

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav laboratorní diagnostiky FNKV



Stanislava Hyttychová

Infekční komplikace totálních endoprotéz

Infectious complications of prosthetic devices

Bakalářská práce

Praha, květen 2016

Autor práce: Stanislava Hyttychová

Studijní program: Veřejné zdravotnictví

Bakalářský studijní obor: Specializace ve zdravotnictví

Vedoucí práce: MUDr. Filip Prusík

Pracoviště vedoucího práce: Ústav laboratorní diagnostiky FNKV

Předpokládaný termín obhajoby: červen 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Infekční komplikace totálních endoprotéz vypracovala samostatně s použitím odborné literatury, pramenů a dalších odborných zdrojů, které jsou uvedeny v seznamu literatury a tvoří přílohu této práce. Současně dávám svolení k tomu, aby má bakalářská práce byla používána ke studijním účelům.

Prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do Studijního informačního systému – SIS 3. LF UK jsou totožné.

V Praze dne 11. května 2016

.....
Stanislava Hyttychová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé práce, MUDr. Filipu Prusíkovi z mikrobiologie v ÚLD FNKV za odborné vedení bakalářské práce, za mnohé cenné rady a pomoci s vyhledáním odborné literatury. Současně děkuji lékařům z Ortopedicko-traumatologické kliniky FNKV, za výbornou spolupráci. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině a svým spolupracovníkům za velkou podporu.

Obsah

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	<i>Aloplastika</i>	9
2.2	<i>Kloubní infekce</i>	9
2.2.1	<i>Riziko infekčních komplikací.....</i>	9
2.2.2	<i>Klinická diagnostika infekcí kloubních náhrad</i>	11
2.2.3	<i>Klasifikace kloubních infekcí</i>	12
2.2.4	<i>Původci infekcí kloubních náhrad</i>	14
2.2.5	<i>Význam implantovaného materiálu při vzniku infekce</i>	14
2.3	<i>Mikrobiální biofilm</i>	16
2.3.1	<i>Biofilm.....</i>	16
2.3.2	<i>Tvorba biofilmu.....</i>	16
2.3.3	<i>Význam biofilmu v patogenezi</i>	18
2.4	<i>Mikrobiologická diagnostika infekcí TEP</i>	19
2.4.1	<i>Metody rozvolnění mikrobiálního biofilmu.....</i>	20
3	CÍLE PRÁCE.....	21
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1	<i>Materiál.....</i>	22
4.1.1	<i>Soubor pacientů</i>	22
4.1.2	<i>Chemikálie a komerční sady</i>	24
4.1.3	<i>Kultivační média</i>	24
4.1.4	<i>Přístroje</i>	25
4.1.5	<i>Roztoky.....</i>	25
4.1.6	<i>Spotřební materiál</i>	25
4.2	<i>Metodika.....</i>	26
4.2.1	<i>Odběr vzorků a transport.....</i>	26
4.2.2	<i>Zpracování vzorků</i>	26
4.2.3	<i>Hodnocení nálezu a identifikace mikroorganismů</i>	28
4.2.4	<i>Hodnocení nálezu.....</i>	28
4.2.5	<i>Fenotypová identifikace</i>	29
5	VÝSLEDKY	31
5.1	<i>Výsledky kultivací.....</i>	31

5.2	<i>Zhodnocení výsledků kultivace</i>	40
6	DISKUZE	42
7	ZÁVĚR	45
8	SOUHRN	46
9	SUMMARY	47
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48
11	SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ, GRAFŮ	53

1 Úvod

V dnešní době pokročilých lékařských věd je na prvním místě snaha zachovat lidskou populaci co nejdéle v dobré fyzické i psychické kondici. Jedním z problémů, už nejen u starších osob, je demineralizace kostí a snížená plasticita kloubních pouzder. Rozšiřující se artróza a bolestivost při pohybu nejsou již doménou pacientů v důchodovém věku, ale čím dál tím mladších osob. K tomuto trendu přispívá mnoho faktorů, a to od špatné životosprávy přes sedavá zaměstnání, až po úrazy. Konečným řešením těchto komplikací, které negativně ovlivňují kvalitu života pacienta, může být nahrazení poškozené kloubní části nebo kloubu celého endoprotézou.

V současné době infekce představují jednu z nejzávažnějších komplikací endoprotéz. Pro pacienty jsou tyto infekční komplikace velmi závažným problémem, který snižuje samotnou životnost endoprotézy. V souvislosti s dlouhodobou terapií znamená infekce pro pacienty vysokou psychickou zátěž a v neposlední řadě je může i ohrožovat na životě. Léčba infekcí totálních endoprotéz je velice komplikovaná, zdlouhavá a finančně náročná. V konečném důsledku těchto infekčních komplikací navíc dochází u většiny pacientů k reimplantaci endoprotézy.

Důvodem neúspěšné léčby infekce kloubní náhrady je vznik bakteriálního biofilmu, který se tvoří na povrchu cizorodého materiálu. Formace mikroorganismů do biofilmu totiž způsobuje zvýšenou rezistenci k antimikrobiálním látkám.

Pro úspěšnou antibiotickou léčbu je velmi důležité správně a rychle identifikovat infekční agens a stanovit jeho citlivost k antibiotikům, nejen kvůli zahájení správné a cílené antibiotické léčby, ale i k eliminaci zvyšování rezistence mikroorganismů.

I samotná identifikace etiologického agens je problematická právě kvůli vzniku bakteriálního biofilmu. Mikrobiologická kultivace kloubního punktátu z takto postižené náhrady bývá často negativní. Bakterie tvořící biofilm se nemusejí uvolňovat do synoviální tekutiny, a tím nedojde při kultivaci k jejich záchytu. Z tohoto důvodu dochází při klasické mikrobiologické kultivaci

protetické pomůcky k falešně negativním výsledkům. Velký počet těchto infekcí tak zůstává nerozpoznán, a tím pádem i jejich léčba není cílená a plně účinná.

Pro správnou identifikaci a léčbu je nutné mechanické uvolnění biofilmu z povrchu náhrad. Jako jednou z vhodných metod pro rozvolnění bakteriálního biofilmu z protetické pomůcky byla v literatuře popsána metoda užití ultrazvukových vln, tzv. sonikace.

Tato práce vznikala ve spolupráci s Ortopedicko-traumatologickou klinikou fakultní nemocnice Královské Vinohrady, která přebírá k léčbě pacienty s komplikacemi po operacích kloubních náhrad, a tedy i nemocné s infekcí kloubní náhrady, z různých částí republiky. Cílem této práce bylo ověření vyššího záchytu bakteriálních původců infekcí kloubních náhrad metodou sonikace. Získané výsledky mají pomoci zlepšit diagnostiku infekcí ortopedických implantátů, a tím přispět k optimální a vhodné terapii těchto závažných komplikací v této nemocnici.

2 Teoretická část

2.1 Alopastika

Alopastika, je operace, při níž je nahrazen celý kloub nebo pouze jeho část cizím materiálem – kloubní náhradou (endoprotézou). Cílem této operace je obnovit u poškozeného kloubu jeho funkčnost, odstranit bolest a navrátit tak pacienta zpět do aktivního života [1].

Alopastika patří mezi nejčastější ortopedické operace, které se u nás provádí. Hojně se nahrazuje kloub kyčelní a kolenní, ale stejně tak se může provést alopastika kteréhokoliv kloubu v těle, například endoprotéza ramene, zápěstí, hlezna. Lze nahradit pouze hlavici kloubu, pak se jedná o cervikokapitální endoprotézu nebo jde o totální endoprotézu (TEP), kdy se nahradí hlavice i jamka kloubu. Ukázka implantátů se nachází na Obr. 1. Z důvodu zjednodušení jsou v následujícím textu pod pojmem TEP zahrnuty oba typy implantátů. [2].

Obecně lze předpokládat, že přibývající počet alopastik koresponduje se zvyšujícím se věkem populace. Jelikož se k alopastice přistupuje i u pacientů s nižším věkem, lze očekávat, že nárůst pacientů indikovaných k reoperaci z důvodu infekčních komplikací bude v dnešní době stoupat [3].

Obr. 1 Totální endoprotéza kyčle a kolena



2.2 Kloubní infekce

2.2.1 Riziko infekčních komplikací

Náhrada kolenního a kyčelního kloubu patří mezi nejčastěji prováděné plánované operace v ortopedické praxi. Jako každá jiná operace i tento zákrok představuje pro pacienta značné riziko. U alopastik hrozí mimo jiné i nebezpečí

vzniku infekčních komplikací, a to buď v přímé souvislosti s operací, následným pobytem v nemocnici nebo může dojít k tzv. pozdní infekci, tedy rozvoji infekce až po uplynutí delší doby od provedené operace [4].

V počátcích těchto ortopedických operací byl výskyt infekčních komplikací u náhrady kyčelního kloubu až 9 %, jak uvádí studie provedená v roce 1989 na 190 pacientech. V dnešní době je prevalence hluboké infekce snížena na všeobecně udávané 1 - 2 %. Toto výrazné snížení je způsobeno hlavně díky důkladné přípravě pacientů, zavedení supersterilních sálů a speciálnímu režimu při zákrocích. Velkou zásluhu má i preventivní podávání antibiotik a lepší operační technika. U reimplantací se díky složitosti a rozsáhlému výkonu riziko infekce zvyšuje na cca 4 - 12 %. Toto vysoké procento infekčních komplikací může být způsobeno výskytem nerozpoznaných mitigovaných infekcí u aseptického uvolnění endoprotéz [5].

Na vznik periprotetické infekce má vliv řada různých faktorů jak ze strany pacienta, operační rány, operační techniky, prostředí operačního sálu, druhu použitého implantovaného materiálu, tak i mikrobiální charakteristika infekčního agens. Obecně platí, že významným rizikovým faktorem pro rozvinutí infekce je samotná přítomnost kloubní náhrady. Každého pacienta s endoprotézou provází velmi vysoké riziko této infekční komplikace. Rizikové faktory ze strany pacienta můžeme rozdělit na **celkové** a **lokální** [6].

2.2.1.1 Rizikové faktory celkové

Za celkové rizikové faktory jsou považovány všechny stavy, které ovlivňují imunitní reakci organismu na bakteriální infekci a mají tak vliv na vznik místního infekčního ložiska, které se hematogenní cestou může roznést do organismu. Mezi tyto stavy jsou zahrnuty veškeré přidružené nemoci i v předchorobí. Za vysoké riziko infekce u pacientů se považuje stav, kdy je v anamnéze uvedena septická artritida daného kloubu nebo erysipel (onemocnění růže) na dolní končetině. Za významnou kontraindikaci k operaci je považována například chronická osteomyelitida (vysoké riziko rozsevu infekce krevní cestou). Nezanedbatelnými celkovými rizikovými faktory jsou výživové návyky pacienta, a to jak malnutrice, tak i obezita. Dále hrají významnou roli

alkoholismus, diabetes mellitus, chronický defekt imunity, tumory, stav po transplantaci ledvin, opakované infekce urogenitálního traktu nebo současná léčba imunosupresivy a kortikoidy [5,6].

