

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA**

**LABORATORNÍ METODY PRO DIAGNOSTIKU INFEKČÍ
TOTÁLNÍCH NÁHRAD KLOUBŮ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Jméno autora: Lenka Hroníčková

Vedoucí práce: MUDr. Blanka Heinigeová

Datum odevzdání: 14. 5. 2008

Laboratory methods for diagnostic infections total prosthesis articulations

Prosthesis articulations and their infectious complications are currently a much discussed problem among orthopaedists and microbiologists. The most operations are performed especially at hip and knee joints. The main reason for their most frequent damage is secondly the fact that endoprostheses of these joints have a good possibility of fixing of plastic materials into the bone and a long lifetime. Endoprostheses are used also in joints of shoulders, elbows etc.

Despite of all aseptic procedures infection development sometimes appears. This complication is the most common cause of endoprostheses damage and it is often the reason for re-operation. The development of infection depends on interactions between a micro-organism, prosthesis articulations and a host. Bacterial agents causing infections of prosthesis articulations include gram-positive cocci, especially *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, sometimes even streptococci. Further they could be gram-negative bars, especially *Escherichia coli*, *Proteus species*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species* a *Serratia marcescens* etc. In mixed infections there can also appear anaerobic bacteria, especially *Propionibacterium acnes* and anaerobic streptococci. Most of bacterial agents are a part of so called bio film, which is important for bacteria and their survival. Bacteria in bio film acquire matrix protection against the effect of antibodies and phagocytes and also against the effects of antibiotics.

Implementation of new laboratory procedures and methods, when among others ultrasound is used to destroy bio film, and making further cultivation and identification of infectious agents easier proved as a contribution. It leads to significantly higher capture of etiological agents of infectious complications of prosthesis articulations and this way it contributes to better securing of re-implantations.

Procedures and methods presented in this thesis can be used in other modifications at examination of other inorganic materials and implantations and at examination of tissues taken out of patient 's body at various infectious complications.

Presented thesis compares laboratory procedures and methods used so far at OLM (Department of Medical Microbiology) in Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.

(Hospital in Jindřichův Hradec, Ltd.) with laboratory procedures newly implemented for this purpose to examine infections of prosthesis articulations in cooperation with the author of presented thesis in spring months of 2008.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma *Laboratorní metody pro diagnostiku infekcí totálních náhrad kloubů* vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě/v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 14.05.2008

podpis studenta

Poděkování

Mé poděkování patří především primářce MUDr. Blance Heinigeové a vedoucí laborantce paní Marii Pánové (Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.), primáři MUDr. Jaroslavu Altschulovi (Ortopedicko-traumatologické oddělení Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.) a primářce MUDr. Elišce Běbrové (Oblastní nemocnice Kladno, a.s.) za pomoc a praktické připomínky, které věnovali mé práci.

| | |
|--|-----------|
| Úvod | 8 |
| 1. Současný stav..... | 9 |
| 1.1. Kloubní náhrady | 9 |
| 1.1.1. Totální endoprotéza kyčelního kloubu | 10 |
| 1.1.1.1. Cementovaná náhrada | 10 |
| 1.1.1.2. Necementovaná náhrada..... | 11 |
| 1.1.1.3. Hybridní náhrada..... | 11 |
| 1.1.1.4. Hip resurfacing | 11 |
| 1.1.2. Totální endoprotéza kolenního kloubu..... | 12 |
| 1.1.3. Komplikace spojené s endoprotézami | 12 |
| 1.2. Bakteriální původci infekcí kloubních náhrad | 13 |
| 1.2.1. Grampozitivní koky | 13 |
| 1.2.1.1. Rod <i>Staphylococcus</i> | 13 |
| 1.2.1.2. Rod <i>Streptococcus</i> | 16 |
| 1.2.2. Gramnegativní tyčinky | 17 |
| 1.2.2.1. Čeleď <i>Enterobacteriaceae</i> | 17 |
| 1.2.2.2. Čeleď <i>Pseudomonadaceae</i> | 20 |
| 1.2.3. Anaerobní nesporulující bakterie..... | 21 |
| 1.2.3.1. Rod <i>Propionibacterium</i> | 21 |
| 1.2.3.2. Rod <i>Actinomyces</i> | 22 |
| 1.3. Bakteriální biofilm..... | 22 |
| 1.4. Laboratorní metody..... | 26 |
| 1.4.1. Kultivace | 27 |
| 1.4.2. Sonikace | 29 |
| 1.4.3. Metody pro průkaz biofilmu..... | 30 |
| 2. Cíle práce a hypotéza..... | 31 |
| 2.1. Cíl..... | 31 |
| 2.2. Hypotéza | 31 |
| 3. Metodika | 32 |
| 3.1. Metodika pro vyšetřování TEP..... | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.1. Laboratorní potřeby..... | 32 |
| 3.1.2. Typy materiálů dodávaných k vyšetření..... | 33 |
| 3.1.3. Odběr a transport..... | 34 |
| 3.1.4. Pracovní postup | 34 |
| 3.1.5. Inkubace a odečítání | 35 |
| 3.1.6. Identifikace..... | 35 |
| 3.1.7. Stanovení rezistence k AML | 36 |
| 4. Výsledky..... | 37 |
| 5. Diskuze | 43 |
| 6. Závěr | 45 |
| 7. Seznam použité literatury | 46 |
| 7.1. Publikované zdroje..... | 46 |
| 7.2. Elektronické zdroje | 49 |
| 7.3. Nepublikované zdroje..... | 49 |
| 8. Klíčová slova..... | 51 |
| 9. Přílohy..... | 52 |
| 9.1. Seznam příloh..... | 52 |

