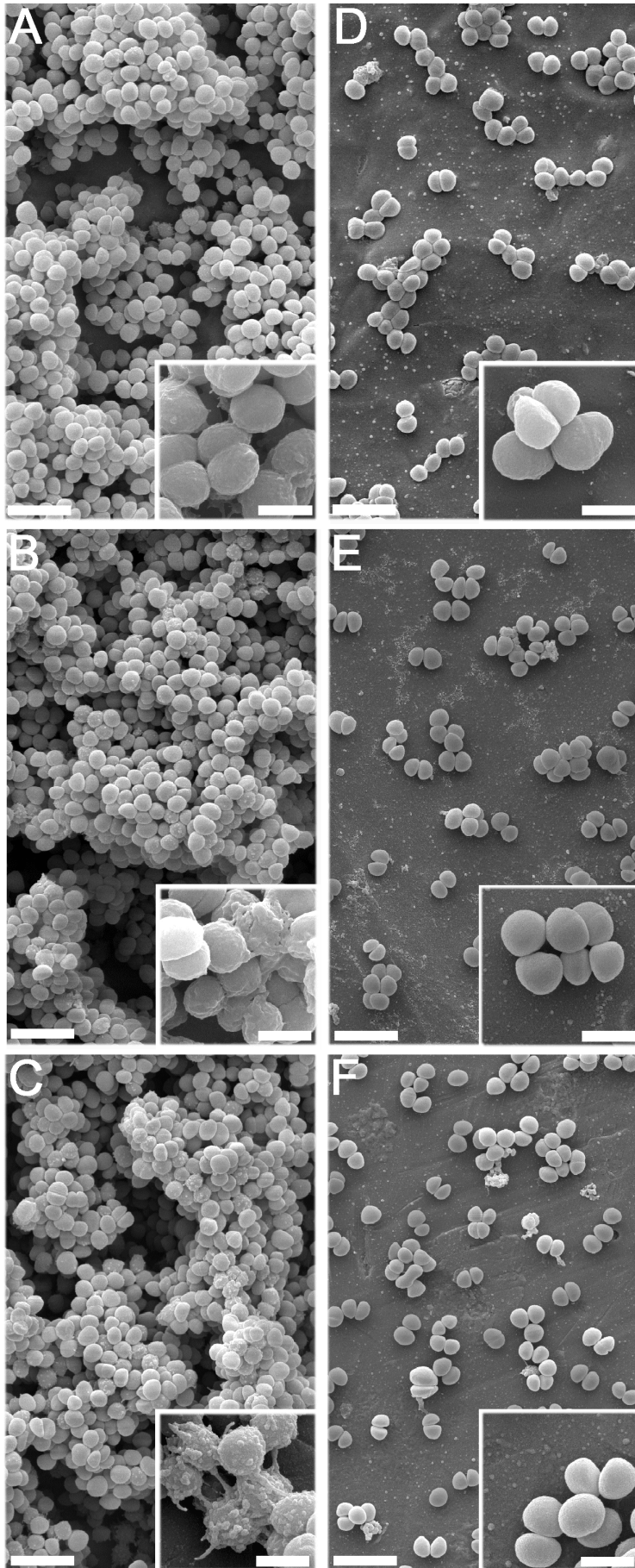
površinski napon, hidrofobna svojstva, elektrostatske i Van der Waals-ove sile. Slika 28. ne prikazuje posebne izdanke iznad površine stanične stijenke bakterija što odgovara opisu nespecifičnih faktora vezanja za površinu implantata. Bakterije pokazuju proširenu površinu na mjestu spoja s implantatom.

Slika 29. prikazuje površine tri materijala kolonizirane bakterijama. Površina komercijalnog čistog titanija pod povećanjem je rebrasta uz brojne mikrogrebene (Slika 29. , A i D). Glatki čelik pokazuje potpuno ravnu površinu (Slika 29. , B i E), dok pjeskareni hrapavi čelik pokazuje nepravilna udubljenja (Slika 29. , C i F). Ova opažanja odgovaraju profilometrijskim mjerenjima kojima su dobivene vrijednosti: R_a 0,66 μm , R_{max} 9,85 μm , R_t 9,96 μm , za titanij; R_a 0,25 μm , R_{max} 4,24 μm , R_t 4,39, za glatki čelik i R_a 2,90 μm , R_{max} 54,13 μm , R_t 61 μm za hrapavi čelik. Na svim materijalima biofilm pozitivni *S.aureus* tvori slične višeslojne nakupine sa skromnim depozitima ekstracelularnog biofilma (Slika 29. A,B,C). Uzorci s biofilm negativnim *S.aureus* pokazali su malobrojne bakterije bez stvaranja biofilma i u malim nakupinama (Slika 29. D,E,F). Biofilm pozitivni i negativni *S.aureus* pokazuje jednake morfološke karakteristike nakupina neovisno o materijalu, ali biofilm pozitivne bakterije pokazuju značajno veću brojnost u usporedbi s biofilm negativnim bakterijama.

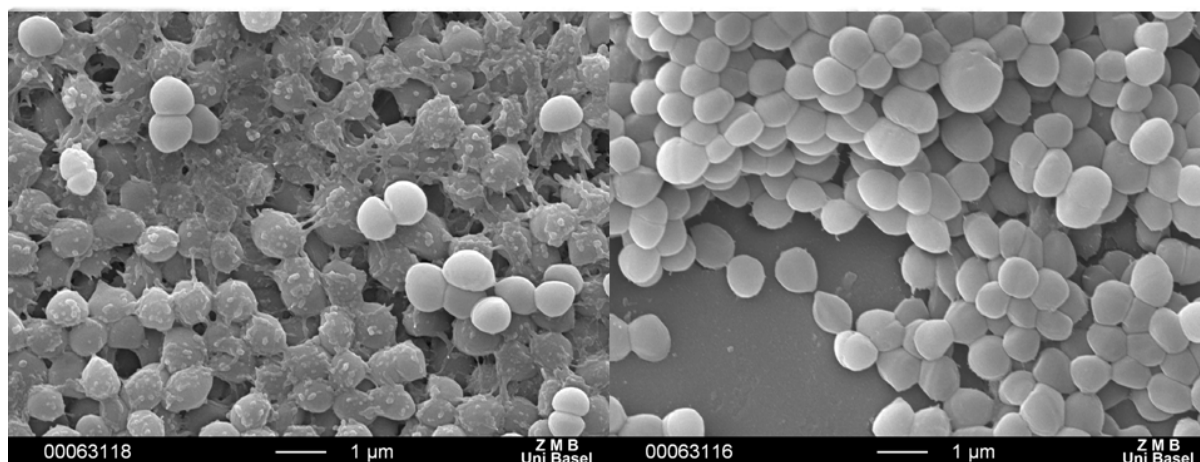
Jednaki eksperimenti provedeni su sa *S.epidermidis* (Slika 30.). Divlji soj bakterija koji stvara biofilm akumulira se u velikim nakupinama tvoreći brojne intercelularne egzopolimerne depozite i mostove (Slika 30. A,B,C). Biofilm negativni *S.epidermidis* pokazuje malu brojnost bakterija i skromnu kolonizaciju površina u jednom sloju s malim nakupinama bez stvaranja biofilma, nakon jednake inkubacije od 16 sati (Slika 30. D,E,F). Biofilm pozitivni *S.epidermidis* pokazuje jednake morfološke karakteristike nakupina na sva tri materijala i značajno nadmašuje broj bakterija u usporedbi s biofilm negativnim *S.epidermidis* na istim materijalima.



Slika 29. Raster elektronski mikroskop in vitro adherentnih *S.aureus* inkubiranih 16h u TSB: slike A-C prikazuju biofilm pozitivne bakterije, slike D-E prikazuju biofilm negativne bakterije, titanij prikazuju slike A i D, glatki čelik prikazuju slike B i E, hrapavi čelik prikazuju slike C i F; linija mjerila predstavlja 3 μ m na većoj slici i 1 μ m na manjoj umetnutoj slici



Slika 30. Raster elektronski mikroskop in vitro adherentnih *S.epidermidis* inkubiranih 16h u TSB: slike A-C prikazuju biofilm pozitivne bakterije, slike D-E prikazuju biofilm negativne bakterije, titanij prikazuju slike A i D, glatki čelik prikazuju slike B i E, hrapavi čelik prikazuju slike C i F; linija mjerila predstavlja 3 μ m na većoj slici i 1 μ m na manjoj umetnutoj slici



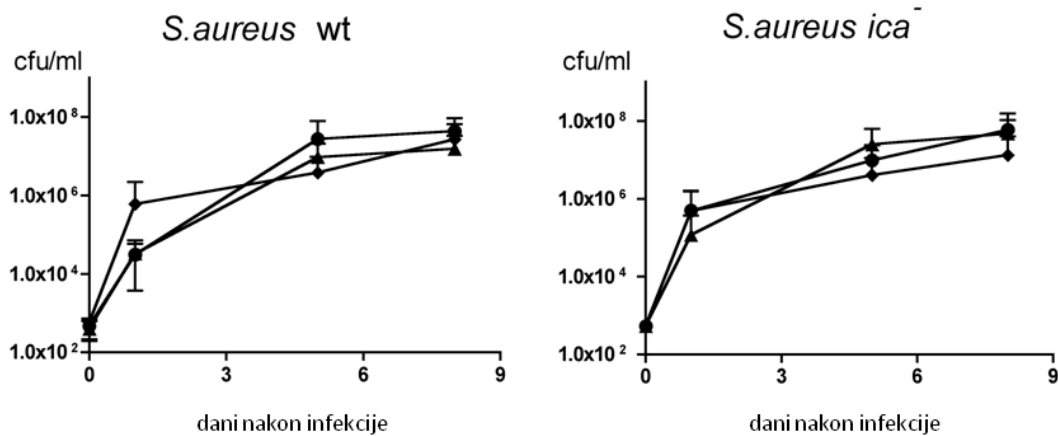
Slika 31. Biofilm pozitivni *S.epidermidis* lijevo i biofilm negativni *S.epidermidis* desno na površini implantata nakon inkubacije od 16 sati

Slika 31 prikazuje morfološke karakteristike biofilma *S.epidermidis* koje se vide nakon inkubacije od 16 sati, fiksacije uzorka glutaraldehydom i dehidracije etanolom. U dubljim slojevima biofilm pozitivnih *S.epidermidis* bakterije su prožete ekstracelularnim mostovima i depositima egzopolisaharida, dok se na površini nalaze bakterije koje još nisu umrežene strukturom biofilma. Biofilm negativni *S.epidermidis* ne pokazuje nikakve ekstracelularne mostove ni depozite.