2.2.1.2 Rizikové faktory lokální

Mezi lokální rizikové faktory se řadí veškerá předchozí poškození místa, kde se nachází implantovaná endoprotéza. Hlavně stav měkkých tkání a kostního lůžka v místě implantace. Mezi lokální faktory usnadňující bakteriální kolonizaci patří dále například zhoršené prokrvení končetiny, přítomnost jizev nebo avitálních tkání [5,6].

2.2.2 Klinická diagnostika infekcí kloubních náhrad

Stejně, jako v kterémkoliv jiném lékařském oboru je základem při stanovení diagnózy hluboké infekce kloubní náhrady anamnéza a klinické vyšetření. Hlavní problém ke vzniku pozdního stanovení správné diagnózy je právě v mysli lékaře, který ve snaze vyhnout se invazivní léčbě hromadí různá pomocná vyšetření a zaplétá se tak do diferenciálních diagnóz s protichůdnými výsledky. Vždy ale platí, že právě včasná diagnostika, přiznání si dané situace a rozhodné řešení jsou jedinou cestou k vymýcení vzniklé infekce a zachování tak dobře fungující končetiny [7].

Pro stanovení správné diagnózy je potřebná podrobná znalost anamnestických dat: kdy k implantaci došlo, jestli se jednalo o revizi nebo o primoimplantaci, o jaký typ implantátu se jedná, zdali byl použit kostní cement s antibiotiky, jaký se použil typ prevence infekce kloubní náhrady a zdali nedošlo ke špatnému hojení rány v pooperačním období. Bolest a změna funkce jsou nejvýznamnějšími symptomy infekce kloubní náhrady. Vytvoření píštěle je velmi specifickým příznakem hluboké infekce [8].

Pro určení diagnózy infekční selhání TEP se provádí rentgen a různá laboratorní vyšetření (mikrobiologická, hematologická, biochemická i histologická). Z hematologických vyšetření se jedná hlavně o vyšetření hladiny sedimentace erytrocytů (FW) a stanovení počtu leukocytů. Při infekci TEP stoupá hladina FW nad 35 mm/hod. Bohužel FW stoupá i u mechanického uvolnění TEP

a mírně zvýšené hodnoty bývají i u artrózy. Zjištění hladiny leukocytů nám neposkytne jednoznačný výsledek o známce probíhající infekce, protože k jejich vzestupu dochází pouze u 15 % pacientů. Daleko větší význam má biochemické vyšetření hladiny C-reaktivního proteinu (CRP). Hladina CRP bývá při infekci TEP u 95 % pacientů vyšší než 20 mg/l. Při operaci se odebírá kloubní punktát, stěry a tkáň z oblasti TEP, které se odesílají na mikrobiologické vyšetření ke kultivaci. Vzorek tkáně se odesílá i na histologické vyšetření, kde se po zalití do parafinu zhotoví mikroskopický preparát barvený hematoxylinem-eosinem a hodnotí se zde známky infekce [9, 10].

Stále není shoda názorů mezi ortopedy, mikrobiology a infektology, jak má vypadat definitivní důkaz o probíhající infekci kloubní náhrady. Jsou případy jasných známek infekce, jako je například nález hnisavého výpotku při punkci nebo vícečetný nález pozitivních kultivací. Mnoho infekcí endoprotéz se ale projevuje pouze izolovanou bolestí kloubu nebo selháním náhrady. S pomocí anamnézy a klinického vyšetření lze infekci dále klasifikovat podle vstupu etiologického agens a časových kritérií [7].

2.2.3 Klasifikace kloubních infekcí

Důvodem infekčního uvolnění kloubní náhrady je přítomnost a působení mikroorganismů na povrchu endoprotézy i v jejím okolí. Klasické rozdělení infekce kloubní náhrady je na **povrchovou** a **hlubokou**. Při infekčních komplikacích jsou pro správnou klasifikaci důležité dva faktory: cesta kontaminace mikroorganismem a doba od operace k rozvoji infekce. Nejčastěji používané rozdělení septického uvolnění je podle Coventryho na: **infekci časnou, mitigovanou a pozdní-hematogenní** [11, 12].

Typ I. časná infekce: objevuje se v bezprostředním pooperačním období, v prvním, nejpozději druhém měsíci od operace a nejčastěji po vysazení antibiotik. Tuto infekci způsobují vysoce virulentní kmeny. Diagnostika je zde bezproblémová na základě klinického vyšetření a anamnézy. Jedná se o akutní stav s vážným rozvojem systémových známek infekce. Na počátku jsou přítomné večerní teplotní špičky, které přecházejí v přetrvávající horečky. Lokálně nalézáme zarudnutí, otok, zduření, zvýšenou teplotu a výraznou bolest, která

se nesnižuje. V kloubu je přítomna patologická náplň, případně hnisavá sekrece. U tohoto typu infekce nabývá rychlá diagnostika velký význam. Při okamžitém zahájení léčby může být kloubní náhrada zachráněná [13, 14].

Typ II. mitigovaná infekce: je zapříčiněna inokulací málo virulentního kmene během operace. Z důvodu nízké virulence nebo malého množství mikroorganismů se příznaky infekce projeví postupně. Přibližně za půl roku až rok od operace se začne objevovat omezení funkce a bolestivost kloubu. V anamnéze jsou zjištěny pooperační komplikace typu zhoršeného hojení operační rány, zvýšené sekrece a teploty. Velmi typickým anamnestickým nálezem je přítomnost bolestivé, nedostatečné funkce endoprotézy. Pacient uvádí, že od operace se vyskytují mírné bolesti kloubu s nevyhovující funkcí implantátu. Léčba pouhým debridementem (odstranění nekrotických částí tkání) při zachování náhrady se jeví u tohoto typu infekce jako nedostačující [14].

Typ III. pozdní–hematogenní infekce: je způsobena zánětem do té doby zdravého kloubu. Vzniká po dlouhém období bezchybné funkce endoprotézy, většinou dva a více let od operace. Po náhlém febrilním stavu zde dochází k omezení funkce kloubu, bolesti, lokálnímu zarudnutí, teplotě a zduření. Bakterie se dostávají z primárního infekčního ložiska do kloubu krevní cestou a závažnost infekce závisí na jejich virulenci. Za velké riziko jsou zde považovány stomatochirurgické a endoskopické výkony, opakované intravenózní podání léků, kožní poranění, infekce respiračního a urogenitálního traktu. Z důvodu vzniku hematogenní infekce kloubní náhrady se doporučuje u pacientů s endoprotézou před invazivním zákrokem, který způsobuje bakteriémií (přítomnost bakterií v krvi), antibiotická prevence. Vysoké riziko vzniku této infekce je zejména u imunosupresovaných pacientů po transplantaci orgánů nebo u zánětlivých arthropatií [13,14].

Oproti tomu Fitzgerald rozděluje infekci pouze podle časového aspektu na infekt časný (1–2 měsíce od operace), střednědobý (2–24 měsíců od operace) a pozdní (déle než 2 roky od operace). Gristina používá podobné rozdělení jako Fitzgerald, ale udává jiné časové intervaly vzniku infekce od operace, jsou to: akutní (1–3 měsíce), subakutní (4–24 měsíců) a pozdní infekce (12 měsíců

a více). Estrada a Tsukayana rozděluje infekci na časnou (do měsíce od operace), pozdní (déle než měsíc od operace) a hematogenní (akutně bez časového omezení). Klasifikace typu infekce je určitým vodítkem ke vhodné terapii a umožňuje nám zlepšit preventivní opatření [12].

2.2.4 Původci infekcí kloubních náhrad

Mezi nejčastější bakteriální původce způsobující infekční komplikace TEP se řadí gram pozitivní koky, zejména *Staphylococcus aureus*, koaguláza negativní stafylokoky a dále i bakterie z rodu *Streptococcus* a *Enterococcus* [15, 16].

Dříve se při výskytu koaguláza negativních stafylokoků výsledek hodnotil jako kožní kontaminace. V dnešní době, při jejich stále častějším výskytu je jejich důležitost jakožto nebezpečného původce infekcí kloubních implantátů již plně akceptována [15, 16].

Mezi původce infekcí TEP se řadí kromě gram pozitivních koků i gram negativní tyčinky. Z nefermentujících bakterií je to nejčastěji *Pseudomonas aeruginosa*. Z bakterií patřících do čeledi *Enterobacteriaceae* pak *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia marcescens* a další. Mohou se vyskytovat i anaerobní bakterie, zejména *Propionibacterium acnes* a anaerobní streptokoky. Většina původců těchto bakteriálních infekcí je součástí tzv. biofilmu, který je pro bakterie velmi důležitý zejména pro jejich přežití [15, 16].

2.2.5 Význam implantovaného materiálu při vzniku infekce

V dnešní době má ortoped k dispozici velké množství variant ortopedických implantátů. Volba druhu implantátu závisí na mnoha faktorech, počínaje věkem a celkovým stavem pacienta a konče finančními možnostmi kliniky. Design ortopedických implantátů je navržen s ohledem na správnou funkci, modularitu a jednoduchou implantaci. Podle typu materiálu lze endoprotézy rozdělit na cementové (polymethylakrylátové) a bezcementové [17, 18].

Materiály, které jsou použité k výrobě endoprotéz, mohou narušovat funkci imunitního systému a nést i další rizika pro pacienta, například kovové

materiály jsou cytotoxické. Polymetylmetakrylát (kostní cement) byl prokázán jako inhibitor aktivace komplementu, dále redukuje motilitu polymorfonukleárů, fagocytózu a intracelulární lýzu bakterií. Kobalt a nikl porušuje buněčnou stěnu makrofágů a redukuje fagocytózu [17, 19].

Existují experimentální studie, které prokazují, že některé materiály použité pro výrobu endoprotéz, jsou infikovány snadněji a rychleji než ostatní druhy materiálů. Například, polymetylmetakrylát je daleko snadněji infikován bakteriemi *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli* než nerezavějící ocel, chromkobaltové slitiny či polyetylen. Pokusem na králičím modelu bylo potvrzeno, že kostní cement může být infikován 4,5× menším inokulem bakterie *Staphylococcus aureus* než je potřeba pro rozvoj infekce u titanového implantátu. Výše uvedené negativní vlastnosti se mohou eliminovat užitím spaceru z kostního cementu s antibiotikem. U polymetylmetakrylátu s gentamicinem je pro vznik infekce potřeba inokulum bakterie *Staphylococcus aureus* s 60× vyšší koncentrací než u čistého polymetylmetakrylátu [17, 19]

Bezcementové implantáty, které nepotřebují přítomnost polymetylmetakrylátu, jsou opatřeny porézním povrchem, který je snadněji infikován než povrchy hladké. Bakterie se dostanou v tekutém prostředí k povrchu implantátu dřív než tkáňové buňky, vyplní porézní povrch implantátu a začnou formovat biofilm. Hojné nerovnosti porézního povrchu usnadňují mikroorganismům dobře se udržet a znemožňují tak přístup antibiotik a imunitnímu systému. Výraznou roli hraje biokompatibilita. Tkáňové buňky snadněji vyhrávají „závod o povrch“ u titanových slitin než u chromkobaltových implantátů [17].

Ačkoliv bakterie za přítomnosti porézního povrchu vítězí v závodu o povrch daleko snadněji, dosavadní výsledky nám ukazují, že negativní vliv kostního cementu je klíčový a výskyt infekčních komplikací je u bezcementových implantátů značně nižší [20].