Úvod

Mikroorganismy se vyskytují v mnoha oblastech lidské činnosti. Jsou součástí našeho přirozeného prostředí. Běžně je využíváme (biotechnologie, potravinářství) a také někdy bohužel zneužíváme (bioterrorismus). V neposlední řadě zmiňme jejich vliv na zdraví člověka (lékařství). Pro většinu těchto oblastí je důležitá identifikace, charakterizace a kvantifikace mikroorganismů.

Mikroorganismy, kromě toho, že je k životu potřebujeme, jsou zároveň i stálým a trvalým nebezpečím ohrožujícím naše zdraví. V této práci se soustředíme na roli mikroorganismů u komplikací ortopedických náhrad. Právě mikroorganismy jsou nejčastější komplikací pooperačních stavů a příčinou případných reoperací.

Potřeba spolehlivé detekce příčiny komplikací ortopedických náhrad vedla v poslední době ke snaze najít takovou metodu, která by umožnila jejich co nejlepší diagnostiku. Nevýhodou klasických mikrobiologických metod je, že neumějí odhalit bakterie ukryté ve vrstvě biofilmu. Často tak nebyla u pooperační komplikace prokázána infekční etiologie procesu. Proto se zájem mikrobiologů soustředil na využití účinku ultrazvuku, konkrétně ultrazvukové lázně, která má napomoci k rozvolnění biofilmu a následnému uvolnění bakterií. Předpokladem je, že tato metoda přinese přesnější diagnostiku a hlavně zvýší záchyt bakterií spojených s pooperačními komplikacemi po implantacích kloubních náhrad.

Cílem této bakalářské práce je zavést na Oddělení lékařské mikrobiologie (dále OLM) Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s. metodu, která zkvalitní detekci infekcí kloubních náhrad. Z technických důvodů (ultrazvuková lázeň byla na OLM dodána později, než bylo plánováno, a reoperace kloubní náhrady je výkon velice ojedinělý) nebylo možno metodu zavést a vyzkoušet na vyoperovaných náhradách. Metoda byla proto, a nejen pro účely této bakalářské práce, popsána a zavedena zatím pouze s použitím dříve vyjmutých náhrad pro demonstraci. Pro praktické použití je nicméně plně připravena.

1. Současný stav

1.1. Kloubní náhrady

Od poloviny šedesátých let se implantace endoprotézy stala běžnou ortopedickou operací a je jedním z neúspěšnějších terapeutických postupů prováděných ortopedy. Podceňování této náročné operace, která je zásadním zásahem do organismu, však není na místě.⁽¹⁰⁾ U téměř 10 % implantovaných kloubních náhrad dojde během jejich existence ke komplikacím, což je provázeno nutností reoperovat část pacientů. Zejména se jedná o infekční komplikace nebo o uvolnění implantátu. Masové rozšíření totální náhrady kloubu v posledních třech desetiletích vedlo k nárůstu počtu revizních operací a postupnému rozvoji revizní endoprotetiky jako samostatné disciplíny.⁽⁷⁾