10.5. Jednako visoke koncentracije planktonskih biofilm pozitivnih i negativnih *S.aureus* nakon poslijeoperacijske infekcije titanijskih i čeličnih valjaka

Minimalna infektivna doza biofilm pozitivnih i negativnih *S.aureus* potrebnih za izazivanje trajne infekcije određivana je in vivo. Trajna infekcija je prisutna u slučaju da nakon inokulacije pri svakoj aspiraciji upalne tekućine postoji pozitivan nalaz rasta bakterija. Inokulumi od 10^2 do 10^4 cfu aplicirani su poslijeoperacijski (14 dana nakon implantacije) miševima koji nose valjke od titanija, glatkog čelika ili hrapavog čelika. Najmanji inokulumi od 1.2×10^2 cfu *S.aureus* nakon 4 dana nisu davali pozitivne aspirate. Nakon davanja

inokuluma od 5×10^2 cfu *S.aureus*, biofilm pozitivne i biofilm negativne bakterije izazvale su trajnu infekciju, a koncentracija planktonskih bakterija dosegla je 10^6 do 10^7 cfu/ml nakon 8 dana (Slika 32.).



Slika 32. Prikaz koncentracije planktonskih bakterija biofilm pozitivnih (wt – lijevi graf) i biofilm negativnih (*ica⁻* - desni graf) *S.aureus* kroz 8 dana: titanijski valjci ●, valjci od glatkog čelika ▲ i valjci od hrapavog čelika ◆. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD za svaku grupu.

Inokulum kojim se izaziva trajna infekcija kod 50% životinja naziva se minimalna infektivna doza. Za *S.aureus* izračunali smo minimalnu infektivnu dozu od 3×10^2 cfu. Ovaj podatak govori o značajnoj virulentnosti *S.aureus* što podržava činjenica da je inokulacija izvršena 14 dana nakon implantacije valjaka. Krivulje rasta planktonskih biofilm pozitivnih i negativnih *S.aureus* slične su za titanij, glatki i hrapavi čelik (Slika 32.)

10.6. Male koncentracije adherentnih biofilm pozitivnih i negativnih *S.aureus* na valjcima od titanija i čelika in vivo

Infekcije implantata teško se liječe zbog bakterija koje se nalaze trajno unutar biofilma. Biofilm stvara populacija adherentnih bakterija pa je određivanje njihove koncentracije vrlo važno. Rešetkasti valjci izvađeni su u sterilnim uvjetima iz žrtvovanih životinja zadnji dan pokusa. Iz rešetkastih valjaka od titanija, glatkog i hrapavog čelika su izvađeni manji valjci od istog materijala te su ultrazvukom skinute adherentne bakterije. Koncentracija adherentnih *S.aureus* bila je ovisna o inokulumu. Inokulumi ≤ 100 cfu nisu davali pozitivni nalaz za prisustvo planktonskih bakterija nakon 8 dana, međutim kod 1/6 titanijskih valjaka i 3/6 valjaka od hrapavog čelika nađene su adherentne biofilm pozitivne bakterije *S.aureus*. Na valjcima izrađenim od glatkog čelika nije nađeno adherentnih biofilm pozitivnih *S.aureus*. Implantati koji su inficirani biofilm negativnim *S.aureus* inokuluma ≤ 100 cfu nisu sadržavali adherentne bakterije na kraju pokusa (Tablica 10.).

Kod infekcije višim inokulumima, 80-100% miševa imalo je adherentne bakterije na implantatima jednako biofilm pozitivne kao i biofilm negativne. Srednje vrijednosti za oba soja bile su u rasponu od 5×10^4 do 6×10^5 (Tablica 10.). Adherentne bakterije činile su samo malu frakciju ukupne koncentracije bakterija (u prosjeku 0,89%). Kod izračunavanja frakcije adherentnih bakterija u obzir smo uzeli ukupnu koncentraciju bakterija (adherentne i planktonske) na dan žrtvovanja životinja. Za infekcije implantata značajnije su adherentne bakterije jer su otpornije i duže prisutne u domaćinu unutar biofilma.

Rezultati upućuju na zaključak da je utjecaj *ica* gena na koncentraciju *S.aureus* skroman kad su implantati od titanija i hrapavog čelika inficirani manjim inokulumima. Kod infekcije *S.aureus* s velikim koncentracijama planktonskih bakterija adherencija bakterija nije bila ovisna o *ica* genima.

			Biofilm pozitivni / wt		Biofilm negativni / <i>ica</i> ⁻	
Bakterija	Materijal inficiranih valjaka	Inokulum Infekcije	Inficirani implantati (n)/ Inokulirani miševi (n)	Koncentracija bakterija prosjek cfu/ implantat	Inficirani implantati (n)/ Inokulirani miševi (n)	Koncentracija bakterija prosjek cfu/ implantat
S.aureus	Titanij	≤100 cfu/mL	1/6	3.57 x 10 ³	0/3	0
		≤1000 cfu/mL	6/7	1.89 x 10 ⁵	4/5	4.80 x 10 ⁵
	Glatki čelik	≤100 cfu/mL	0/6	0	0/3	0
		≤1000 cfu/mL	5/6	5.51 x 10 ⁴	5/6	6.40 x 10 ⁵
	Hrapavi čelik	≤100 cfu/mL	3/6	9.75 x 10 ⁴	0/3	0
		≤1000 cfu/mL	5/6	1.30 x 10 ⁵	6/6	1.19 x 10 ⁵

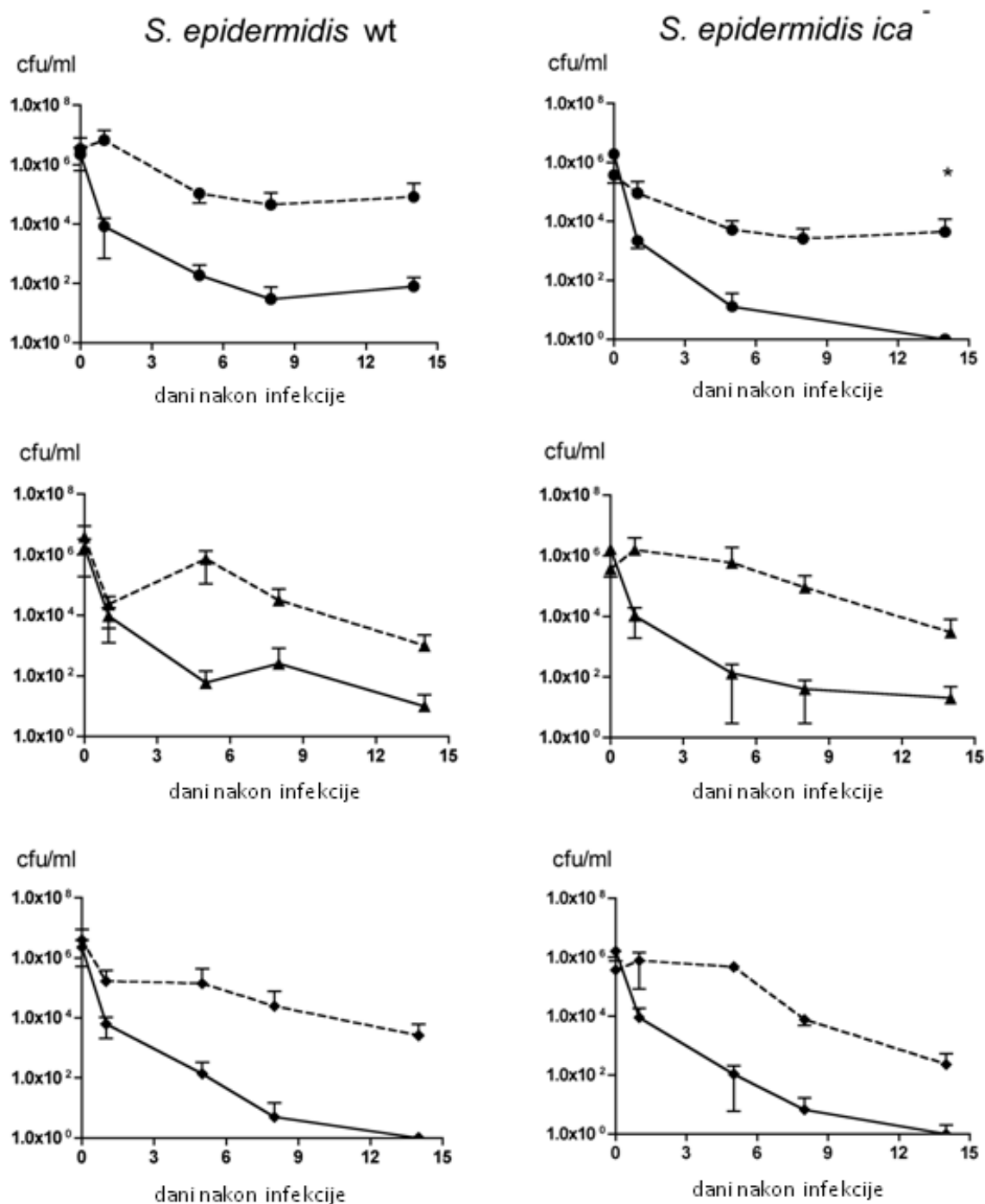
Tablica 10. Adherentni *S.aureus* na implantatima od titanija i čelika ex vivo. Prikazan je odnos inficiranih implantata prema broju inokuliranih miševa biofilm pozitivnim i biofilm negativnim *S.aureus*. Prikazana je i koncentracija *S.aureus* adheriranih za površinu nakon 8 dana infekcije.

10.7. Skroman utjecaj *ica* gena i snažan utjecaj vremena inokulacije na infekciju titanijskih i čeličnih implantata sa *S.epidermidis*

S.epidermidis stvara obilan biofilm in vitro (Slika 33.) i pripada grupi najčešćih uzročnika infekcije implantata[71]. Cilj našeg istraživanja bio je utvrđivanje utjecaja *ica* gena na koncentraciju planktonskih i adherentnih bakterija kod implantata od različitih metala. 10⁴ do 10⁶ biofilm pozitivnih i biofilm negativnih *S.epidermidis* inokulirano je poslijeoperacijski (14 dana) u titanijske i čelične valjke. Za razliku od *S.aureus* bili su potrebni visoki inokulumi

da se izazove infekcija. Inokulacija 10^4 i 10^5 cfu dovela je do vidljive infekcije nakon 8 dana u samo 37% miševa. Čak ni inokulum biofilm pozitivnih *S.epidermidis* od 10^6 cfu nije doveo do pozitivnog nalaza planktonskih bakterija kod hrapavog čelika ili je doveo da jako malih koncentracija ≈ 100 cfu u 50% miševa s titanijskim valjcima i 80% miševa s valjcima od glatkog čelika (Slika 33.). Inokulum biofilm negativnih *S.epidermidis* od 10^6 cfu doveo je do negativnog nalaza planktonskih bakterija nakon 14 dana kod svih titanijskih valjaka i valjaka od hrapavog čelika, u 50% valjaka od glatkog čelika nađene su vrlo male koncentracije planktonskih bakterija (Slika 33.). Kroz cijelo vrijeme praćenja infekcije (14 dana), koncentracija planktonskih *S.epidermidis* nije bila značajno različita između biofilm pozitivnih i biofilm negativnih bakterija. Nakon inokulacije s visokom koncentracijom bakterija, nađena je manja koncentracija biofilm pozitivnih *S.epidermidis* u planktonskom obliku kod titanijskih valjaka te kod valjaka od glatkog čelika neovisno o mogućnosti stvaranja biofilma.