Kolonizace různých druhů implantátu je závislá i na bakteriálním druhu. *Staphylococcus aureus* častěji infikuje krystalické struktury jako kovy či kost, oproti tomu *Staphylococcus epidermidis* přednostně infikuje polymery jako

například polymethylmetakrylát. Polyetylen, který je semikrystalický, je infikován oběma shodně [21].

2.3 Mikrobiální biofilm

2.3.1 Biofilm

Již počátkem dvacátého století byla popsána u mořských mikroorganismů schopnost tvořit společenstva na pevném povrchu. Později bylo toto společenství nazváno biofilm. Po dlouhou dobu se mikrobiologové snažili zkoumat chování a vlastnosti vypěstovaných bakterií v podobě suspenzí nebo kolonií čistých kultur, zatímco pro bakterie je přirozené se vyskytovat právě v podobě biofilmu. Fyziologické vlastnosti a chování bakterií v biofilmu jsou zcela odlišné od planktonických forem, což způsobuje i některé obtížně řešitelné problémy. Biofilm poskytuje bakteriím ochranu nejen proti buňkám imunitního systému, ale také proti celé řadě antibakteriálních látek i vůči řadě fyzikálních a chemických vlivů vnějšího prostředí [22]. Chronické infekce a zvláště pak infekce implantovaných pomůcek, tento předpoklad dokládají. Například běžná antimikrobiální terapie u těchto infekcí může selhávat, i když bakterie vypěstované in vitro se jeví jako citlivé. Terapie antibiotiky zde mívá pouze dočasný efekt, po jejich vysazení se infekce vrací a mohou přetrvávat i léta, dokud příslušný implantát, katétr či chronické infekční ložisko nejsou odstraněny [23, 24].

2.3.2 Tvorba biofilmu

Biofilm je tvořený na inertních i živých površích, které jsou ve styku s živým médiem. Jedná se o komplexní strukturu bakterií a extracelulárních polymerních substancí (EPS) [22]. Biofilm je odvěkou a nedílnou formou existence bakterií a jejich strategií pro přežití. Tvoří ho celkové společenství mikroorganismů, které je umístěné v organické polymerové matrix s vodními kanálky, přimykající se k různým přírodním či syntetickým povrchům, jak v běžném prostředí, tak i v organismu [24, 25].

Tvorba biofilmu prochází fázovým cyklem. Před samotnou tvorbou biofilmu je nejprve nutná přítomnost planktonické formy bakterie v okolí.

Planktonická forma bakterií se dostává do místa vzniku biofilmu pomocí Brownova pohybu, volným prouděním tekutiny nebo chemotaktickými mechanismy. První fáze tvorby biofilmu je adherence buněk na povrchu. Adherence probíhá pomocí fimbrií, bičků či adhezivních molekul [22].

Po přilnutí mikroorganismů k povrchu nastupuje fáze akumulace, kdy bakteriálním množením dochází ke vzniku agregátů neboli mikrokolonií. Poté buňky začnou produkovat EPS, který je tvořený polysacharidy, peptidy, proteiny, lipidy a dalšími makromolekulárními látkami, neboli hmotu, která drží bakterie pohromadě. Dále dochází k maturaci biofilmu a začíná se rozvíjet zralý trojrozměrný biofilm poměrně složité struktury. Na řízení celého procesu se uplatňují specifické molekuly, které umožňují mezibuněčnou komunikaci. Při zhoršených podmínkách některé bakterie pomocí exopolysacharidové lyasy rozloží okolní matrix, opustí vzniklou strukturu a vydají se hledat nový, vhodný povrch s příznivějšími podmínkami, kde se uchytí, a tím se cyklus uzavírá. V extrému lze říct, že planktonická forma je jen mechanismem přemístění bakterie z jednoho povrchu na druhý [22, 23, 24, 25]. Tvorba biofilmu je znázorněna na Obr. 2.

Obr. 2 Tvorba biofilmu



Zdroj: [26]

Přirozené biofilmy jsou složeny z několika druhů bakterií. Obecně platí, že biofilm jednoho bakteriálního druhu má jednodušší stavbu než biofilm obsahující více druhů bakterií. Stavba biofilmu závisí na množství živin v jeho okolí. V prostředí, kde je nízká koncentrace živin se tvoří biofilm charakteru heterogenní mozaiky. Jedná se o tenkou vrstvičku jednotlivých buněk, ze kterých občas vystupují sloupcovité mikrokolonie. V prostředí, kde je středně vysoká koncentrace živin vzniká komplexně diferencovaný systém s kanálky. Mikrokolonie zde mají houbovitý tvar a místy částečně navzájem splývají. V prostředí organismu, kde je koncentrace živin poměrně vysoká, se tvoří kompaktní biofilm, který se skládá z četných mikrokolonií beze stop po možných kanálcích [27].

2.3.3 Význam biofilmu v patogenezi

Biofilm se snadno vytváří na povrchu různých pomůcek a náhrad zaváděných do organismu. Umělé povrchy v organismu takřka okamžitě pokryje vrstvička tkáňových bílkovin, což usnadňuje adhezi bakteriím. Biofilm se vytváří na povrchu katétrů, kanyl, kontaktních čoček, stehů, chlopenních i kloubních náhrad, membrán, dialyzačních přístrojů a různých jiných cizorodých materiálů a pomůcek přicházejících do styku s tkáněmi a sekrety pacienta. Biofilm je příčinou vzniku chronických a perzistentních infekcí: osteomyelitid, otitid, subakutních endokarditid, cholangitid, pyelonefritid apod. Uplatňuje se též u infekcí endoprotéz, neboť zde nachází jak inertní materiál (implantát), tak organický povrch (kost) [23,27].

Úspěšné řešení těchto komplikací, v jejichž vzniku a vývoji chorobných změn se uplatňuje biofilm, spočívá zatím pouze v chirurgickém zásahu, neboli v mechanickém odstranění pomůcky, která je kolonizovaná. Antibiotická terapie i za použití vysokých dávek a kombinace antibiotik mívá trvalý efekt jen výjimečně [28].

Bakterie rostoucí v biofilmech mají oproti planktonickým buňkám až 1000× vyšší rezistenci k antibiotickému účinku a je zde také vysoká odolnost k fagocytům a dalším nástrojům protiinfekční obrany. Bakteriální

exopolysacharidy snižují fagocytózu, opsonizaci, chemotaxi, aktivaci komplementu a blastogenezi T a B lymfocytů [23,25].

Hlavní mechanismus odpovídající za zvýšenou rezistenci biofilmu k antibiotikům není zcela znám. Záleží na určité kombinaci mikroba a antibiotika, který z následujících mechanismů bude hrát roli ve zvýšené rezistenci. Jako první vysvětlení se nabízí pouhá inhibice průniku antibiotika prostředím EPS matrix biofilmu. V současné době je ale tato teorie zpochybňována. Důležitější roli zde má vliv povrchového náboje. Například pozitivně nabité aminoglykosidy se váží na negativně nabitý alginát pseudomonády. Jako další z hypotéz zvýšené rezistence se předpokládá vliv změněného prostředí uvnitř biofilmu. V důsledku zvýšení osmotického tlaku, místního vyčerpání kyslíku a nahromadění kyselých zplodin metabolismu může dojít k potlačení účinku antibiotika nebo se zpomalí množení bakterií na takovou úroveň, že se stanou rezistentní například i k účinku beta-laktamů. Perzistentní buňky v dormantním stádiu (stav, kdy je bakterie zcela neaktivní), které vykazují vysokou odolnost proti vlivům z vnějšího prostředí, se vyskytují v každé bakteriální populaci. Ve stacionární fázi růstu bakteriální populace se nachází více než procento těchto perzistentních buněk, což může tedy přispět ke zvýšené rezistenci biofilmu [27, 29].

Stále se očekává, že budou vyvinuty nové preparáty, které budou působit proti biofilmu na jiném principu, než antibiotika. Předpokládá se, že budou brzy vyvinuty látky, které budou umět rozvolnit již vzniklý biofilm, a tím v něm změnit mikrokolonie v planktonickou formu, s níž si poradí i běžné dávky antimikrobiálních preparátů [27].

2.4 Mikrobiologická diagnostika infekcí TEP

Pro mikrobiologickou detekci infekce TEP se mohou použít ke kultivaci různé druhy materiálů. Počínaje odběrem punktátů z oblasti TEP, stěrů ze vzniklých píštělí, až po peroperační odběry stěrů, tkání, či vyjmutí samotné TEP [30].

Průkaz etiologického agens infekce probíhá přímo či nepřímo. Metody nepřímého průkazu jsou založené na principech sérologické diagnostiky (průkaz protilátek). Přímé metody identifikace mikroorganismů jsou založené na nálezu

mikroorganismu v klinickém materiálu - mikroskopicky, kultivačním průkazem (izolace) nebo průkazem bakteriálních složek ve vyšetřovaném vzorku. Izolace mikroorganismů je v současné době nejčastěji prováděna kultivací na kultivačních půdách. Izolované agens je poté dále identifikováno [31].

2.4.1 Metody rozvolnění mikrobiálního biofilmu

Mikroorganismy mají větší snahu lnout k povrchu protézy, než se volně pohybovat v tekutině nebo ve tkáních. Kvůli jejich identifikaci musejí být proto z materiálu uvolněny vhodnou technikou [15, 33].

Nejdostupnější metodou k rozvolnění mikrobiálního biofilmu se jeví metoda sonikace. Je to laboratorní metoda, při níž dojde k rozrušení vzniklého biofilmu, který se vytvořil na povrchu cizorodého materiálu působením ultrazvukových vln [30, 32].

Ultrazvuková sonikace vyjmutých kloubních implantátů velmi dobře uvolní z jejich povrchu biofilm a vzniklý vzorek pak může být snadno použit k běžné kultivaci. Bylo prokázáno, že při zpracování takto připraveného vzorku (sonikátu), byla detekce mikrobiální infekce mnohem citlivější, než při zpracování běžně odebraných vzorků tkání nebo punktátů [15].

3 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo porovnání výtěžnosti dvou typů kultivačních metod používaných pro záchyt infekce, a to metody klasické kultivace a metody využívající ultrazvuk k mechanickému rozvolnění biofilmu tvořeného na povrchu kloubních náhrad při infekčních komplikacích, tzv. sonikace.

4 Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Soubor pacientů

Pro účely této bakalářské práce byly použity vzorky kloubních náhrad, tkání, kloubních punktátů a stěrů odebraných od pacientů přijatých k léčbě infekčních komplikací TEP na Ortopedicko-traumatologické klinice FNKV. Jednalo se o 53 vzorků získaných od 14 pacientů v období od října 2013 do března 2015. Věkový rozsah pacientů byl 50 – 85 let. Přehled souboru pacientů společně s informacemi o vzorcích je uveden v Tab. 1.