Nejobvykleji prováděné kloubní náhrady se týkají zejména kloubu kyčelního a kolenního. Hlavním důvodem je jejich nejčastější poškození, na druhém místě i fakt, že endoprotézy těchto kloubů mají dobrou možnost ukotvení umělých materiálů do masivní kosti a mají i dlouhodobou životnost. Endoprotézy se používají i u kloubů ramenních, loketních, hlezenních a drobných kloubů prstů. Endoprotézy mohou být tzv. totální, tedy úplné, které nahrazují všechny kloubní plochy poškozeného kloubu, nebo částečné, které nahrazují jen část poškozenou a které se používají jen v případě, že jiná část kloubu je ještě plně funkční.⁽²⁶⁾

Náhrada kloubu kloubem umělým je pacientům nabízena ve chvíli, kdy je jejich vlastní kloub poškozen úrazem nebo zánětlivým či degenerativním procesem vysokého stupně (3. – 4. stupeň artrózy). Takovéto poškození obtěžuje pacienta v běžných denních činnostech, kloub je velmi bolestivý, nelze se spolehnout na jeho nosnost, kloub je často oteklý a naplněný výpotkem.⁽²⁶⁾

Pacienti, kterým je kloub nabízen, mnohdy argumentují, že jsou již příliš staří na náročné operační výkony, nebo naopak chtějí ještě operaci odložit ze strachu z omezené životnosti umělých kloubních náhrad.

Oba tyto argumenty nejsou správné a je potřeba nechat na odborném posouzení ortopeda, kdy jsou výkony indikovány. Vzhledem k charakteru diagnóz, které operace vyžadují, jsou bezmála všichni pacienti ve vyšší věkové kategorii a o schopnosti podstoupit rozsahem skutečně zatěžující operace tedy nerozhoduje jejich věk, ale

závažnost přidružených chorob. Druhé skupině pacientů je často nutno zdůraznit, že vyčkávání i vlastní zbytečné utrpení často může vést k postupnému zhoršení anatomických poměrů v oblasti poškozeného kloubu, které pak následnou operaci velmi komplikují. Navíc s přibývajícím věkem a omezenou pohyblivostí přibývají nejen již zmíněné přidružené choroby, ale i míra nadváhy, která je pro pooperační rehabilitaci i mechanickou životnost endoprotéz mnohem nebezpečnější.⁽¹¹⁾

Při totální náhradě kloubu se používají speciálně upravené komponenty (protézy), vyrobené z vysoce pevného, biologicky kompatibilního, kovového a umělého materiálu. Kovovou část nejčastěji tvoří slitina kobaltu, chromu a molybdenu. Umělá hmota je z vysokomolekulárního polyetylenu. Tyto materiály jsou používány při totálních náhradách už zhruba 30 let a lidské tělo je velmi dobře snáší. Komponenty jsou velmi pečlivě vyráběny, povrch je pokaždé stejný, hladký a lesklý. Komponenty jsou do kosti upevněny speciální látkou (polymetylmetakrylátem), často nazývanou „kostní cement“. Alternativně mohou některé komponenty mít pórovitý povrch, do kterého může kost vrůstat.^(2, 11)

1.1.1. Totální endoprotéza kyčelního kloubu

1.1.1.1. Cementovaná náhrada

V roce 1962 Sir John Charnley použil malý (22 mm) nerezový ocelový balónek jako hlavičku, která byla nasazena na dřík vsunutý do stehenní kosti, jako náhrada stehenní (femorální) části kloubu a jamku z vysokomolekulární umělé hmoty, která nahradila pánevní část kloubu (acetabulum). Oba tyto komponenty byly upevněny do kosti pomocí tzv. kostního cementu. Několik generací vycházelo z těchto Charnleyho endoprotéz. V dnešní době je hlavička nabízena v různých velikostech a materiálech. Většina hlaviček je v současnosti vyráběna buď z kobalt-chromu, nebo z keramického materiálu. Na základě vědeckých výzkumů se však ukazuje, že dlouhodobé výsledky u mladších, aktivních pacientů s cementovanou náhradou nejsou uspokojivé. Po 10 – 15 letech totiž dochází u významného procenta operovaných k uvolňování jamky. Z tohoto důvodu není cementovaná náhrada vhodná pro mladé a aktivní pacienty.⁽²⁷⁾