S.epidermidis često dolazi u kontakt s površinama implantata za vrijeme trajanja operacijskog zahvata ili u vrijeme neposredno oko zahvata [140]. Zbog usporedbe perioperacijske i poslijeoperacijske infekcije titanijski i čelični implantati inficirani su istovremeno s ugradnjom s biofilm pozitivnim i biofilm negativnim *S.epidermidis* inokuluma od 10^6 cfu (Slika 33. iscrtkana krivulja). Za razliku od poslijeoperacijske infekcije veće koncentracije planktonskih biofilm pozitivnih i biofilm negativnih bakterija, 10^3 do 10^6 cfu, perzistirale su kod valjaka od sva tri materijala kroz 14 dana. *Ica* geni i stvaranje biofilma utjecali su na tijek perioperacijske infekcije samo kod valjaka od titanija, kod kojih je nađeno značajno manje biofilm negativnih nego biofilm pozitivnih bakterija nakon 14 dana ($p < 0.05$, Slika 33.) . *Ica* gen nije imao utjecaja kod implantata izrađenih od čelika jer su koncentracije planktonskih bakterija bile slične bez obzira da li su inficirani biofilm pozitivnim ili negativnim *S.epidermidis* (Slika 33.).



Slika 33. Koncentracija planktonskih bakterija kod valjaka od titanija (gornji red grafova, simbol ●), glatkog čelika (srednji red grafova, simbol ▲) i hrapavog čelika (donji red grafova, simbol ◆) kroz 14 dana nakon poslijeoperacijske (puna linija) i perioperacijske (iscrtkana linija) infekcije. Prikazane su grupe s inokulumom od 10⁶ cfu biofilm pozitivnih

S.epidermidis (lijevi grafovi) i biofilm negativnih *S.epidermidis* (desni grafovi). Za svaku grupu je prikazana aritmetička sredina svih mjerenja \pm SD.

10.8. Visok omjer adherentnih *S.epidermidis* nakon perioperacijske infekcije kod svih implantata

14 dana nakon poslijeoperacijske infekcije biofilm pozitivnim *S.epidermidis*, nakon što su gotovo sve planktonske bakterije eliminirane, koncentracija adherentnih bakterija bila je oko 10 cfu po implantatu. Omjer pozitivnih adherentnih bakterija prema pozitivnim planktonskim bakterijama bio je 1 prema 4 do 8. Nakon poslijeoperacijske infekcije s biofilm negativnim *S.epidermidis* nisu nađene adherentne bakterije (Tablica 11.)

Za razliku od poslijeoperacijske infekcije, kod perioperacijske infekcije s biofilm pozitivnim i biofilm negativnim *S.epidermidis* kod velikog dijela implantata nađene su adherentne bakterije (60-80%). Koncentracije adherentnih bakterija kretale su se u rasponu od 10^3 do 2×10^4 cfu po implantatu neovisno o materijalu (Tablica 11.). Koncentracije adherentnih bakterija bile su manje kod biofilm negativnih bakterija nego kod biofilm pozitivnih, ali ova razlika nije bila statistički značajna. Adherentne *S.epidermidis* imale su veliki udio od 20 do 75% u ukupnom broju preživjelih (zbroj planktonskih i adherentnih) bakterija oko implantata na 14-ti dan infekcije.

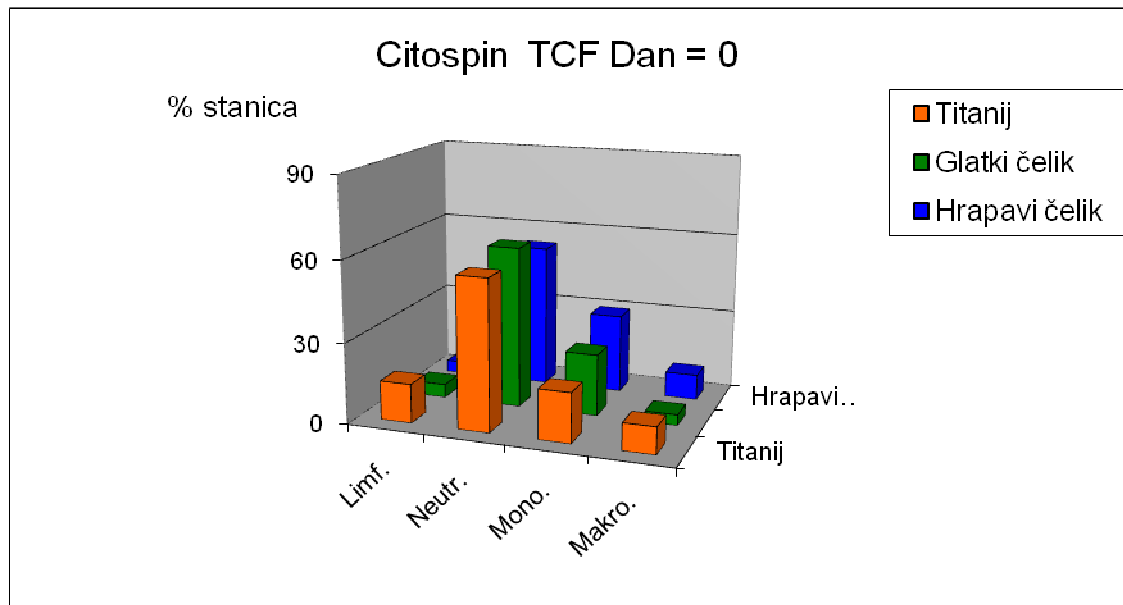
			Biofilm pozitivni / wt		Biofilm negativni / <i>ica</i> ⁻	
Bakterija	Materijal inficiranih valjaka	Vrijeme inokulacije	Inficirani implantati (n)/ Inokulirani miševi (n)	Koncentracija bakterija prosjek cfu/ implantat	Inficirani implantati (n)/ Inokulirani miševi (n)	Koncentracija bakterija prosjek cfu/ implantat
<i>S.epidermidis</i>	Titanij	Poslijeoperacijski ¹	1/8	4.00×10^1	0/3	0
		Perioperacijski	6/6	1.98×10^4	3/5	1.15×10^3
	Glatki čelik	Poslijeoperacijski ¹	1/6	2.00×10^1	0/5	0
		Perioperacijski	3/5	3.00×10^3	3/5	7.33×10^2
	Hrapavi čelik	Poslijeoperacijski ¹	1/4	2.00×10^1	0/8	0
		Perioperacijski	4/5	1.46×10^3	3/5	8.67×10^2

Tablica 11. Adherentni *S.epidermidis* na implantatima od titanija i čelika ex vivo. Prikazan je odnos inficiranih implantata prema broju inokuliranih miševa biofilm pozitivnim i biofilm negativnim *S.epidermidis*. Prikazana je i koncentracija *S.epidermidis* adheriranih za površinu nakon 14 dana infekcije. ¹⁾ Poslijeoperacijska inokulacija znači 14 dana nakon ugradnje implantata.

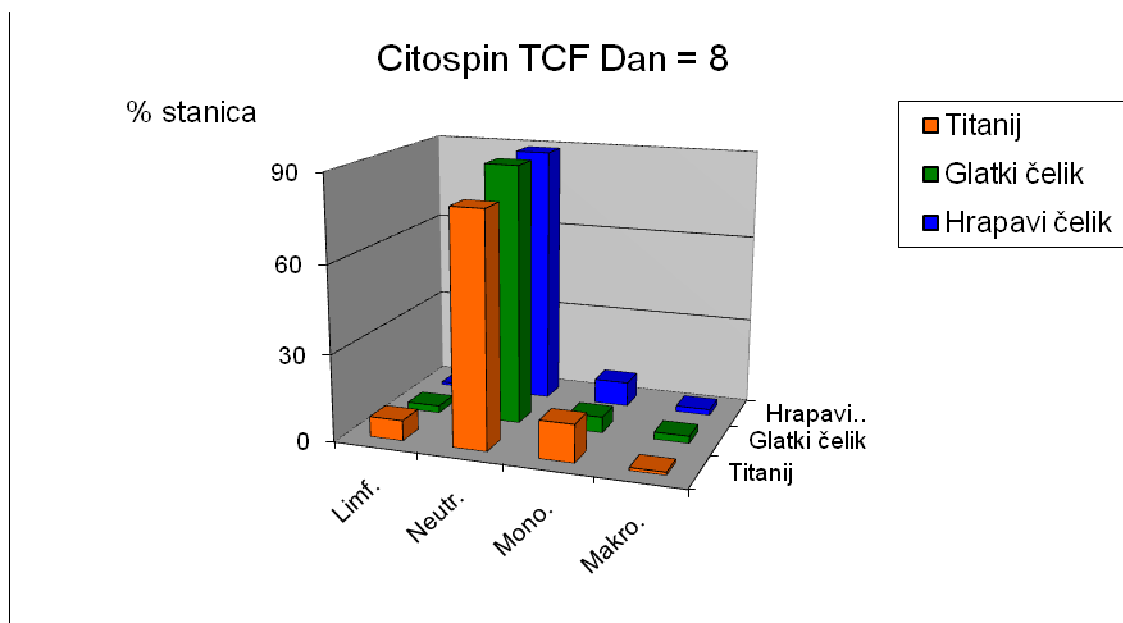
10.9. Infiltracija leukocita i njihovo preživljavanje

Broj leukocita izmjeren na dan inokulacije (14 dana nakon implantacije) u tekućini oko implantata (TCF- „Tissue cage fluid“) bio je u rasponu od 9×10^3 do 2×10^4 stanica/ μ l i porastao je na 2×10^4 do 7×10^4 stanica/ μ l nakon 8 dana infekcije sa *S.aureus*. Biofilm pozitivni i negativni *S.epidermidis* nisu inducirali nikakvo povećanje leukocita kroz 14 dana praćenja. Distribucija leukocita bila je slična kod implantata izrađenih od sva tri materijala. Bazalna distribucija pokazala je 5-14% limfocita, 53-78% polimorfonukleara i 14-38% monocita i makrofaga. Osam dana nakon infekcije udio polimorfonukleara porastao je na 77-89%. Udio