Tab. 1 Soubor pacientů

Pacient*	Rok narození	Odebraný materiál	Rok a měsíc odběru	Číslo vzorku†
I	1931	Tkáň	2013/10	2011
I	1931	Tkáň	2013/10	2012
I	1931	Implantát	2013/10	2013
II	1942	Implantát	2014/01	2183
II	1942	Implantát	2014/01	2184
II	1942	Stěr z rány	2014/01	2201
II	1942	Výtěr z píštěle	2014/01	2202
III	1966	Výtěr z píštěle	2014/05	2206
III	1966	Tkáň	2014/05	2207
III	1966	Implantát	2014/05	2208
III	1966	Výtěr z píštěle	2014/05	2209
III	1966	Výtěr z píštěle	2014/05	2210
IV	1948	Tkáň	2014/06	2594
IV	1948	Implantát	2014/06	2595
V	1943	Implantát	2014/07	1646
V	1943	Hemokultura kloubní punktát	2014/07	1654
V	1943	Stěr z rány	2014/07	1655
VI	1940	Implantát	2014/08	1287

Pacient*	Rok narození	Odebraný materiál	Rok a měsíc odběru	Číslo vzorku†
VI	1940	Tkáň	2014/08	1318
VI	1940	Stěr z rány	2014/08	1319
VII	1949	Implantát	2014/10	1640
VII	1949	Stěr z rány	2014/10	1651
VII	1949	Stěr z rány	2014/10	1652
VIII	1952	Stěr z rány	2014/11	1587
VIII	1952	Stěr z rány	2014/11	1620
VIII	1952	Stěr z rány	2014/11	1621
VIII	1952	Implantát	2014/11	1622
IX	1952	Punktát kloubní	2015/01	1861
IX	1952	Punktát kloubní	2015/01	1862
IX	1952	Implantát	2015/01	1864
IX	1952	Hemokultura kloubní punktát	2015/01	4369
X	1948	Implantát	2015/01	2048
X	1948	Implantát	2015/01	2049
X	1948	Implantát	2015/01	2050
X	1948	Hemokultura sonikát	2015/01	2051
X	1948	Stěr z rány	2015/01	2063
XI	1948	Implantát	2015/02	2080
XI	1948	Hemokultura sonikát	2015/02	2081
XI	1948	Tkáň	2015/02	2094
XI	1948	Stěr z rány	2015/02	2095
XII	1941	Hemokultura sonikát	2015/02	2214
XII	1941	Implantát	2015/02	2215
XII	1941	Implantát	2015/02	2216
XII	1941	Stěr z rány	2015/02	2254
XIII	1947	Implantát	2015/02	2331
XIII	1947	Implantát	2015/02	2332

Pacient*	Rok narození	Odebraný materiál	Rok a měsíc odběru	Číslo vzorku[†]
XIII	1947	Hemokultura sonikát	2015/02	2333
XIII	1947	Stěr z rány	2015/02	2345
XIV	1944	Hemokultura sonikát	2015/03	2435
XIV	1944	Implantát	2015/03	2436
XIV	1944	Implantát	2015/03	2437
XIV	1944	Tkáň	2015/03	2438
XIV	1944	Tkáň	2015/03	2461

* Kvůli ochraně osobních údajů jsou pacienti uváděni v bakalářské práci pod římskými číslicemi

[†] Přidělené laboratorní číslo

4.1.2 Chemikálie a komerční sady

- Aceton – Penta, ČR
- API A – bioMérieux, FR
- API STREP – bioMérieux, FR
- ENTEROtest 16 – Erba Lachema, ČR
- Karbofuchsin – Penta, ČR
- Krystalová violet – Penta, ČR
- Lugolův roztok – Penta, ČR
- Pasorex Strep – Bio-rad, USA
- Pastorex Staph – Bio-rad, USA
- Peroxid vodíku 3% – Lékárna FNKV, ČR

4.1.3 Kultivační média

- Columbia agar (KA) – Bio-rad, USA
- Chocolate + PVS agar (ČA) – Bio-rad, USA
- MacConkey agar (MC) – Bio-rad, USA
- Mannitol salt agar (MSA) – Bio-rad, USA
- Mueller-Hinton agar (MHA) – Bio-rad, USA
- Mueller-Hinton blood s krví (MHF) – Bio-rad, USA

- Sabouraud agar (SAB) – Bio-rad, USA
- Schaedler agar (SCH) – Bio-rad, USA
- Schaedler bujón (JB) – Viamar International s.r.o., ČR
- UriSelect 4 (URI) – Bio-rad, USA
- Živný bujón (ŽB) – Viamar International s.r.o., ČR

4.1.4 Přístroje

- Anaerostat, Concept 200 – Ruskinn Technology Ltd, UK
- Anaerostat, Válec, AnaeroJar – OXOID Limited, UK
- Hemokultivační systém, BactAlert – bioMérieux, FR
- Laminární box, LaBox – LABOX spol. s.r.o., ČR
- Mikroskop, Olympus BX41 – Olympus Czech Group, ČR
- Fotoaparát, Olympus Camedia C-7070 – Olympus Czech Group, ČR
- Termostat, Memmert – Memmert GmbH, D
- Termostat, CelCulture CO2 Incubator – ESCO, Singapore
- Ultrazvuková lázeň, Bransonic 220 Ultrasonic cleaner – Suppression, D

4.1.5 Roztoky

- Fyziologický roztok – Viamar International s.r.o., ČR
- Ringerův roztok, infúzní roztok – Ardeapharma a.s., ČR

4.1.6 Spotřební materiál

- Hemokultivační lahvička FAN aerobní – bioMérieux, FR
- Hemokultivační lahvička SN anaerobní – bioMérieux, FR
- Injekční stříkačka sterilní, Norm - Ject – Henke Sass Wolf, D
- Jehla sterilní, Fine - Ject – Henke Sass Wolf, D
- Výtěrový tampon, Micro – Trans Swab Amies – Med-Lab trade, s.r.o., ČR

4.2 Metodika

4.2.1 Odběr vzorků a transport

Odběr vzorků probíhal ve spolupráci s lékaři z Ortopedicko-traumatologické kliniky. Materiál byl odebrán v souladu s používaným odběrovým systémem uvedeným v laboratorní příručce Ústavu laboratorní diagnostiky (ÚLD) [38] a podle doporučené doby pro jednotlivé materiály byl doručen na centrální příjem laboratoří ÚLD, kde byl předán ke zpracování na úsek mikrobiologie. Zpracování materiálu bylo na úseku mikrobiologie provedeno podle platných standardních operačních postupů (SOP) a modifikací postupu zpracování TEP s využitím sonikace.

4.2.2 Zpracování vzorků

4.2.2.1 Stěry

Po přijetí vzorku do laboratorního informačního systému (LIS) byl odebraný materiál očkovan přenesením vzorku na tuhou (primokultivace) a tekutou (pomnožení) kultivační půdu. První hodnocení aerobní primokultivace bylo provedeno po 24 hod kultivace, u anaerobní kultivace po 48 hod. Při negativním nálezu byly tuhé kultivační půdy vloženy zpět do termostatů a během prodloužené kultivace byl průběžně hodnocen nález. Definitivní hodnocení bylo provedeno po uplynutí celkové doby kultivace. Typy použitých kultivačních médií, kultivační podmínky a doba kultivace je uvedena v Tab. 2.

Pomnožení v živném bujónu (ŽB) se provádí pro citlivější záchyt etiologického agens. ŽB byl vyočkován po 24 hod kultivace na stejné půdy jako primokultivace (kromě SCH). Poté byl ŽB umístěn zpět do termostatu k prodloužené kultivaci. Další vyočkování ŽB proběhlo po sedmi dnech kultivace nebo kdykoliv při objektivním zhodnocení tvorby zákalu, který může signalizovat růst mikroorganismů. Hodnocení bylo provedeno stejným způsobem jako primokultivace. Typy použitých kultivačních médií, kultivační podmínky a doba kultivace je uvedena v Tab. 2.

Tab. 2 Kultivační podmínky stěry

	Půdy	Kultivační podmínky	Doba kultivace
Primokultivace	KA	37 °C při 5 % CO ₂ aerobně	1–5 dnů
	ČA	37 °C při 5 % CO ₂ aerobně	1–5 dnů
	URI	37 °C při 5 % CO ₂ aerobně	1–5 dnů
	SAB	37 °C při 5 % CO ₂ aerobně	1–5 dnů
	MSA	37 °C při 5 % CO ₂ aerobně	1–5 dnů
	SCH	37 °C anaerobně	2–7 dnů
Pomnožení	ŽB	37 °C aerobně	1–7 dnů

4.2.2.2 Vzorky tkáně

Odebrané vzorky tkáně byly zpracovány stejným způsobem jako peroperační stěry. Oproti zpracování stěrů se část tkáně navíc vložila do Schaedler bujónu (JB) určenému k pomnožení anaerobních bakterií. Vyočkování JB proběhlo po sedmi a čtrnácti dnech kultivace nebo kdykoliv při objektivním zhodnocení tvorby zákalu na SCH agar. Hodnocení probíhalo stejným způsobem jako u peroperačních stěrů. Typy použitých kultivačních médií, kultivační podmínky a doba kultivace je uvedena v Tab. 3.

Tab. 3 Kultivační podmínky tkáně

	Půdy	Kultivační podmínky	Doba kultivace
Primokultivace	KA	37 °C při 5 % CO ₂ aerobně	1–5 dnů
	ČA	37 °C při 5 % CO ₂ aerobně	1–5 dnů
	URI	37 °C při 5 % CO ₂ aerobně	1–5 dnů
	SAB	37 °C při 5 % CO ₂ aerobně	1–5 dnů
	MSA	37 °C při 5 % CO ₂ aerobně	1–5 dnů
	SCH	37 °C anaerobně	2–7 dnů
Pomnožení	ŽB	37 °C aerobně	1–7 dnů
	JB	37 °C anaerobně	1–14 dnů

4.2.2.3 Punktáty

Kloubní punktáty a punktáty z oblastí TEP byly zpracovány stejně jako vzorky tkání. Navíc byl z punktátů zhotoven přímý mikroskopický preparát, který byl obarven Gramovým barvením. Při mikroskopickém hodnocení se sledoval výskyt polymorfonukleárů a přítomnost bakterií. Doba a podmínky kultivace byly shodné jako u vzorků tkání. Hodnocení probíhalo stejným způsobem jako u peroperačních stěrů.

4.2.2.4 Sonikace TEP

Pro snížení rizika kontaminace byla manipulace s kloubní náhradou provedena v laminárním boxu. Komponenta byla vložena do sterilní nádoby a zalita Ringerovým roztokem. Takto připravená nádoba byla vložena do ultrazvukové lázně, kde byla vystavena sonikaci při frekvenci 30 kHz po dobu 10 minut.

Po sonikaci náhrady byl sterilně odebrán vzniklý sonikát, který byl rozdělen pro další zpracování. První část sonikátu byla zpracována stejným způsobem jako vzorky tkání (viz výše).

Druhá část sonikátu byla sterilně vpravena do hemokultivační lahvičky FAN, která byla následně vložena ke kultivaci do automatického kultivačního přístroje BactAlertu. V automatickém kultivačním systému BactAlert byla lahvička kultivována při 37 °C po dobu 5 dnů. Během této doby analyzátor automaticky vyhodnocoval průběh kultivace. V případě pozitivního vyhodnocení kultivace byl z obsahu lahvičky zhotoven mikroskopický preparát barvený dle Grama. Po mikroskopickém zhodnocení preparátu byla vybrána sada vhodných kultivačních médií (KA, URI, ČA) a založena tak kultivace na pevných půdách k získání izolátu pro podrobnější identifikaci.