1.1.1.2. Necementovaná náhrada

V současné době je všeobecně rozšířeno použití kloubních náhrad, které jsou speciálně konstruovány tak, aby mohly být implantovány do kosti bez použití cementu. Kost prorůstá do upraveného povrchu kovového implantátu. K tomuto záměru musí být kost pečlivě připravena, protože je nezbytný přesný kontakt implantátu s kostí.⁽²⁷⁾

1.1.1.3. Hybridní náhrada

O hybridní náhradě mluvíme tehdy, když je jeden komponent připevněn bez cementu, obvykle jamka, a jeden komponent je připevněn cementem, obvykle dřík. Tento typ nachází uplatnění stále častěji.⁽²⁷⁾

1.1.1.4. Hip resurfacing

Konstrukce implantátu se snaží maximálně anatomicky a biomechanicky přiblížit zdravému kyčelnímu kloubu. Je předpokládá se zde lepší funkce po operaci. Indikace Hip resurfacingu je možná u pacientů, u kterých nedošlo k velkým anatomickým změnám v oblasti kyčelního kloubu. Vhodná je rovněž u pacientů, u kterých je vzhledem k věku a úrovni pohybové aktivity implantace dříkové náhrady problematická, nebo je vyšší pravděpodobnost předčasného mechanického selhání.⁽²⁷⁾

Operace se provádí na boku, neresekuje se krček, opracovává se jen hlavice. Náhrada se tvarem a funkcí maximálně přibližuje fyziologické kyčli. Použité materiály mají dobrou odolnost vůči zátěži a nízký otěr (kov-kov bez PE). Je zde předpoklad dlouhé, někdy až doživotní funkce.⁽²⁷⁾

Hip Resurfacing je nová operační metoda řešení coxarthrosy, implantát dává svou konstrukcí předpoklad lepšího funkčního výsledku. Případné mechanické uvolnění lze dobře řešit implantací klasické endoprotézy. Je to metoda, která při vhodné indikaci a precizním technickém provedení navrácí pacienta do plnohodnotného aktivního života.⁽²⁷⁾

1.1.2. Totální endoprotéza kolenního kloubu

V současné moderní medicíně se při totální endoprotéze kolene nahrazují pouze poškozené kloubní plochy. Celé koleno není nahrazováno. Operace je v podstatě jen náhrada povrchu kloubu a kloubní chrupavky. Nejužívanější implantáty současnosti jsou tzv. kondylární náhrady, jejichž konstrukce umožňuje dosažení plného pohybu kloubu. Komponenty kopírují tvar kondylů na femuru a jsou zhotoveny převážně z chromkobaltové slitiny nebo ušlechtilé oceli. Taková náhrada pak kryje celou kloubní plochu femuru. Tibiální část implantátu kryje celou kloubní plochu tibie a je tvořena pevnou kovovou částí s různě utvářeným tvarem dřívku, který zajišťuje ukotvení v dřevnaté dutině tibie, a vloženou destičkou z polyetylenu, jejíž tvar určuje vnitřní stabilitu kloubu. Příkladem snahy o přiblížení k fyziologickému pohybu jsou náhrady s tzv. meniskovými prvky, které umožňují nejen rotace v kloubu, ale i částečný posun.⁽²⁷⁾

1.1.3. Komplikace spojené s endoprotézami

Všechny operace s sebou nesou potenciaální riziko, z tohoto důvodu musí být případné výhody a nevýhody pečlivě zváženy. Některé komplikace souvisí přímo s konkrétním operačním zákrokem a některé jsou spojeny s celkovým zdravotním stavem pacienta.

Nejčastějšími příčinami reoperací totální náhrady jsou rozvoj infekce v oblasti kloubu a tzv. aseptické uvolnění jedné či obou komponentů náhrady. Méně časté bývají poruchy jednotlivých komponentů náhrad.⁽⁷⁾

Nejzávažnější příčinou reoperace je infekční komplikace. Patogeneze závisí na interakcích mezi mikroorganizmem, implantátem a hostitelem, např. osídlením operační rány mikroorganizmy v průběhu operace nebo v časném pooperačním období, v tomto případě hovoříme o časně pooperační infekci.⁽¹³⁾ Průběh onemocnění a výsledek léčby jsou závislé na typu infekčního agens, na jeho virulenci, citlivosti k antibiotikům a na jeho schopnosti tvořit glykokalix a formovat biofilm v oblasti implantátu. Pokud se rozvine infekční komplikace v období několika měsíců až dvou let po operaci, je tento stav označován jako opožděná infekce.⁽¹⁰⁾