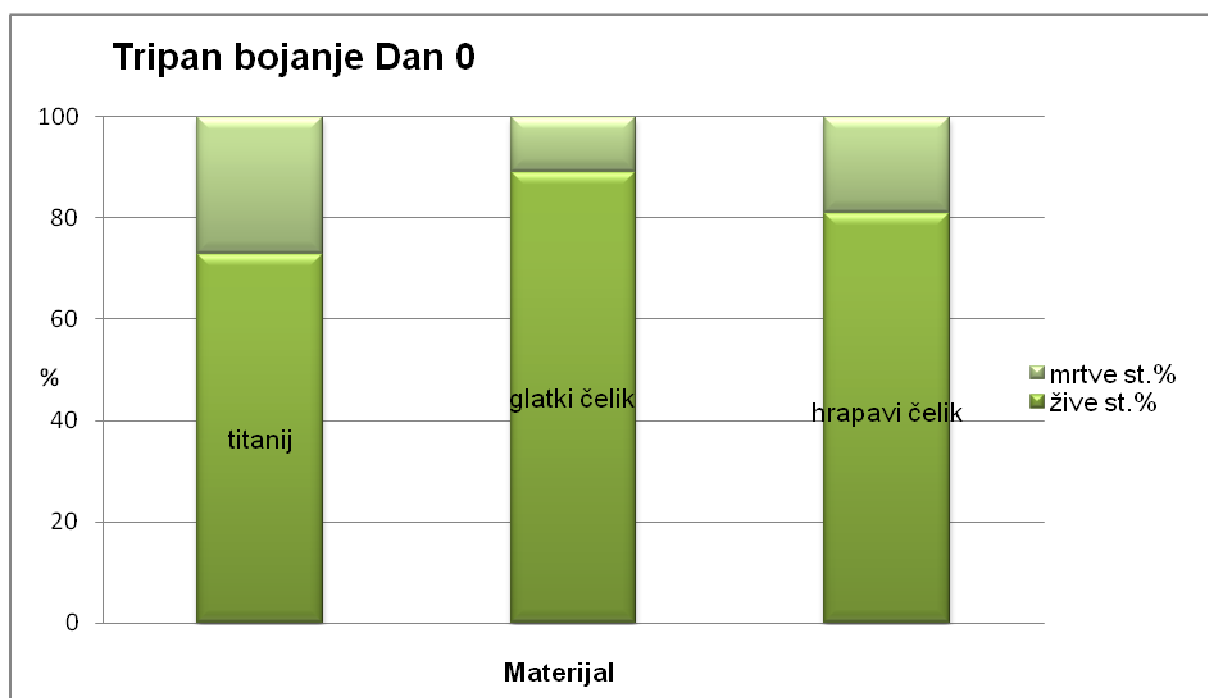
mrtvih leukocita porastao je s 12 na 27% nakon 8 dana i bio je sličan za implantate izrađene od sva tri materijala (Slike 34. i 35.).



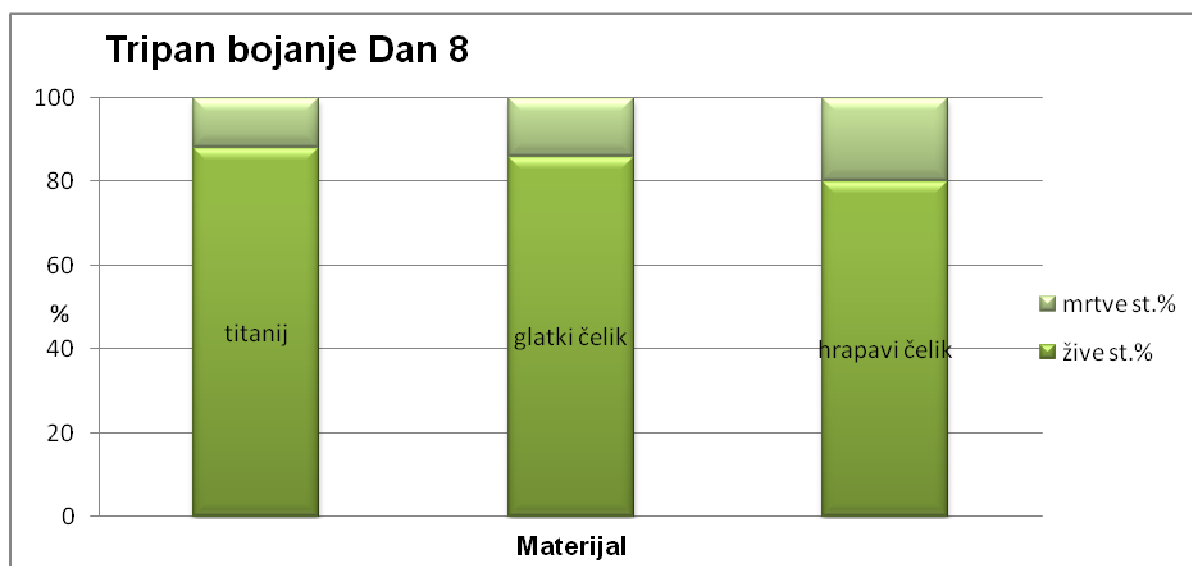
Slika 34. Udio limfocita, neutrofila, monocita i makrofaga na dan kada su implantati inokulirani ovisno u tri različita materijala. Tekućina iz implantata (TCF- tissue cage fluid) aspirirana je prije davanja inokuluma *S.aureusa*.



Slika 35. Udio limfocita, neutrofila, monocita i makrofaga ovisno u tri različita materijala, osmi dan kada su implantati izvađeni iz žrtvovanih životinja. Tekućina iz implantata (TCF- tissue cage fluid) aspirirana je prije žrtvovanja.



Slika 36. Omjer živih i mrtvih stanica na dan kada su implantati inokulirani ovisno u tri različita materijala. Tekućina iz implantata (TCF- tissue cage fluid) aspirirana je prije davanja inokuluma *S.aureusa*



Slika 37. Omjer živih i mrtvih stanica ovisno u tri različita materijala, osmi dan kada su implantati izvađeni iz žrtvovanih životinja. Tekućina iz implantata (TCF- tissue cage fluid) aspirirana je prije žrtvovanja.

11. RASPRAVA

Infekciju ortopedskih implantata najčešće uzrokuju stafilocoki. Infekcija nastaje izlaganjem mjesta ozljede ili operacijskog polja bakterijama s površine kože. Mjesta izloženosti infekciji imaju slabiji kapacitet obrane zbog same traume ili operacijskog zahvata. Na stopu infekcije utječe i materijal koji se koristi za izradu implantata sa svojim svojstvom biokompatibilnosti [141]. Pored membrane i faktora virulencije koje izlučuju stafilocoki, stvaranje biofilma je vrlo važno u patogenezi infekcije implantata. Biofilm omogućava bakterijama da ostanu priljubljene uz površinu i neizložene imunološkom sustavu domaćina unutar matriksa. Uloga biofilma u infekciji implantata proizvedenih od različitih materijala nije u potpunosti razjašnjena. Zbog toga smo ovim istraživanjem pokušali odgovoriti na to pitanje inokulirajući titanijske i čelične implantate *in vitro* i *in vivo*. Obzirom na najveći udio među uzročnicima infekcije za istraživanje smo koristili stafilokoke koji imaju ili nemaju ekspresiju *ica* gena, do danas najpoznatijeg gena za biosintezu biofilma.

Istraživanje je rezultiralo s četiri značajna nalaza: (I) Osjetljivost prema infekciji sa *S.aureus* i *S.epidermidis* bila je jednaka kod implantata izrađenih od titanija i čelika. (II) Velike razlike opažene su u minimalnom inokulumu koji je potreban za izazivanje trajne infekcije kod *S.aureus* i *S.epidermidis*. (III) Vrijeme inokulacije (perioperacijski/poslijeoperacijski) je kod *S.epidermidis* imalo snažan učinak na tijek infekcije pa je kod perioperacijske inokulacije broj planktonskih i adherentnih bakterija bio veći u usporedbi s postoperacijskom inokulacijom. (IV) Prisutnost *ica* gena imala je snažan utjecaj na stvaranje biofilma *in vitro*, međutim samo su manje razlike u tijeku infekcije opažene između biofilm pozitivnih i negativnih bakterija *in vivo*.

U sklopu *in vitro* istraživanja koristili smo se pretražnim elektronskim mikroskopom koji je dao vrlo informativne prikaze stafilokoka. Nažalost, u literaturi nismo našli ocjensku

ljestvicu za morfološke karakteristike bakterija, njihovih nakupina i biofilma pa brojne slike koje su dobivene nisu kvantitativno analizirane.

Pretražni elektronski mikroskop (SEM) i profilometrija otkrili su velike razlike u površinama titanija, glatkog i hrapavog čelika, ali stafilocoki su in vitro pokazali sličan način vezanja za različite površine neovisno o vrsti materijala. Na implantatima proizvedenim od titanija i čelika, biofilm pozitivni *S.aureus* i još više biofilm pozitivni *S.epidremidis* akumulirali su se u višeslojnim nakupinama s vidljivim tvorbama egzopolimera. Biofilm negativne bakterije kojima je nedostajao *ica* gen raspršene su u manjem broju jednoslojnih lanaca po površinama titanija i čelika. Naša opažanja dokumentiraju prethodna istraživanja u kojima je pokazano da su na titaniju nađene veće koncentracije adherentnih biofilm pozitivnih bakterija u usporedbi s biofilm negativnim bakterijama *S.epidermidis* [142, 143]. Nalaz slične formacije biofilma in vitro ponovljen je i u istraživanjima in vivo gdje nisu opažene razlike u infekciji između titanijskih i čeličnih implantata. Ovi su rezultati u suprotnosti s prethodnim istraživanjima koja su provedena na modelu infekcije implantata tibije kod zeca. Spomenuta istraživanja pokazala su manju osjetljivost prema stafilokoknoj infekciji implantata izrađenih od titanija u odnosu na one izrađene od čelika [20, 144, 145]. U ova tri istraživanja bolji rezultati s titanijskim implantatima objašnjeni su većom biokompatibilnosti sa čvrstom adhezijom mekih tkiva [5]. Nasuprot opisanom svojstvu titanija, fibrozna čahura se stvara oko čeličnih implantata i čini mrtvi prostor u kojem se nakuplja tekućina čime nastaje bolja podloga za infekciju [5]. U našem istraživanju implantat nije bio fiksiran za neko čvrsto tkivo, tanka čahura stvorena je oko implantata svih vrsta bez potpore kosti, a bakterije su se nalzile u lumenu valjkastih implantata. Ovaj doktorat izrađen je u sklopu šireg projekta u kojem smo analizirali čahuru stvorenu oko implantata metodom pretražnog elektronskog mikroskopa i metodom kvantitativne analize proteina (kolagen i fibronektin) iz čahure. Ovom analizom nismo našli značajne razlike u građi i sastavu između čahura oko titanijskih i čeličnih

implantata (neobjavljeni rezultati). Ovo bi moglo biti objašnjenje za sličnu osjetljivost prema stvaranju biofilma kod titanija i čelika u našem istraživanju.