4.2.3 Hodnocení nálezu a identifikace mikroorganismů

4.2.4 Hodnocení nálezu

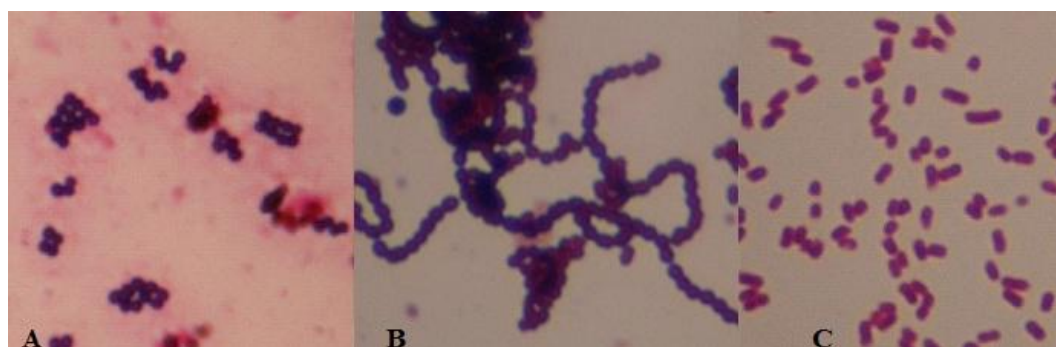
V případě pozitivního růstu bakterií na kultivačním médiu byla izolována čistá kultura, která byla nejprve předběžně identifikována a rozdělena na základě Gramova barvení (barvení Krystalovou violetí, fixování lugolovým roztokem,

odbarvení acetonem, barvení Karbolfuchsinem). Na základě Gramova barvení bylo přistoupeno k podrobné identifikaci pomocí komerčně dodávaných testů identifikace a stanovení citlivosti na antimikrobiální preparáty.

4.2.5 Fenotypová identifikace

Z vypěstované čisté kultury se zhotovil mikroskopický preparát, který se obarvil dle Gramova barvení. Mikroskopicky se hodnotil tvar, uspořádání bakterií a zařazení podle Grama. Na tomto základě se bakterie rozdělily na gram pozitivní (modré) nebo gram negativní (červené) koky nebo tyčinky. Gram pozitivní koky se podle jejich uspořádání rozdělily na shluky (stafylokoky) či řetízky (streptokoky, enterokoky). Obr. 3 dokumentuje rozdíl mezi morfologií buněk obarvených Gramovým barvením.

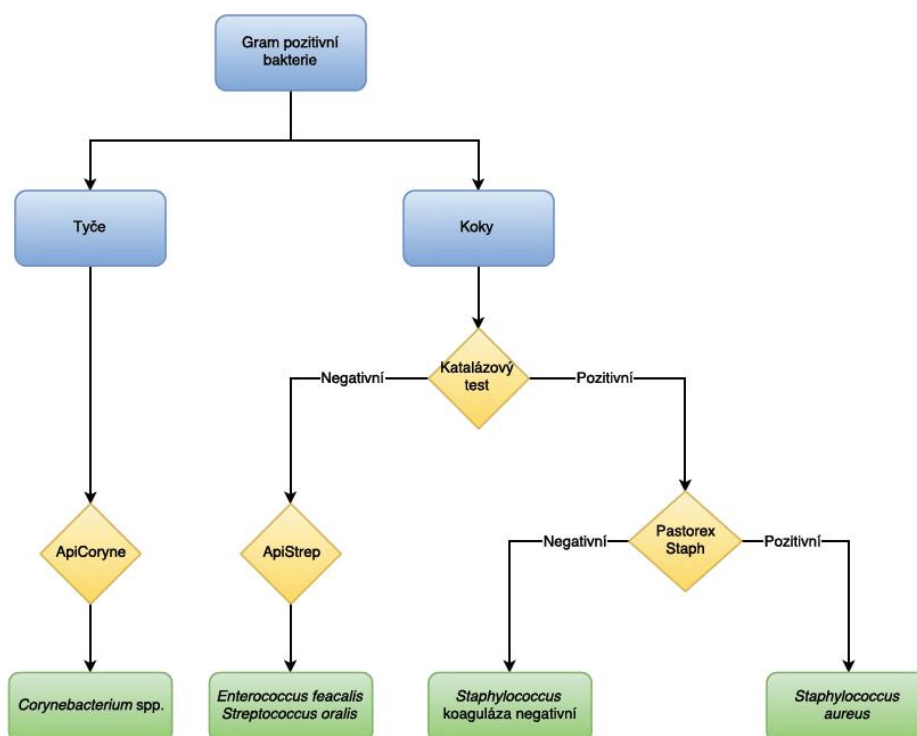
Obr. 3 Gramovo barvení



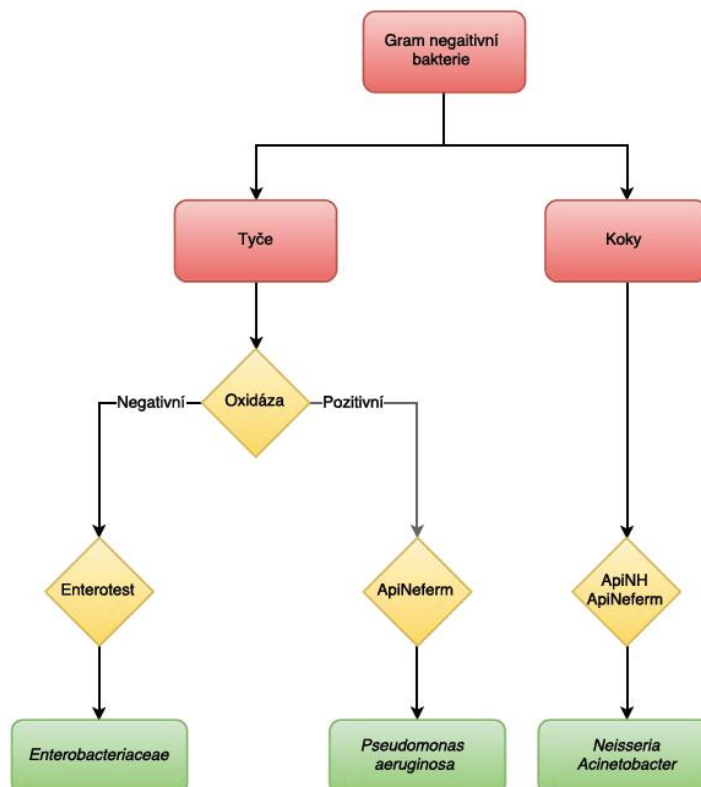
A: gram pozitivní koky ve shlucích; B: gram pozitivní koky v řetízcích; C: gram negativní tyčinky.

Po mikroskopickém vyhodnocení následovala podrobnější identifikace pomocí komerčně dodávaných testů a setů. Identifikace anaerobních bakterií byla provedena pomocí mikroskopie a identifikačního setu API A. Identifikace aerobních bakterií je znázorněna na obrázcích 4 a 5.

Obr. 4 Schéma identifikace gram pozitivních bakterií



Obr. 5 Schéma identifikace gram negativních bakterií



5 Výsledky

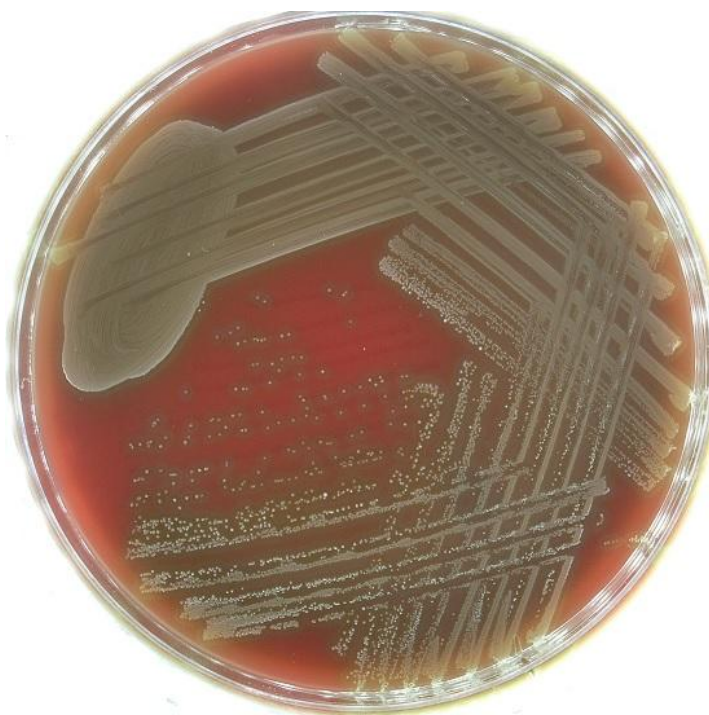
5.1 Výsledky kultivací

Od pacienta číslo I byly do laboratoře zaslány ke kultivaci dva vzorky tkáně a implantát. Oba dva vzorky tkáně byly vyhodnoceny jako kultivačně negativní. Sonikát získaný z implantátu byl kultivačně pozitivní, nález byl identifikován jako *Streptococcus oralis* (viz Obr. 6). Výsledky kultivace u pacienta číslo I jsou zobrazeny v Tab. 4.

Tab. 4 Výsledky kultivace pac. I

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
I	Tkáň	2011	Negativní
I	Tkáň	2012	Negativní
I	Implantát	2013	<i>Streptococcus oralis</i>

Obr. 6 *Streptococcus oralis* na KA



Od pacienta číslo II byly zaslány dva vzorky různých stěrů a dvě komponenty implantátu. Jeden stěr byl vyhodnocen jako kultivačně negativní. V druhém stěru byl pozitivní kultivační nález identifikován jako *Staphylococcus aureus*. Kultivace obou sonikátů získaných z implantátů byla pozitivní. Bakterie byly identifikovány jako *Staphylococcus aureus* a koaguláza negativní *Staphylococcus* (viz Obr. 7 a Obr. 8). Výsledky kultivace u pacienta číslo II jsou zobrazeny v Tab. 5.

Tab. 5 Výsledky kultivace pac. II

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
II	Implantát	2183	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
II	Implantát	2184	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
II	Stěr z rány	2201	<i>Staphylococcus aureus</i>
II	Výtěr z píštěle	2202	Negativní

Obr. 7 *Staphylococcus aureus* na KA



Obr. 8 *Staphylococcus* koaguláza negativní na KA



Od pacienta číslo III byly kultivovány tři stěry, jeden vzorek tkáně a implantát. Všechny stěry i tkáň byly kultivačně negativní. Kultivace sonikátu získaného z implantátu byla pozitivní pouze při anaerobní kultivaci, nález byl identifikován jako *Propionibacterium spp.* a *Bacteroides spp.*. Výsledky kultivace u pacienta číslo III jsou zobrazeny v Tab. 6.

Tab. 6 Výsledky kultivace pac. III

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
III	Výtěr z píštěle	2206	Negativní
III	Tkáň	2207	Negativní
III	Implantát	2208	<i>Propionibacterium spp.</i> <i>Bacteroides spp.</i>
III	Výtěr z píštěle	2209	Negativní
III	Výtěr z píštěle	2210	Negativní

Od pacienta číslo IV byl ke kultivaci zaslán vzorek tkáně a implantát. V obou případech byl kultivační nález pozitivní pouze při anaerobní kultivaci

a byl identifikován jako *Propionibacterium spp.*. Výsledky kultivace u pacienta číslo IV jsou zobrazeny v Tab. 7.

Tab. 7 Výsledky kultivace pac. IV

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
IV	Tkáň	2594	<i>Propionibacterium spp.</i>
IV	Implantát	2595	<i>Propionibacterium spp.</i>

Od pacienta číslo V byl ke kultivaci zaslán stěr, kloubní punktát vpravený v hemokultivační lahvičce FAN a implantát. Všechny vzorky byly kultivačně negativní. Výsledky kultivace u pacienta číslo V jsou zobrazeny v Tab. 8.

Tab. 8 Výsledky kultivace pac. V

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
V	Implantát	1646	Negativní
V	Hemokultura – kl. Punktát*	1654	Negativní
V	Stěr z rány	1655	Negativní

* Kloubní punktát vpravený do hemokultivační lahvičky již na oddělení

Od pacienta číslo VI byl zaslán stěr, vzorek tkáně a implantát. Ve všech vzorcích byl pozitivní kultivační nálezný, který byl identifikován jako koaguláza negativní *Staphylococcus*. Výsledky kultivace u pacienta číslo VI jsou zobrazeny v Tab. 9.

Tab. 9 Výsledky kultivace pac. VI

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
VI	Implantát	1287	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
VI	Tkáň	1318	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
VI	Stěr z rány	1319	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní

Od pacienta číslo VII byl zaslán implantát a dva stěry. Všechny tři vzorky byly kultivačně negativní. Výsledky kultivace u pacienta číslo VII jsou zobrazeny v Tab. 10.

Tab. 10 Výsledky kultivace pac. VII

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
VII	Implantát	1640	Negativní
VII	Stěr z rány	1651	Negativní
VII	Stěr z rány	1652	Negativní

Od pacienta číslo VIII byl zaslán implantát a tři stěry. Dva stěry byly kultivačně negativní. Třetí stěr a sonikát získaný z implantátu byl kultivačně pozitivní a nález byl identifikován jako koaguláza negativní *Staphylococcus*. Výsledky kultivace u pacienta číslo VIII jsou zobrazeny v Tab. 11.

Tab. 11 Výsledky kultivace pac. VIII

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
VIII	Stěr z rány	1587	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
VIII	Stěr z rány	1620	Negativní
VIII	Stěr z rány	1621	Negativní
VIII	Implantát	1622	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní

Od pacienta číslo IX byl ke kultivaci zaslán implantát, dva vzorky kloubního punktátu a jeden kloubní punktát v hemokultivační lahvičce FAN. Všechny tři vzorky punktátu byly kultivačně negativní. Sonikát získaný z implantátu byl kultivačně pozitivní a nález byl identifikován jako *Staphylococcus* koaguláza negativní. Výsledky kultivace u pacienta číslo IX jsou zobrazeny v Tab. 12.

Tab. 12 Výsledky kultivace pac. IX

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
IX	Punktát kloubní	1861	Negativní
IX	Punktát kloubní	1862	Negativní
IX	Implantát	1864	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
IX	Hemokultura – kl. punktát*	4369	Negativní

* Kloubní punktát vpravený do hemokultivační lahvičky již na oddělení

Od pacienta číslo X byl zaslán stěr a tři komponenty implantátu. Část sonikátu z implantátu (vz. č. 2048) byla vpravena do hemokultivační lahvičky. Ve všech vzorcích byl kultivačně pozitivní nález, který byl identifikován jako koaguláza negativní *Staphylococcus*. Výsledky kultivace u pacienta číslo X jsou zobrazeny v Tab. 13.

Tab. 13 Výsledky kultivace pac. X

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
X	Implantát	2048	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
X	Implantát	2049	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
X	Implantát	2050	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
X	Hemokultura – sonikát*	2051	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
X	Stěr z rány	2063	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní

* Sonikát získaný z implanátu č. 2048

Od pacienta číslo XI byl zaslán stěr, vzorek tkáně a implantát. Část sonikátu z implantátu byla vpravena do hemokultivační lahvičky. Ve všech

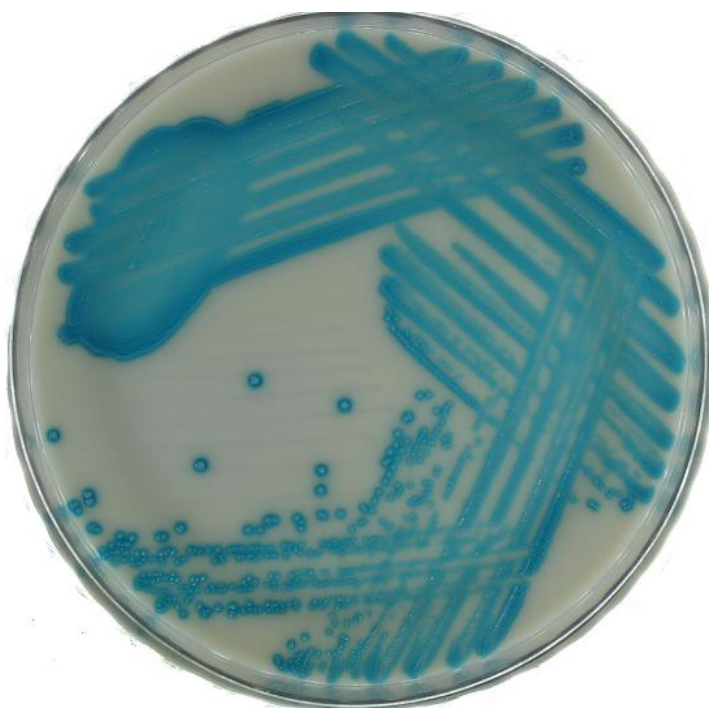
vzorcích byl kultivačně pozitivní nález, který byl identifikován jako *Enterococcus faecalis* (viz Obr. 9). Výsledky kultivace u pacienta číslo XI jsou zobrazeny v Tab. 14.

Tab. 14 Výsledky kultivace pac. XI

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
XI	Implantát	2080	<i>Enterococcus faecalis</i>
XI	Hemokultura – sonikát*	2081	<i>Enterococcus faecalis</i>
XI	Tkáň	2094	<i>Enterococcus faecalis</i>
XI	Stěr z rány	2095	<i>Enterococcus faecalis</i>

* Sonikát získaný z implantátu č. 2080

Obr. 9 *Enterococcus faecalis* na URI



Od pacienta číslo XII byl zaslán stěr a dvě komponenty implantátu. Část sonikátu z implantátu (vz. č. 2215) byla vpravena do hemokultivační lahvičky. Všechny vzorky byly kultivačně negativní. Výsledky kultivace u pacienta číslo XII jsou zobrazeny v Tab. 15.

Tab. 15 Výsledky kultivace pac. XII

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
XII	Hemokultura – sonikát*	2214	Negativní
XII	Implantát	2215	Negativní
XII	Implantát	2216	Negativní
XII	Stěr z rány	2254	Negativní

* Sonikát získaný z implatnátu č. 2215

Od pacienta číslo XIII byl zaslán stěr a dvě komponenty implantátu. Část sonikátu z implantátu (vz. č. 2331) byla vpravena do hemokultivační lahvičky. Ve všech vzorcích byl kultivačně pozitivní nále, který byl identifikován jako koaguláza negativní *Staphylococcus*. Výsledky kultivace u pacienta číslo XIII jsou zobrazeny v Tab. 16.

Tab. 16 Výsledky kultivace pac. XIII

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
XIII	Implantát	2331	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
XIII	Implantát	2332	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
XIII	Hemokultura – sonikát*	2333	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
XIII	Stěr z rány	2345	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní

* Sonikát získaný z implatnátu č. 2331

Od pacienta číslo XIV byly zaslány dvě komponenty implantátu a dva vzorky tkáně. Část sonikátu z implantátu (vz. č. 2437) byla vpravena do hemokultivační lahvičky. Vzorky tkáně byly kultivačně negativní. Sonikát získaný z implantátu č. 2437 byl kultivačně pozitivní a nále byl identifikován jako *Pseudomonas aeruginosa* (viz Obr. 10). Sonikát získaný z implantátu č. 2436 byl kultivačně pozitivní a nále byl identifikován jako koaguláza negativní

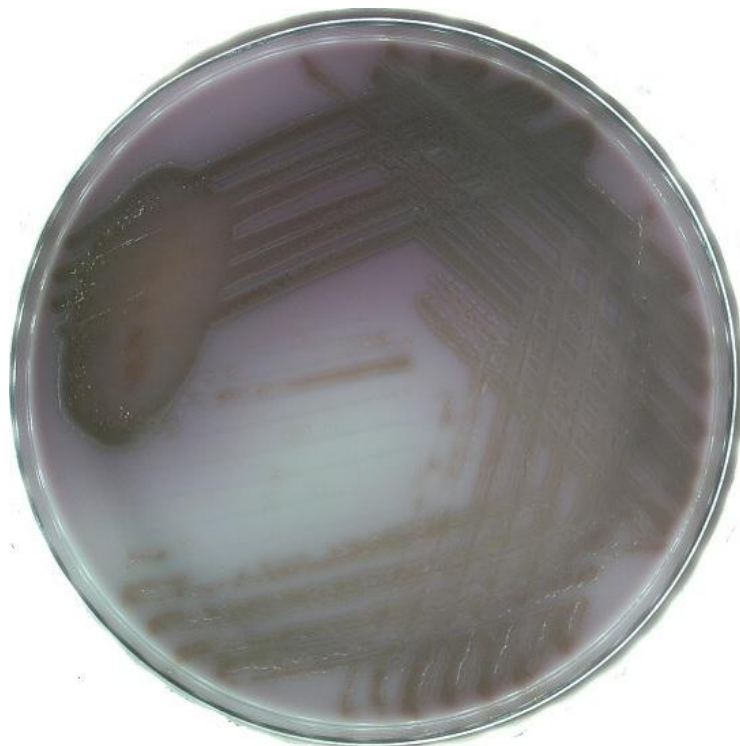
Staphylococcus. Výsledky kultivace u pacienta číslo XIV jsou zobrazeny v Tab. 17.