Infekcija implantata uzrokovana sa *S.epidermidis* pokazala je znatno različite karakteristike od infekcije izazvane sa *S.aureus*. U prosjeku 100 puta veće koncentracije *S.epidermidis* bile su potrebne za izazivanje trajne infekcije. Ovi rezultati potpuno su u skladu s prethodnim istraživanjem infekcije rešetkastih valjaka izrađenih od teflona [127], gdje je bilo potrebno 200 cfu *S.aureus* i 10^6 cfu *S.epidermidis* za izazivanje trajne infekcije. Zimmerli i sur. pokazali su da leukociti u prisutnosti stranih tijela (implantata) slabije otpuštaju granule i imaju slabije otpuštanje slobodnih radikala kisika kojima uništavaju bakterije [75]. Sukladno tome *S.aureus* koji ima brojne faktore virulentnosti [146] može rasti u valjkastom implantatu i bez stvaranja biofilma, čak i ako je u početku i do 10 puta brojčano nadjačan od leukocita. *S.epidermidis* ima užu spektar faktora virulencije i patogen je samo u prisutnosti stranog tijela. Iz prethodnih istraživanja poznato je da se infekcija sa *S.aureus* nikad spontano ne izliječi, ako traje 8 dana i postigne koncentraciju od 10^8 cfu [147].

U prisutnosti metalnih implantata, u našem istraživanju, koncentracija *S.epidermidis* mjerena u cfu nije rasla nego se stabilizirala na niskim vrijednostima ili čak nije bilo moguće dokazati bakterije. *S.epidermidis* je upadljivo preživio u 100 puta većim koncentracijama ako je bio stavljen u blizinu implantata za vrijeme operacije. Ovu pojavu može objasniti činjenica da kod perioperacijske infekcije implantati nisu još pokriveni proteinima plazme za koje je poznato da smanjuju adherenciju *S.epidermidis* [148]. Osim toga svježe ozlijeđeno tkivo je osjetljivije i nudi bolje uvjete za preživljavanje *S.epidermidis*, od zacijeljenog tkiva 14 dana nakon operacije. Poznato je i iz literature da infekcija sa *S.epidermidis* nastaje perioperacijski, a rijetko naknadno hematogenim putem [140].

Naše istraživanje pokazalo je da na adheziju i višeslojno okupljanje bakterija na titaniju i čeliku utječe biofilm, značajno više u uvjetima in vitro nego in vivo. Učinak *ica*

gena bio je slabije izražen kod *S.aureus* infekcije, gdje kod manjih inokuluma nije bilo moguće dokazati planktonske bakterije nakon 8 dana, ali je nađen manji broj adherentnih biofilm pozitivnih bakterija. Ovo se može objasniti kroz prethodno opisanu slabiju RNA ekspresiju *ica* gena i slabiju proizvodnju PIA od *S.aureus* bakterija [127]. Ova opažanja sukladna su s prethodno objavljenim rezultatima istraživanja u kojem je utjecaj *ica* gena na pojačavanje virulencije bio vidljiv u kompetitivnoj infekciji između biofilm pozitivnih i negativnih bakterija [127]. Za *S.epidermidis* je poznato da ima jaču *ica* RNA ekspresiju i proizvodnju PIA, međutim koncentracije planktonskih i adherentnih cfu su bile samo malo više nakon infekcije biofilm pozitivnim nego biofilm negativnim bakterijama. Utjecaj biofilma bio je značajan samo kod implantata proizvedenih od titanija.

Ovi rezultati snažno upućuju na postojanje drugih gena važnih za stvaranje biofilma, a koji nisu povezani s *ica* lokusom [9]. Proteini koji su opisani za *S.aureus* uključuju protein povezan s biofilmom iz bovinog mastitisa [149] i površinski protein G (SasG) koji pokreću proteolitičke procese za stvaranje biofilma. Pored ova dva proteina otkriveni su i neidentificirane proteaza-osjetljive molekule [150] kao i druge ključne strukturne komponente biofilma kao teikoična kiselina i otpuštena DNA [151, 152]. Zanimljivo da se za gen(*cidA*) koji kontrolira lizu stanica i omogućava ekstracelularnu akumulaciju DNA pokazalo da potiče stvaranje biofilma [152]. U odsutnosti dvokomponentnog sistema, primjećeno je stvaranje biofilma neovisno o *ica* genima, pospješeno *arlRS* [153] ili *agr* [154] genima. Otkriveno je da regulator gen *sarA* pospješuje stvaranje biofilma pojačavajući učinak *ica* gena [155]. Kompleksnost biofilma pokazana je microarray analizom *S.aureus* u protočnoj komori pri čemu je otkriveno 580 različitih gena između planktonskih i adherentnih bakterija [155]. Otkrivena je i grupa gena koji su uključeni u stvaranje biofilma i regulaciju *ica* lokusa [156]. Kod *S.epidermidis* nađen je „protein povezan s akumulacijom“ (engl. „accumulation associated protein“) kod endoprotetskih implantata i njihovog biofilma [157]. In vivo

kolonizacija i invazija *S.epidermidis* praćena je ekspresijom razlićitih gena pa je tako *ica* gen važan za inicijalnu adheziju ali ne i za održavanje postojećeg biofilma [158].

Utjecaj spomenutih *ica*-neovisnih gena na stvaranje biofilma kod *S.aureus*113 i *S.epidermidis*1457 nije razjašnjen na modelu upotrebljenom u ovom istraživanju pa to tek treba istražiti.

Na kraju, rezultati ovog istraživanja pokazuju da vrsta biomaterijala nije presudna za osjetljivost prema stafilokoknoj infekciji i za njezino trajanje u prisutnosti implantata. *S.aureus* je izazvao trajnu infekciju s vrlo malim inokulumom neovisno o stvaranju biofilma. *S.epidermidis* je izazvao infekciju samo ako je do implantata doveden veliki inokulum za vrijeme operacije, a biofilm kodiran *ica* genom je slabo doprinosa adheziji bakterija.

12. ZAKLJUČAK

Temeljna hipoteza ovog rada je da je biofilm najznačajni faktor u razvoju stafilokokne infekcije oko implantata. Ova se hipoteza nije uspjela dokazati u potpunosti. Mogućnost stvaranja biofilma posredstvom *ica* gena pokazala se iznimno važna za stafilokoknu infekciju in vitro. Biofilm pozitivne bakterije stvarale su značajno veće nakupine u više slojeva analizirane raster elektronskim mikroskopom. *S.epidermidis* pokazao je posebno vidljivu razliku između biofilm pozitivnih i negativnih sojeva in vitro. U usporedbi s vrstom materijala koji je korišten za izradu implantata mogućnost stvaranja biofilma pokazala se značajno važnijim faktorom u istraživanjima in vitro (Slike 29. i 30.) .

Model „tissue cage“ infekcije na mišu pokazao je manji doprinos biofilma razvoju infekcije od in vitro istraživanja. Kod in vivo istraživanja pratili smo koncentracije planktonskih i adherentnih bakterija. *S.aureus* je pokazao jednako visoke koncentracije planktonskih biofilm pozitivnih i negativnih bakterija nakon poslijeoperacijske infekcije titanijskih i čeličnih valjaka. U ovom dijelu istraživanja jedini značajni faktor za razvoj trajne infekcije bila je koncentracija bakterija u inokulumu. Nakon u prosjeku 300 cfu razvijala se trajna bakterijska infekcija sa sličnim koncentracijama planktonskih bakterija neovisno o materijalu implantata i biofilmu. Model in vivo pokazao je male koncentracije adherentnih biofilm pozitivnih i negativnih *S.aureus* na valjcima od titanija i čelika. Međutim s manjim inokulumima pokazalo se da kod titanija i hrapavog čelika biofilm ima važnu ulogu za pojavljivanje i koncentraciju adherentnih bakterija (Tablica 10.).

Infekcija titanijskih i čeličnih implantata sa *S.epidermidis* in vivo, pokazala je značajnu ovisnost o vremenu inokulacije za razliku od skromne ovisnosti o *ica* genima. *S.epidermidis* dolazi često u kontakt s implantatima za vrijeme trajanja operacijskog zahvata pa smo uspoređivali perioperacijsku i poslijeoperacijsku infekciju. Rezultati su pokazali da vrijeme inokulacije utječe na razvoj infekcije značajnije od mogućnosti stvaranja biofilma i

vrste materijala za izradu implantata. Veće koncentracije planktonskih bakterija postigle su se kod inokulacije implantata istovremeno s operacijom ugradnje za razliku od inokulacije 14 dana nakon operacije ugradnje.

Model „tissue cage“ infekcije na mišu pokazao se pogodnim za usporedbu tri različita materijala. Do ovog istraživanja na mišu je provedeno samo istraživanje s valjcima od teflona. Tijekom izvođenja pokusa na životinjama vrlo malen broj bio je isključen zbog ravoja opsežnog apscesa ili zbog smrti. Podaci koji su dobiveni analizom kolagena i fibronektina iz čahure koja je stvorena oko implantata različiti su za pojedine materijale što govori u prilog različite reakcije na određene materijale. Ovaj dio istraživanja nije prezentiran u sklopu ove doktorske disertacije.

Ostali ciljevi ovog istraživanja ispunjeni su i detaljno objašnjeni u rezultatima.

13. SAŽETAK

Najveći značaj u stvaranju stafilokoknog biofilma pridaje se *ica* genu. Utjecaj stvaranja biofilma na osjetljivost različitih implantata prema stafilokoknoj infekciji nije potpuno jasan. Interakcija biofilm pozitivnih i biofilm negativnih *S.aureus* i *S.epidermidis* s površinama titanija, glatkog te hrapavog čelika proučavana je in vitro i in vivo. Korišten je „tissue cage“ model na mišu za perioperacijsku i poslijeoperacijsku inokulaciju pored inokulacije u in vitro uvjetima i proučavanja morfologije biofilma na površinama implantata pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa.