Tab. 17 Výsledky kultivace pac. XIV

Pacient	Odebraný materiál	Číslo vzorku	Výsledek
XIV	Hemokultura – sonikát*	2435	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
XIV	Implantát	2436	<i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní
XIV	Implantát	2437	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
XIV	Tkáň	2438	Negativní
XIV	Tkáň	2461	Negativní

* Sonikát získaný z implanátu č. 2437

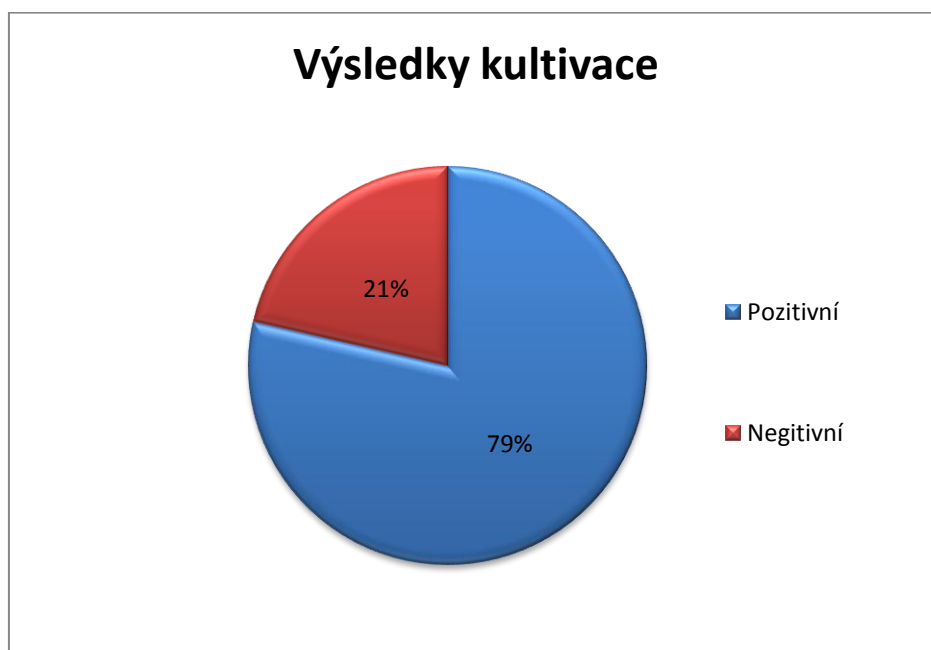
Obr. 10 *Pseudomonas aeruginosa* na URI



5.2 Zhodnocení výsledků kultivace

Ze souboru vzorků získaných od 14 pacientů byl po zpracování pomocí klasické kultivační metody i metody sonikace soubor vzorků od 11 pacientů kultivačně pozitivní a soubor vzorků od zbylých 3 pacientů (pac. č. V, VII, XII) kultivačně negativní. Zobrazeno v grafu 1.

Graf 1. Výsledky kultivace u souboru vzorků od 14 pacientů



Ze souboru pozitivních výsledků od 11 pacientů byl u souboru vzorků od 6 pacientů (pac. č. IV, VI, VIII, X, XI, XIII) kultivační průkaz v obou metodách shodný. Výsledky kultivační metody využívající sonikaci byly oproti klasické kultivační metodě pozitivní u souboru vzorků od 4 pacientů (pac. č. I, III, IX, XIV). Kultivační technikou s metodou sonikace byl u pacienta č. II oproti klasické kultivační metodě navíc prokázán další bakteriální kmen. Porovnání pozitivních výsledků metody sonikace s klasickou kultivací je znázorněn v Grafu 2.

Graf 2. Porovnání výsledků klasické kultivace s metodou sonikace



6 Diskuze

Problematikou infekčních komplikací totálních endoprotéz se zabývá mnoho ortopedů, mikrobiologů a dalších odborníků již dlouhou dobu. Význam biofilmu při vzniku infekční komplikace TEP a jeho negativní vliv k získání kultivačního důkazu o přítomnosti možného infekčního činitele je dobře znám. Z pohledu mikrobiologa se jeví nejdostupnější metodou k rozvolnění vzniklého biofilmu výše popisovaná metoda sonikace. Podobný názor je publikován i v jiných pracích [15].

V této práci byl sledován kultivační průkaz etiologického agens po vystavení TEP sonikaci, která předpokládá rozvolnění mikrobiálního biofilmu ultrazvukovou vlnou, čímž umožní uvolnění planktonických forem bakterií do okolní tekutiny, ze které již lze běžnými kultivačními postupy tyto mikroorganismy vypěstovat. Dosažené výsledky tohoto pracovního postupu byly porovnány s klasickou laboratorní kultivační technikou bez použití metody sonikace.

Ze souboru čtrnácti pacientů byla v šesti pozitivních případech výsledná kultivace etiologického agens shodná, jak při použití klasické kultivační techniky, tak při kultivaci s použitím metody sonikace. Domnívám se, že těchto výsledků bylo dosaženo z důvodu vyšší bakteriální koncentrace ve vzorku a záchyt tak byl možný i běžnou kultivační technikou. Dále by bylo vhodné u těchto bakteriálních kmenů zjistit, zdali vůbec mají schopnost tvořit biofilm. Pro tento průkaz tvorby biofilmu se nejčastěji používají fenotypové metody jako je například Christensenova zkumavková metoda nebo např. u stafylokoků průkaz schopnosti tvorby extracelulární polysacharidové substance pomocí kultivace na agaru s Kongo červení [15].

Ani u jednoho případu ze souboru pacientů se nestalo, že by kultivace po použití sonikace vyšla oproti běžné kultivační technice jako negativní. Pokud byl bakteriální záchyt u klasické kultivační techniky, vždy byl shodný bakteriální záchyt i u kultivace s použitím sonikace a v jednom případě se sonikací zachytilo oproti běžné kultivaci víc bakteriálních druhů.

V pěti případech z jedenácti pozitivních výsledků byl oproti negativní klasické kultivační metodě bakteriální záchyt metodou sonikace pozitivní.

Pro vysvětlení těchto výsledků je důležitý fakt, že sonikaci je podrobena převážná část celé endoprotézy a tudíž k uvolnění bakterií do sonikátu dochází i z míst, která jsou nepřístupná běžnému stěru. Určitou roli také pravděpodobně hraje i kvantita bakterií, neboť ve stěru z jedné lokality je nižší pravděpodobnost fyzického zachycení dostatečného množství CFU, zatímco v sonikátu lze předpokládat vyšší bakteriální koncentraci.

Z práce vyplývá, že pomocí sonikace byl záchyt vyšší než při použití běžných kultivačních metod. Podobné závěry dokládají i výsledky prací ostatních autorů [34, 35, 36].

Ačkoliv byla senzitivita prokazatelně vyšší, k otázce specificity se v předkládané studii nelze jednoznačně vyjádřit, protože ne vždy byl k dispozici dostatečný kontrolní soubor vzorků (současný peroperační odběr minimálně 2-3 vzorků z místa implantátu).

Je potřeba také brát v úvahu, že pozitivní kultivační nález jednoznačně neprokazuje přítomnost infekční komplikace TEP. Ve výsledcích byl kromě průkazných patogenů jako je *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* vykultivován v převážné většině pozitivních případů koaguláza negativní *Staphylococcus*, který je tvořen z heterogenní skupiny různých bakteriálních druhů lišících se svou virulencí. Pro širší rozpracování tohoto tématu by byla přínosná bližší druhová identifikace (např. genotypizace). Na základě této podrobnější identifikace lze následně kultivační nálezy z různých vzorků od jednoho pacienta porovnat a při nálezů shodných výsledků se přiklánět k závěru, že se s největší pravděpodobností jedná o etiologické agens infekční komplikace a ne o kontaminaci běžnou kožní florou [16].

Pro stanovení diagnózy infekční komplikace TEP je potřeba, aby lékař pracoval se všemi dostupnými výsledky komplexně. Od výsledku rentgenu počínaje, přes hematologické, biochemické a různé další výsledky, až po názor samotného operátora, který implantát odebírá a vidí tak v jakém stavu se endoprotéza a její okolí nachází. V literatuře se uvádí, že senzitivita laboratorních vyšetření u této infekční komplikace je poměrně vysoká, ale specificita vyšetření je nedostačující. Mikrobiologický průkaz je zlatým

standardem v diagnostice infekce TEP. Vždy je tedy k získání exaktního závěru potřeba komplexní zhodnocení [37].

Stran možnosti kontaminace materiálu v průběhu laboratorního zpracování by bylo vhodné porovnat výsledky při paralelním zpracování slepého vzorku (např. sterilně ošetřeného kostního cementu). Dalším možným rozšířením studie by bylo také vyšetření sonikátu pomocí molekulárně biologických metod (PCR), které by umožnilo nejen kvalitativní porovnání, ale také kvantitativní zhodnocení nálezů, což by mohlo mít rovněž dopad na interpretaci nálezu.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit si teorii, že s použitím metody sonikace, kde pomocí ultrazvukových vln dochází k rozvolnění mikrobiálního biofilmu vytvořeného na povrchu endoprotézy, se zvyšuje senzitivita kultivačního průkazu etiologického agens.

Pro tuto práci byly kultivačně zpracovány vzorky implantátů, stěrů, tkání a punktátů od 14 pacientů. Implantáty byly zpracovány s použitím metody sonikace. Stěry, tkáně a punktáty běžnou kultivační metodou. Dosažené výsledky byly porovnány. I přes poměrně malý počet pacientů lze konstatovat, že kultivační záchyt s pomocí metody sonikace byl v našem případě o 45 % vyšší než u zpracování materiálu, který byl proveden podle platných standardních operačních postupů bez použití ultrazvuku.

Tato metoda bude začleněna do standardních operačních postupů na úseku mikrobiologie ÚLD FNKV. Pro zdokonalení metodiky bude zároveň zavedeno zpracování slepých vzorků kvůli vyloučení možné kontaminace vzniklé zpracováním vzorků v laboratoři. Samozřejmostí pro správné vyhodnocení kultivačních nálezů u těchto typů materiálů je provedení kvalitního odběru odebraného již na operačním sále, z toho důvodu bude i nadále nutná úzká spolupráce s Ortopedicko-traumatologickou klinikou FNKV.

8 Souhrn

Bakalářská práce se zabývá mikrobiologickým určením infekčního agens pomocí metody sonikace a využitím této metody při průkazu infekční komplikace kloubních náhrad.

Cílem této práce bylo porovnat senzitivitu kultivačního záchytu u postupu s užitím metody sonikace a běžné kultivační techniky provedené podle standardních laboratorních operačních postupů.

První část této práce přibližuje problematiku aloplastiky, obsahuje teoretické základy klasifikace a diagnostiky infekce kloubní náhrady, vysvětluje pojem mikrobiální biofilm a popisuje úlohu tohoto biofilmu při léčbě periprotetické infekce. Dále seznamuje s problematikou mikrobiologické diagnostiky u infekce totální endoprotézy a popisuje vliv mikrobiálního biofilmu na průběh mikrobiologické kultivace.

Druhá část práce popisuje mikrobiologické zpracování, kultivaci a vyhodnocení souboru vzorků zaslaných do laboratoře, klasickou metodou a metodou s použitím sonikace.

Výsledky bakalářské práce dokazují, že senzitivita kultivačního průkazu bakteriálního agens s použitím metody sonikace je vyšší a zařazení této metody mezi standardní laboratorní postupy může tak přispět k většímu záchytu infekčních komplikací kloubních náhrad.

9 Summary

Outlined is the role of sonication methods in the microbiologic detection and identification of infectious agents that underlie the infectious complications of joint replacement procedures.

The aim of this work is to compare the sensitivity of cultured findings with those obtained via sonication methods and routine cultivation techniques carried out according to standard laboratory protocols.

The first part discusses problems with aloplastics, the thoeretical background for the classification and diagnosis of infections associated with joint prostheses, explains the concept of microbial biofilms and their role in the therapy of peri-prosthetic infections.

In the second, the microbiologic work-up, culturing and assessment of samples sent to the laboratory, classic methodology and methods used with sonication are described. Furthermore, problems concerning the microbiologic diagnosis of infections related to total endo-prostheses and the influence of biofilms is presented.

It is evidenced that the sensitivity for identifying bacterial agents with sonication methods is higher, hihglighting the potential for higher rates of detection of infectious complications associated with joint replacement prodcedures, thereby calling for the overall inclusion of sonication methods among standard laboratory procedures.

10 Seznam použité literatury

1. KOUDELA, Karel. *Ortopedie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0654-2.
2. Ošetřovatelství-Výuka-Lékařské diagnózy. *ZSHK* [online]. Hradec Králové [cit. 2016-04-22]. Dostupné z: <http://ose.zshk.cz/vyuka/lekarske-diagnozy.aspx?id=34>
3. LETA, Tesfaye H, Stein Håkon L LYGRE, Arne SKREDDERSTUEN, Geir HALLAN a Ove FURNES. Failure of aseptic revision total knee arthroplasties. *Acta Orthopaedica*. 2015, **86**(1): 48-57. DOI: 10.3109/17453674.2014.964097. ISSN 1745-3674. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/17453674.2014.964097>
4. Joint Replacement Infection. *AAOS: OrthoInfo* [online]. 2012 [cit. 2015-06-13]. Dostupné z: <http://orthoinfo.aaos.org>
5. JAHODA, David, Antonín SOSNA a Otakar NYČ. *Infekční komplikace kloubních náhrad*. 1. vyd. V Praze: Triton, 2008, s. 11-15. ISBN 978-80-7387-158-1.
6. TOMÁŠ, T. Pacient – rizikový faktor infekce totální endoprotézy. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae Et Traumatologiae Čechosl.* 2008, (75): 451-456. ISSN 0001-5415. Dostupné také z: <http://www.achot.cz/detail.php?stat=230>
7. Diagnostika. JAHODA, David et al. *Infekční komplikace kloubních náhrad*. 1. vyd. V Praze: Triton, 2008, s. 52. ISBN 978-80-7387-158-1.
8. PATEL, R., D.R. OSMON a A.D. HANSSEN. The diagnosis of prosthetic joint infection: current techniques and emerging technologies. *Clinical orthopaedics and related research*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 2005, (437).
9. MUELLER, Michael, Lars MORAWIETZ, Patrick STRUBE, Olaf HASART, Carsten PERKA a Stephan TOHTZ. Diagnosis of periprosthetic infection following total hip arthroplasty - evaluation of the diagnostic values of pre- and intraoperative parameters and the associated strategy to preoperatively select patients with a high probability of joint infection. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* [online]. 2008, **3**(1), 31- [cit.

- 2016-04-29]. DOI: 10.1186/1749-799X-3-31. ISSN 1749-799x. Dostupné z:
<http://josr-online.biomedcentral.com/articles/10.1186/1749-799X-3-31>
10. Laboratorní vyšetření. JAHODA, David et al. *Infekční komplikace kloubních náhrad*. 1. vyd. V Praze: Triton, 2008, s. 55-56. ISBN 978-80-7387-158-1.
 11. KOUDELA Jr., K., L. GEIGEROVÁ, O. HES a K. KOUDELA Sr. Komplexní diagnostika infekce u revizních operací totálních endoprotéz velkých kloubů. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae Et Traumatologiae Čechosl.* 2010, (77). ISSN 0001-5415.
 12. JAHODA, David, Antonín SOSNA a Otakar NYČ. *Infekční komplikace kloubních náhrad*. 1. vyd. V Praze: Triton, 2008, s. 53-55. ISBN 978-80-7387-158-1.
 13. Anamnéza a klinické vyšetření. JAHODA, David. *Infekční komplikace kloubních náhrad*. 1. vyd. V Praze: Triton, 2008, s. 54. ISBN 978-80-7387-158-1.
 14. WIDMER, Andreas F. New Developments in Diagnosis and Treatment of Infection in Orthopedic Implants. *Clinical Infectious Diseases*. 2001, **33**(2). DOI: 10.1086/321863. ISSN 1058-4838. Dostupné také z:
<http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/321863>
 15. HRONÍČKOVÁ, Lenka. Laboratorní metody pro diagnostiku infekcí totálních náhrad kloubů [online]. České Budějovice, 2008 [cit. 2016-04-29]. Bachelor's thesis. University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Health and Social Studies. Thesis supervisor MUDr. Blanka Heinigová Available from: <<http://theses.cz/id/ne5iri/>>.
 16. Řešení infekčních komplikací po operaci kloubních náhrad. *Zdravotnictví a medicína* [online]. Praha, 2000 [cit. 2016-05-04]. Dostupné z:
<http://zdravi.euro.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/reseni-infekcnich-komplikaci-po-operaci-kloubnich-nahrad-129261>
 17. BOURNE, R.B., G.A. HUNTER, C.H. RORABECK a J.J. MACNABB. A six year follow-up infected total hip arthroplasty Managed by Girdlestone's arthroplasty. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 1984, **66**(3).

18. Náhrady kyčelního kloubu. *Postgraduální medicína* [online]. Praha, 2008 [cit. 2016-04]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/nahrady-kycelniho-kloubu-388282>
19. Způsoby léčby hluboké léčby aloplastiky. JAHODA, David. *Infekční komplikace kloubních náhrad*. 1. vyd. V Praze: Triton, 2008, s. 71-101. ISBN 978-80-7387-158-1.
20. CARLSSON, A.S., G. JOSEFSSON a L. LINDBERG. Revision with gentamicin-impregnated cement for deep infections in total hip arthroplasties. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 1978, **60**(8).
21. BOOTH, R.E. Jr. a P.A. LOTKE. The results of spacer block technique in revision of infected total knee arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1989, (248). ISSN 0009-921x.
22. NĚMCOVÁ, Tereza. *Význam mikrobiálních biofilmů a jejich úloha v patogenezi*. Brno, 2008. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie. 24
23. ČERNOHORSKÁ, L. a M. VOTAVA. Možnosti průkazu tvorby biofilmu v rutinní mikrobiologické praxi. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2002, **51**(4), 161-164. ISSN 1210-7913.
24. RŮŽIČKA, F., V. HOLÁ a M. VOTAVA. Možnosti průkazu tvorby biofilmu v rutinní mikrobiologické praxi. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2006, **55**(1), 23-29. ISSN 1210-7913.
25. SCHINDLER, Jiří. Mikrobiální biofilm: Jak žijí bakterie v přirozeném prostředí? *Vesmír: přírodovědecký časopis*. 2001, **80**(4). Dostupné také z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/mikrobialni-biofilm>
26. Ústav biochemie a mikrobiologie - aktuálně řešené projekty. *VŠCHT* [online]. Praha, 2016 [cit. 2016-04-22]. Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/cz/research/groups/rokoska/projects.php>
27. VOTAVA, M. Mikrobiální biofilm a jeho význam v lékařství. *Praktický lékař*. 2002, **82**(9), 522-525. ISSN 0032-6739.
28. COSTERTON, J.W., P.S. STEWART a E.P. GREENBERG. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* [online]. 1999,

284(5418) [cit. 2015-08-09]. Dostupné z:

<http://www.sbs.utexas.edu/psaxena/bio226r/articles/Biofilm.pdf>

29. DOPITOVÁ, Markéta. *Vliv kultivačních podmínek na citlivost mikrobiálního biofilmu k antimikrobiálním látkám*. Brno, 2015. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie. Vedoucí práce Doc. MUDr. Filip Růžička, Ph .D.
30. Infekce kloubních náhrad. BENEŠ, Jiří et al. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009, s. 506. ISBN 978-80-7262-644-1.
31. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-7.
32. SEDLÁČKOVÁ, Michaela. *Možnosti energetického využití fyto-masy eutrofizovaných vod*. Plzeň, 2013. Diplomová práce. Západočeská univerzita v Plzni, Fakulta elektrotechnická, Katedra elektroenergetiky a ekologie. Vedoucí práce Ing. Petr Jindra, Ph. D.
33. Biofilm. *Infekční komplikace kloubních náhrad*. 1. vyd. V Praze: Triton, 2008, s. 36-40. ISBN 978-80-7387-158-1.
34. TRAMPUZ, A., K. E. PIPER, A. D. HANSEN, D. R. OSMON, F. R. COCKERILL, J. M. STECKELBERG a R. PATEL. Sonication of Explanted Prosthetic Components in Bags for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection Is Associated with Risk of Contamination. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2006, **44**(2), 628-631 [cit. 2016-04-29]. DOI: 10.1128/JCM.44.2.628-631.2006. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.44.2.628-631.2006>
35. TRAMPUZ, Andrej, Kerryl E. PIPER, Melissa J. JACOBSON, et al. Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection. *New England Journal of Medicine* [online]. 2007, **357**(7), 654-663 [cit. 2016-04-29]. DOI: 10.1056/NEJMoa061588. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa061588>
36. JANZ, V., G.I. WASSILEW, O. HASART, S. TOHTZ a C. PERKA. Improvement in the detection rate of PJI in total hip arthroplasty through multiple sonicate fluid cultures. *Journal of Orthopaedic Research* [online].

2013, **31**(12), 2021-2024 [cit. 2016-04-29]. DOI: 10.1002/jor.22451. ISSN 07360266. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jor.22451>

37. TOMÁŠ, Tomáš, Filip RŮŽIČKA a Jan KŘÍSTEK. Diagnostika periprotetického infektu. *Ortopedie*, Praha: Medakta, 2010, roč. 4, č. 1, s. 34-41. ISSN 1802-1727.

38. Laboratorní příručka ÚLD. *FNKV* [online]. Praha, 2016 [cit. 2016-04-09]. Dostupné z: http://www.fnkv.cz/lab/lp_uld/_start.htm

11 Seznam tabulek, obrázků, grafů

Tab. 1 Soubor pacientů	22
Tab. 2 Kultivační podmínky stěry	27
Tab. 3 Kultivační podmínky tkáně	27
Tab. 4 Výsledky kultivace pac. I	31
Tab. 5 Výsledky kultivace pac. II	32
Tab. 6 Výsledky kultivace pac. III	33
Tab. 7 Výsledky kultivace pac. IV	34
Tab. 8 Výsledky kultivace pac. V	34
Tab. 9 Výsledky kultivace pac. VI	34
Tab. 10 Výsledky kultivace pac. VII	35
Tab. 11 Výsledky kultivace pac. VIII	35
Tab. 12 Výsledky kultivace pac. IX	36
Tab. 13 Výsledky kultivace pac. X	36
Tab. 14 Výsledky kultivace pac. XI	37
Tab. 15 Výsledky kultivace pac. XII	38
Tab. 16 Výsledky kultivace pac. XIII	38
Tab. 17 Výsledky kultivace pac. XIV	39
Obr. 1 Totální endoprotéza kyčle a kolena	9
Obr. 2 Tvorba biofilmu	17
Obr. 3 Gramovo barvení	29
Obr. 4 Schéma identifikace gram pozitivních bakterií	30
Obr. 5 Schéma identifikace gram negativních bakterií	30
Obr. 6 <i>Streptococcus oralis</i> na KA	31
Obr. 7 <i>Staphylococcus aureus</i> na KA	32
Obr. 8 <i>Staphylococcus</i> koaguláza negativní na KA	33
Obr. 9 <i>Enterococcus faecalis</i> na URI	37
Obr. 10 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na URI	39

Všechny obrázky (kromě Obr. 2) pocházejí z vlastního zdroje, z Mikrobiologie ÚLD FNKV v Praze.

Graf 1 Výsledky kultivace u souboru vzorků od 14 pacientů	40
Graf 2 Porovnání výsledků klasické kultivace s metodou sonikace	41