Biofilm pozitivni *S.epidermidis* adherirao je jednako ili snažnije za površine svih implantata od biofilm pozitivnog *S.aureus*. Biofilm pozitivni stafilokoki pokazali su višeslojni biofilm. 300 cfu (jedinica koje tvore kolonije) biofilm pozitivnih i negativnih *S.aureus* izazvalo je infekciju s visokim koncentracijama planktonskih bakterija nakon 8 dana in vivo, pri čemu je samo 0,89% ukupnih bakterija bilo adherentno. Za izazivanje poslijeoperacijske infekcije sa *S.epidermidis* bilo je potreban inokulum od 10^6 cfu, kod svih vrsta implantata koncentracija planktonskih bakterija pala je ispod 100 cfu, a adherentne bakterije bile su niskih koncentracija kod biofilm pozitivnih *S.epidermidis* i odsutne kod biofilm negativnih. Perioperacijska inokulacija rezultirala je višim koncentracijama planktonskih bakterija od poslijeoperacijske inokulacije, kod titanijskih implantata adherentne bakterije bile su u većoj koncentraciji nakon inokulacije biofilm pozitivnim sojem od biofilm negativnog soja. Vrsta metala slabo je utjecala na osjetljivost prema stafilokoknoj infekciji. Postojanje *ica* gena imalo je snažan utjecaj in vitro i slab utjecaj in vivo. *S.epidermidis* pokazao se patogenijim kada je inokuliran za vrijeme implantacije nego kada je inokuliran nakon implantacije.

14. SUMMARY

Effect of biofilm production on staphylococcal infection around titanium and steel implants, Damir Hudetz, 2009

Today *ica* is considered the major operon responsible for staphylococcal biofilm. The effect of biofilm on susceptibility to staphylococcal infection of different implant materials *in vivo* is unclear. The interaction of *ica*-positive (wild type, [wt]) and *ica*-negative *Staphylococcus (S.) aureus* and *S. epidermidis* strains with titanium, smooth and rough stainless steel surfaces was studied by scanning electron microscopy *in vitro* and in a subcutaneous mouse tissue cage model during 2 weeks following peri- or post-operative inoculation *in vivo*.

In vitro *S. epidermidis* wt adhered equally and more strongly than *S. aureus* wt to all materials. Wt but not *ica*⁻ strains of both species showed multilayered biofilm. *In vivo* 300 cfu wt and *ica*⁻ *S. aureus* led in all metal cages to an infection with high numbers of planktonic bacteria after 8 days; only 0.89 % of total wt and *ica*⁻ *S. aureus* were adherent. In contrast, for postoperative infection with *S. epidermidis* 10⁶ cfu of the wt and *ica*⁻ strain were required; in all metal types planktonic bacterial numbers dropped to <100 cfu, adherent cfu were low in wt- and absent in *ica*⁻-infected cages after 14 days. Perioperative inoculation resulted in slower clearance than postoperative inoculation and in titanium cages adherent wt bacteria survived in higher numbers than *ica*⁻ bacteria. In conclusion, the metal played a minor role regarding susceptibility to and persistence of staphylococcal infection; the presence of *ica* genes had a strong effect on biofilm *in vitro* and a weak effect *in vivo*; and *S. epidermidis* was more pathogenic when introduced during than after implantation.

15. LITERATURA

1. Ruedi TP and Murphy WM, *AO Principles of Fracture Management*. 2000, Stuttgart, New York: Thieme. 882.
2. Solomon, L., D. Warwick, and S. Nayagam, *Apley's System of Orthopaedics and Fractures*. 8th ed. 2001, London: Arnold. 781.
3. Darouiche RO, *Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(9): p. 1567-72.
4. Gristina AG, Naylor P, and Myrvik Q, *Infections from biomaterials and implants: a race for the surface*. Med Prog Technol, 1988. **14**(3-4): p. 205-24.
5. Gristina AG, *Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration*. Science., 1987. **237**(4822): p. 1588-95.
6. Schlegel U and Perren SM, *Surgical aspects of infection involving osteosynthesis implants: implant design and resistance to local infection*. Injury., 2006. **37**(Suppl 2): p. S67-73.
7. Costerton JW, Montanaro L, and Arciola CR, *Biofilm in implant infections: its production and regulation*. Int J Artif Organs, 2005. **28**(11): p. 1062-8.
8. Harris LG and Richards RG, *Staphylococci and implant surfaces: a review*. Injury., 2006. **37**(Suppl 2): p. S3-14.
9. Gotz F, *Staphylococcus and biofilms*. Mol Microbiol, 2002. **43**(6): p. 1367-78.
10. Trampuz A, et al., *Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection*. Clin Orthop Relat Res, 2003(414): p. 69-88.
11. Klenerman, L., ed. *The Evolution of Orthopaedic Surgery*. 2002, Royal Society of Medicine Press Ltd London. 252.
12. Singer C and Ashwort Underwood E, *A Short History of Medicine*. 1962, Oxford: Clarendon. 351.
13. Wangsteen OH and Wangsteen SO, *The Rise of Surgery*. 1978, Folkestone: Wm Dawson & Sons.
14. Pećina M, *Ortopedija*. 3. ed. 2004, Zagreb: Naklada Ljevak. 454.
15. Perren SM, Cordey J, and Baumgart F, *Technical and biomechanical aspects of screws used for bone surgery*. International ournal of Orthopaedic Trauma, 1992. **2**: p. 31-48.
16. Cameron HU, *The technique of total hip arthroplasty. Prosthesis selection*. 1992., Toronto: Mosby. 409.
17. Kurtz, S.M. and P.S. Walker, *How have new designs and new types of joint replacement influenced wear behavior?* J Am Acad Orthop Surg, 2008. **16 Suppl 1**: p. S107-10.
18. Hawkins ME, *Development of Polymers for Minimally Invasive Orthopedic Implants*, in *Graduate School of the University of Notre Dame*. 2005, University of Notre Dame: Notre Dame, Indiana. p. 122.
19. Melcher, G.A., et al., *Influence of type of medullary nail on the development of local infection. An experimental study of solid and slotted nails in rabbits*. J Bone Joint Surg Br, 1994. **76**(6): p. 955-9.
20. Arens S, et al., *Influence of materials for fixation implants on local infection. An experimental study of steel versus titanium DCP in rabbits*. J Bone Joint Surg Br, 1996. **78**(4): p. 647-51.

21. Chang, C.C. and K. Merritt, *Infection at the site of implanted materials with and without preadhered bacteria*. J Orthop Res, 1994. **12**(4): p. 526-31.
22. Perren, S.M., *The concept of biological plating using the limited contact-dynamic compression plate (LC-DCP)*. Scientific background, design and application. Injury, 1991. **22 Suppl 1**: p. 1-41.
23. Meredith, D.O., et al., *Human fibroblast reactions to standard and electropolished titanium and Ti-6Al-7Nb, and electropolished stainless steel*. J Biomed Mater Res A, 2005. **75**(3): p. 541-55.
24. Delmi, M., et al., *Role of fibronectin in staphylococcal adhesion to metallic surfaces used as models of orthopaedic devices*. J Orthop Res, 1994. **12**(3): p. 432-8.
25. Ha, K.Y., Y.G. Chung, and S.J. Ryoo, *Adherence and biofilm formation of Staphylococcus epidermidis and Mycobacterium tuberculosis on various spinal implants*. Spine, 2005. **30**(1): p. 38-43.
26. Gracia, E., et al., *Adherence of Staphylococcus aureus slime-producing strain variants to biomaterials used in orthopaedic surgery*. Int Orthop, 1997. **21**(1): p. 46-51.
27. Lange, R., et al., *Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material*. Biomol Eng, 2002. **19**(2-6): p. 255-61.
28. Harris, L.G., et al., *Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers*. Biomaterials, 2004. **25**(18): p. 4135-48.
29. Quirynen, M. and C.M. Bollen, *The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature*. J Clin Periodontol, 1995. **22**(1): p. 1-14.
30. Harris, L.G. and R.G. Richards, *Staphylococcus aureus adhesion to different treated titanium surfaces*. J Mater Sci Mater Med, 2004. **15**(4): p. 311-4.
31. Koerner, R.J., et al., *Bacterial adhesion to titanium-oxy-nitride (TiNOX) coatings with different resistivities: a novel approach for the development of biomaterials*. Biomaterials, 2002. **23**(14): p. 2835-40.
32. Cyster, L.A., et al., *The effect of surface chemistry and nanotopography of titanium nitride (TiN) films on 3T3-L1 fibroblasts*. J Biomed Mater Res A, 2003. **67**(1): p. 138-47.
33. Groessner-Schreiber, B., et al., *Fibroblast growth on surface-modified dental implants: an in vitro study*. J Biomed Mater Res A, 2003. **64**(4): p. 591-9.
34. Nagaoka, S. and H. Kawakami, *Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation by a heparinized hydrophilic polymer*. Asaio J, 1995. **41**(3): p. M365-8.
35. Galliani, S., et al., *Early adhesion of bacteremic strains of Staphylococcus epidermidis to polystyrene: influence of hydrophobicity, slime production, plasma, albumin, fibrinogen, and fibronectin*. J Lab Clin Med, 1994. **123**(5): p. 685-92.
36. Kinnari, T.J., et al., *Bacterial adherence to titanium surface coated with human serum albumin*. Otol Neurotol, 2005. **26**(3): p. 380-4.
37. Mori, Y., et al., *A new antithrombogenic material with long polyethyleneoxide chains*. Trans Am Soc Artif Intern Organs, 1982. **28**: p. 459-63.
38. Ruiz, L., et al., *Phosphorylcholine-containing polyurethanes for the control of protein adsorption and cell attachment via photoimmobilized laminin oligopeptides*. J Biomater Sci Polym Ed, 1999. **10**(9): p. 931-55.
39. Pascual, A., et al., *Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to Teflon catheters in vitro*. Eur J Clin Microbiol, 1986. **5**(5): p. 518-22.

40. Dexter, S.J., et al., *A comparison of the adhesion of mammalian cells and Staphylococcus epidermidis on fibronectin-modified polymer surfaces*. J Biomed Mater Res, 2001. **56**(2): p. 222-7.
41. Tosatti, S., et al., *Peptide functionalized poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) on titanium: resistance to protein adsorption in full heparinized human blood plasma*. Biomaterials, 2003. **24**(27): p. 4949-58.
42. Park, K.D., et al., *Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces*. Biomaterials, 1998. **19**(7-9): p. 851-9.
43. Desai, N.P., S.F. Hossainy, and J.A. Hubbell, *Surface-immobilized polyethylene oxide for bacterial repellence*. Biomaterials, 1992. **13**(7): p. 417-20.
44. Pavesio, A., et al., *Anti-adhesive surfaces through hyaluronan coatings*. Med Device Technol, 1997. **8**(7): p. 20-1, 24-7.
45. Duran, L.W., *Preventing medical device related infections*. Med Device Technol, 2000. **11**(6): p. 14-7.
46. Calhoun, J.H. and J.T. Mader, *Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant*. Clin Orthop Relat Res, 1997(341): p. 206-14.
47. Garvin, K.L., et al., *Poly lactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model*. J Bone Joint Surg Am, 1994. **76**(10): p. 1500-6.
48. Leach, W.J. and N.I. Wilson, *Trends in infection prophylaxis in orthopaedics*. J R Coll Surg Edinb, 1992. **37**(4): p. 265-6.
49. Makinen, T.J., et al., *Efficacy of bioabsorbable antibiotic containing bone screw in the prevention of biomaterial-related infection due to Staphylococcus aureus*. Bone, 2005. **36**(2): p. 292-9.
50. Price, J.S., et al., *Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants*. J Biomed Mater Res, 1996. **30**(3): p. 281-6.
51. Gollwitzer, H., et al., *Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(3): p. 585-91.
52. Lucke, M., et al., *Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats*. Bone, 2003. **32**(5): p. 521-31.
53. Davies, R., N. Holt, and S. Nayagam, *The care of pin sites with external fixation*. J Bone Joint Surg Br, 2005. **87**(5): p. 716-9.
54. DeJong, E.S., et al., *Antimicrobial efficacy of external fixator pins coated with a lipid stabilized hydroxyapatite/chlorhexidine complex to prevent pin tract infection in a goat model*. J Trauma, 2001. **50**(6): p. 1008-14.
55. Sanchez, I.R., et al., *Chlorhexidine diacetate and povidone-iodine cytotoxicity to canine embryonic fibroblasts and Staphylococcus aureus*. Vet Surg, 1988. **17**(4): p. 182-5.
56. Zhao, G. and S.E. Stevens, Jr., *Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion*. Biometals, 1998. **11**(1): p. 27-32.
57. Simonetti, N., et al., *Electrochemical Ag+ for preservative use*. Appl Environ Microbiol, 1992. **58**(12): p. 3834-6.
58. Bosetti, M., et al., *Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity*. Biomaterials, 2002. **23**(3): p. 887-92.
59. Balazs, D.J., et al., *Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments*. Biomaterials, 2004. **25**(11): p. 2139-51.
60. Wassall, M.A., et al., *Adhesion of bacteria to stainless steel and silver-coated orthopedic external fixation pins*. J Biomed Mater Res, 1997. **36**(3): p. 325-30.

61. Alt, V., et al., *An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement*. *Biomaterials*, 2004. **25**(18): p. 4383-91.
62. Masse, A., et al., *Prevention of pin track infection in external fixation with silver coated pins: clinical and microbiological results*. *J Biomed Mater Res*, 2000. **53**(5): p. 600-4.
63. Kraft, C.N., et al., *Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel*. *J Biomed Mater Res*, 2000. **49**(2): p. 192-9.
64. Knobben BA, et al., *Transfer of bacteria between biomaterials surfaces in the operating room-An experimental study*. *J Biomed Mater Res A.*, 2006. **80A**(4): p. 790-799.
65. Gelfer, Y., et al., *Symptomatic transient patellar ischemia following total knee replacement as detected by scintigraphy. A prospective, randomized, double-blind study comparing the mid-vastus to the medial para-patellar approach*. *Knee*, 2003. **10**(4): p. 341-5.
66. Williams DF, *Implantable materials and infection*. *Injury*, 1996. **27 Suppl 3**: p. SC1-4.
67. Barnes, S., et al., *An enhanced benchmark for prosthetic joint replacement infection rates*. *Am J Infect Control*, 2006. **34**(10): p. 669-72.
68. Weisglass H, *Medicinska bakteriologija*. 3rd ed. Biblioteka udžbenici i priručnici Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 1994, Zagreb: Medicinska naklada. 264.
69. Kalmeijer, M.D., et al., *Nasal carriage of Staphylococcus aureus is a major risk factor for surgical-site infections in orthopedic surgery*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2000. **21**(5): p. 319-23.
70. Waldvogel FA and Bisno AL, *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*. 3rd ed ed. *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*, ed. W. FA and B. AL. 2000, Washington, D.C.: ASM Press. 436.
71. Trampuz A, Gilomen A, and Fluckiger U. *Treatment outcome of infections associated with internal fixation devices: Results from a 5-year retrospective study (1999-2003)*. in *45th ICAAC*. 2005. Washington, DC: American Society for Microbiology.
72. Donlan, R.M., *Biofilms: microbial life on surfaces*. *Emerg Infect Dis*, 2002. **8**(9): p. 881-90.
73. Stewart, P.S. and J.W. Costerton, *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. *Lancet*, 2001. **358**(9276): p. 135-8.
74. Zimmerli W, et al., *Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model*. *J Infect Dis.*, 1982. **146**(4): p. 487-97.
75. Zimmerli, W., P.D. Lew, and F.A. Waldvogel, *Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect*. *J Clin Invest*, 1984. **73**(4): p. 1191-200.
76. Arens, S., et al., *Infection after open reduction and internal fixation with dynamic compression plates--clinical and experimental data*. *Injury*, 1996. **27 Suppl 3**: p. SC27-33.
77. Arens, S., et al., *Susceptibility to local infection in biological internal fixation. Experimental study of open vs minimally invasive plate osteosynthesis in rabbits*. *Arch Orthop Trauma Surg*, 1999. **119**(1-2): p. 82-5.
78. Benson, D.R., et al., *Treatment of open fractures: a prospective study*. *J Trauma*, 1983. **23**(1): p. 25-30.
79. Law, M.D., Jr. and R.E. Stein, *Late infection in healed fractures after open reduction and internal fixation*. *Orthop Rev*, 1993. **22**(5): p. 545-52.
80. Boelens, J.J., et al., *Biomaterial-associated persistence of Staphylococcus epidermidis in pericatheter macrophages*. *J Infect Dis*, 2000. **181**(4): p. 1337-49.

81. Gustilo, R.B., R.P. Gruninger, and T. Davis, *Classification of type III (severe) open fractures relative to treatment and results*. Orthopedics, 1987. **10**(12): p. 1781-8.
82. Leutenegger, A.F., [*Acute infection following osteosynthesis*]. Ther Umsch, 1990. **47**(7): p. 593-6.
83. Willenegger, H. and B. Roth, [*Treatment tactics and late results in early infection following osteosynthesis*]. Unfallchirurgie, 1986. **12**(5): p. 241-6.
84. Gustilo, R.B., R.L. Merkow, and D. Templeman, *The management of open fractures*. J Bone Joint Surg Am, 1990. **72**(2): p. 299-304.
85. Zych, G.A. and J.J. Hutson, Jr., *Diagnosis and management of infection after tibial intramedullary nailing*. Clin Orthop Relat Res, 1995(315): p. 153-62.
86. Murdoch, D.R., et al., *Infection of orthopedic prostheses after Staphylococcus aureus bacteremia*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(4): p. 647-9.
87. Trampuz, A. and W. Zimmerli, *Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices*. Injury, 2006. **37 Suppl 2**: p. S59-66.
88. Jaeger, M., et al., *Antibiotics in trauma and orthopedic surgery -- a primer of evidence-based recommendations*. Injury, 2006. **37 Suppl 2**: p. S74-80.
89. Spangehl, M.J., et al., *Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties*. J Bone Joint Surg Am, 1999. **81**(5): p. 672-83.
90. Widmer, A.F., *New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants*. Clin Infect Dis, 2001. **33 Suppl 2**: p. S94-106.
91. Tunney, M.M., et al., *Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(10): p. 3281-90.
92. Trampuz, A., et al., *Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(2): p. 628-31.
93. Trampuz, A., et al., *Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection*. Clin Orthop Relat Res, 2003(414): p. 69-88.
94. Schiesser, M., et al., *Detection of metallic implant-associated infections with FDG PET in patients with trauma: correlation with microbiologic results*. Radiology, 2003. **226**(2): p. 391-8.
95. Beck, A., L. Kinzl, and M. Bischoff, [*Antibiotic prophylaxis and therapy in trauma surgery*]. Unfallchirurg, 1999. **102**(12): p. 955-66.
96. (SIGN), S.I.G.N. *Antibiotic prophylaxis in surgery*. 2008 [cited 2008 13 December 2008]; Available from: <http://www.sign.ac.uk/guidelines/fulltext/104/index.html>.
97. Gillespie, W.J. and G. Walenkamp, *Antibiotic prophylaxis for surgery for proximal femoral and other closed long bone fractures*. Cochrane Database Syst Rev, 2001(1): p. CD000244.
98. Suedkamp, N.P., et al., *The incidence of osteitis in open fractures: an analysis of 948 open fractures (a review of the Hannover experience)*. J Orthop Trauma, 1993. **7**(5): p. 473-82.
99. EAST Practice management guidelines work group. *Practice management guidelines for prophylactic antibiotic use in open fractures*. 2005 [cited 2005 August 31, 2005, 11:00]; Available from: <http://www.east.org/tpg/openfrac.pdf>.
100. Gosselin, R.A., I. Roberts, and W.J. Gillespie, *Antibiotics for preventing infection in open limb fractures*. Cochrane Database Syst Rev, 2004(1): p. CD003764.
101. Zimmerli, W., *Tissue cage infection model*. Handbook of animal model infection, ed. O. Zak and M. Sande. 1999, San Diego: Academic Press. 409-17.

102. Vaudaux, P.E., et al., *Attachment of Staphylococcus aureus to polymethylmethacrylate increases its resistance to phagocytosis in foreign body infection*. Infect Immun, 1985. **50**(2): p. 472-7.
103. Barth, E., et al., *In vitro and in vivo comparative colonization of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis on orthopaedic implant materials*. Biomaterials, 1989. **10**(5): p. 325-8.
104. von Eiff, C., R.A. Proctor, and G. Peters, *Coagulase-negative staphylococci. Pathogens have major role in nosocomial infections*. Postgrad Med, 2001. **110**(4): p. 63-4, 69-70, 73-6.
105. Petty, W., et al., *The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model*. J Bone Joint Surg Am, 1985. **67**(8): p. 1236-44.
106. Kloos, W.E. and M.S. Musselwhite, *Distribution and persistence of Staphylococcus and Micrococcus species and other aerobic bacteria on human skin*. Appl Microbiol, 1975. **30**(3): p. 381-5.
107. Howard, B.J. and W.E. Kloos, *Staphylococci*, in *Clinical and Pathogenic Microbiology*, B.J. Howard, I.J. Klass, and S.J. Rubin, Editors. 1987, The CV Mosby Co: St Louis, Mo. p. 231-244.
108. Elek, S.D., *Experimental staphylococcal infections in the skin of man*. Ann N Y Acad Sci, 1956. **65**(3): p. 85-90.
109. *Surveillance of surgical site infection - in English hospitals 1997-1999*. 2000, Central Public Health Laboratory
UK.
110. Hiramatsu, K., *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: a new model of antibiotic resistance*. Lancet Infect Dis, 2001. **1**(3): p. 147-55.
111. Morris, A., J.D. Kellner, and D.E. Low, *The superbugs: evolution, dissemination and fitness*. Curr Opin Microbiol, 1998. **1**(5): p. 524-9.
112. Kloos, W.E. and D.W. Lambe, *Staphylococcus*, in *Manual of Clinical Microbiology*, A. Barlows, W.J. Hausler, and K.L. Herrmann, Editors. 1991, ASM: Washington DC. p. 222-237.
113. Vuong, C. and M. Otto, *Staphylococcus epidermidis infections*. Microbes Infect, 2002. **4**(4): p. 481-9.
114. Johnson, A.P., C. Henwood, and S. Mushtaq, *Susceptibility of Gram-positive bacteria from ICU patients in UK hospitals to antimicrobial agents*. J Hosp Infect, 2003. **4**(4): p. 481-489.
115. von Eiff, C., G. Peters, and C. Heilmann, *Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci*. Lancet Infect Dis, 2002. **2**(11): p. 677-85.
116. Brotz, H. and H.G. Sahl, *New insights into the mechanism of action of lantibiotics--diverse biological effects by binding to the same molecular target*. J Antimicrob Chemother, 2000. **46**(1): p. 1-6.
117. Kocianova, S., et al., *Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of Staphylococcus epidermidis*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 688-94.
118. Lappin-Scott, H.M., J.W. Costerton, and J. Lynch, *Microbial Biofilms*. 2003, Cambridge: Cambridge University Press. 324.
119. Heilmann, C., et al., *Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol, 1996. **20**(5): p. 1083-91.
120. Mack, D., et al., *Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of Staphylococcus epidermidis in hemagglutination*. Infect Immun, 1999. **67**(2): p. 1004-8.

121. Vuong, C., et al., *A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence.* J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54881-6.
122. Rupp ME, et al., *Characterization of the importance of Staphylococcus epidermidis autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model.* J Infect Dis, 2001. **183**(7): p. 1038-42.
123. Rupp ME, et al., *Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of Staphylococcus epidermidis in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model.* Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2627-32.
124. Rupp ME, et al., *Characterization of Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model.* Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2656-9.
125. Buxton TB, et al., *Low-dose infectivity of Staphylococcus aureus (SMH strain) in traumatized rat tibiae provides a model for studying early events in contaminated bone injuries.* Comp Med., 2005. **55**(2): p. 123-8.
126. Kristian SA, et al., *The ability of biofilm formation does not influence virulence of Staphylococcus aureus and host response in a mouse tissue cage infection model.* Microb Pathog, 2004. **36**(5): p. 237-45.
127. Fluckiger U, et al., *Biofilm formation, icaADBC transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model.* Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1811-9.
128. Baier, R.E., et al., *Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results.* J Biomed Mater Res, 1984. **18**(4): p. 327-55.
129. Bauer, J.S., et al., *Motility of fibronectin receptor-deficient cells on fibronectin and vitronectin: collaborative interactions among integrins.* J Cell Biol, 1992. **116**(2): p. 477-87.
130. Francois, P., et al., *Host-bacteria interactions in foreign body infections.* Infect Control Hosp Epidemiol, 1996. **17**(8): p. 514-20.
131. Patti, J.M. and M. Hook, *Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules.* Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(5): p. 752-8.
132. Galdbart, J.O., et al., *Screening for Staphylococcus epidermidis markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses.* J Infect Dis, 2000. **182**(1): p. 351-5.
133. Herrmann, M., et al., *Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material.* J Infect Dis, 1988. **158**(4): p. 693-701.
134. Hussain, M., et al., *Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of Staphylococcus aureus with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins.* J Bacteriol, 2001. **183**(23): p. 6778-86.
135. Darouiche, R.O., et al., *Role of Staphylococcus aureus surface adhesins in orthopaedic device infections: are results model-dependent?* J Med Microbiol, 1997. **46**(1): p. 75-9.
136. Greene, C., et al., *Adhesion properties of mutants of Staphylococcus aureus defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of fnb genes.* Mol Microbiol, 1995. **17**(6): p. 1143-52.
137. Iordanescu S and Surdeanu M, *Two restriction and modification systems in Staphylococcus aureus NCTC8325.* J Gen Microbiol, 1976. **96**(2): p. 277-81.

138. Dawson J, et al., *Interleukin-1 (IL-1) production in a mouse tissue chamber model of inflammation. I. Development and initial characterisation of the model.* Agents Actions, 1993. **38**(3-4): p. 247-54.
139. Dayer E, et al., *Quantitation of retroviral gp70 antigen, autoantibodies, and immune complexes in extravascular space in arthritic MRL-lpr/lpr mice. Use of a subcutaneously implanted tissue cage model.* Arthritis Rheum, 1987. **30**(11): p. 1274-82.
140. Zimmerli, W., A. Trampuz, and P.E. Ochsner, *Prosthetic-joint infections.* N Engl J Med, 2004. **351**(16): p. 1645-54.
141. Vaudaux, P., D.P. Lew, and F.A. Waldvogel, *Host factors predisposing to and influencing therapy of foreign body infections*, in *Infections associated with indwelling devices*, F.A. Waldvogel and A.L. Bisno, Editors. 2000, ASM press: Washington DC. p. 1-27.
142. Konig, D.P., et al., *Slime production of Staphylococcus epidermidis: increased bacterial adherence and accumulation onto pure titanium.* Acta Orthop Scand, 1998. **69**(5): p. 523-6.
143. Olson, M.E., et al., *Adherence of Staphylococcus epidermidis to biomaterials is augmented by PIA.* Clin Orthop Relat Res, 2006. **451**: p. 21-4.
144. Sheehan, E., et al., *Adhesion of Staphylococcus to orthopaedic metals, an in vivo study.* J Orthop Res, 2004. **22**(1): p. 39-43.
145. Melcher, G.A., et al., *Infection after intramedullary nailing: an experimental investigation on rabbits.* Injury, 1996. **27 Suppl 3**: p. SC23-6.
146. Nizet, V., *Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets.* J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(1): p. 13-22.
147. Kristian SA, et al., *Alanylation of teichoic acids protects Staphylococcus aureus against Toll-like receptor 2-dependent host defense in a mouse tissue cage infection model.* J Infect Dis., 2003. **188**(3): p. 414-23. Epub 2003 Jul 10.
148. Muller, E., et al., *Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative staphylococci to biomaterials.* Infect Immun, 1991. **59**(9): p. 3323-6.
149. Cucarella, C., et al., *Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation.* J Bacteriol, 2001. **183**(9): p. 2888-96.
150. Sadovskaia, I., et al., *Carbohydrate-containing components of biofilms produced in vitro by some staphylococcal strains related to orthopaedic prosthesis infections.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **47**(1): p. 75-82.
151. Vinogradov, E., et al., *Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of Staphylococcus aureus MN8m, a biofilm forming strain.* Carbohydr Res, 2006. **341**(6): p. 738-43.
152. Rice, K.C., et al., *The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in Staphylococcus aureus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 8113-8.
153. Toledo-Arana, A., et al., *Staphylococcus aureus develops an alternative, ica-independent biofilm in the absence of the arlRS two-component system.* J Bacteriol, 2005. **187**(15): p. 5318-29.
154. Vuong, C., et al., *Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in Staphylococcus aureus.* J Infect Dis, 2000. **182**(6): p. 1688-93.
155. Beenken, K.E., et al., *Global gene expression in Staphylococcus aureus biofilms.* J Bacteriol, 2004. **186**(14): p. 4665-84.
156. Tu Quoc, P.H., et al., *Isolation and characterization of biofilm formation-defective mutants of Staphylococcus aureus.* Infect Immun, 2007. **75**(3): p. 1079-88.

157. Rohde, H., et al., *Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus isolated from prosthetic hip and knee joint infections*. *Biomaterials*, 2007. **28**(9): p. 1711-20.
158. Vandecasteele, S.J., et al., *Reliability of the ica, aap and atlE genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant Staphylococcus epidermidis isolates in the diagnosis of catheter-related infections*. *Clin Microbiol Infect*, 2003. **9**(2): p. 114-9.

16. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME: Damir Hudetz

DATUM ROĐENJA: 10.07.1972.

MJESTO ROĐENJA: Zagreb, Hrvatska

NACIONALNOST: Hrvat

DRŽAVLJANSTVO: Hrvatsko

OBITELJ: Supruga Sonja Uršić Hudetz

OBRAZOVANJE: 03/2008 obranio temu doktorske disertacije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
10/2005 položio specijalistički ispit iz ortopedije
10/2002-4/2003 Kantonsspital Bruderholz, Basel, Švicarska - stipendija švicarske državne komisije za stipendije
7/2000 položio državni ispit za doktore medicine
1998/1999 Upisao znanstveni poslijediplomski studij Biomedicina na Medicinskom fakultetu u Zagrebu
1991.-1998. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
1987,1988. ELCO , English language and cultural organization, Rickmansworth, Engleska pohađao i završio ljetni tečaj engleskog jezika
1987.-1991. Srednja škola – MIOC «Vladimir Popović» (XV Gimnazija) – Zagreb
1979.-1987. Osnovna škola Mlinarska ulica, Zagreb

RADNO ISKUSTVO: 06/2007- zaposlen u Klinici za traumatologiju Zagreb kao specijalist ortopedije
05/2006-05/2007 radio u Klinici za ortopediju Bruderholz, Basel, Švicarska, istovremeno radio u Istraživačkom centru Sveučilišne bolnice u Baselu, Švicarska
2005.- zaposlen u Klinici za traumatologiju Zagreb kao specijalist ortopedije
2001-2005 zaposlen u Klinici za traumatologiju Zagreb kao liječnik na specijalizaciji iz ortopedije
2000 liječnik u ambulanti vojarne u Požegi
1998.-1999. Obavezni pripravnički staž za doktore medicine u Klinici za traumatologiju
1994.-2001. vodio poslove trgovačkog društva HUNO-SPORT d.o.o. kao direktor

DODATNA STRUČNA EDUKACIJA: 2008. hospitacija u Ortopedskoj Klinici ATOS, Heidelberg, Njemačka

2005. tečaj specijalnih artroskopskih tehnika, Surgical skill center Miami, SAD

2004. AO osnovni tečaj Portorož, Slovenija

2003. osnovni tečaj za artroskopiju AGA (Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie), Arosa, Švicarska

1997. Praksa u Klinici za ortopediju Health and science center University of Texas, San Antonio, SAD

1996. Praksa u Sveučilišnoj klinici za ortopediju Heidelberg, Njemačka

STRANI JEZICI: Engleski, Njemački, Francuski

PUBLIKACIJE: autor ili koautor 6 znanstvenih radova, od čega 2 rada u CC časopisu, 1 u međunarodno indeksiranom časopisu i 3 u recenziranim časopisima, 11 međunarodna kongresna priopćenja i 9 domaćih kongresnih priopćenja