1.2. Bakteriální původci infektů kloubních náhrad

Jak jsme již zmínili, průběh onemocnění a výsledek léčby jsou závislé na typu infekčního agens, na jeho virulenci, citlivosti k antibiotikům a na jeho schopnosti tvořit glykokalix a formovat biofilm v oblasti povrchu implantátu.^(10, 16)

Nejčastějšími původci infekce kloubních náhrad jsou grampozitivní koky, zejména *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. Příčinou mohou být i gramnegativní tyčinky, zejména *Escherichia coli*, *Proteus species*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species* a *Serratia marcescens*. Ve smíšených infekcích se mohou vyskytovat i anaerobní bakterie, zejména *Propionibacterium acnes* a anaerobní streptokoky.^(4, 8)

1.2.1. Grampozitivní koky

1.2.1.1. Rod *Staphylococcus*

Dosud bylo popsáno celkem 50 druhů a poddruhů stafylokoků (údaj NRL pro stafylokoky z května 2008). V praxi se tradičně dělí na dvě hlavní skupiny podle své schopnosti koagulovat plazmu, a to na stafylokoky koaguláza-pozitivní a koaguláza-negativní.⁽²²⁾

Stafylokoky jsou grampozitivní koky velikosti asi 1 μ m, které se vyskytují jednotlivě nebo v nepravidelných shlucích tvaru hroznů („staphylé“ znamená řecky „hrozen“). Jsou nepohyblivé a netvoří spory. Pouzdro netvoří nebo jen omezeně. U některých, zejména mukoidních kmenů, lze ale prokázat i kapsulární antigeny. Stafylokoky jsou, až na výjimky, fakultativně anaerobní, kataláza-pozitivní a oxidáza-negativní bakterie. Mají respirační i fermentační metabolismus. Produkují mnoho enzymů a toxinů, které napomáhají jejich adherenci, průniku a množení ve tkáních, např. hyaluronidáza štěpí kyselinu hyaluronovou (základní složku mezibuněčné hmoty) a usnadňuje tak šíření stafylokoků ve tkáních. Stafylokoky často tvoří opouzdřená infekční ložiska (abscesy), do kterých špatně pronikají léčiva.^(3, 22)

1.2.1.1.1. Koagulázy-pozitivní

Staphylococcus aureus je bakterie dobře adaptovaná na život v lidském organismu. Její komplexní stěna a množství bílkovinných exoproduktů představují velký soubor antigenů a biologicky aktivních látek uplatňujících se jako faktory virulence.⁽³⁾

Člověk je od prvních dnů života kolonizován stafylokoky, ponejvíce na kůži rukou, perinea, kštic a na sliznici dýchacího a zažívacího traktu. Při rutinním vyšetření lze *S. aureus* prokázat v horních dýchacích cestách u 20 až 50 % osob. Asi třetina této pozitivní populace patří k trvalým nosičům a zbývající dvě třetiny k nosičům občasným. Pokud se ovšem využije speciální odběrové techniky, selektivních půd a opakovaných odběrů z různých míst organismu, stoupá záchytnost tohoto druhu vysoko, až ke 100 % populace. Nosičství stafylokoků zdravý organismus nepoškozuje, ale naopak působí jako imunizační stimulus, který vede k poměrně dobré odolnosti vůči infekci. K onemocnění dochází jen při oslabení obranných schopností a při poruše integrity kůže a sliznic.⁽³⁾

Zdrojem infekce je člověk, zdravý nosič nebo nemocný s otevřenou zánětlivou lézí. Přenos se děje vzdušnou cestou, přímým stykem i nepřímo. Možná je také endogenní infekce vlastním kmenem. Zvláště nebezpečné jsou stafylokokové infekce získané v nemocnicích. Lidský organismus je vůči stafylokokové infekci poměrně odolný. K onemocnění dochází zpravidla při oslabení organismu nebo při infekci velkou dávkou virulentního kmene. Významným predisponujícím faktorem může být chirurgický zákrok, úraz, umělá náhrada, zavedený katétr, diabetes, maligní onemocnění nebo imunologická nedostatečnost. Více ohroženi jsou také nedonošení novorozenci, kojenci a staří lidé.⁽²²⁾

V místě průniku infekce do organismu může dojít k dalšímu pomnožování stafylokoků, překonají-li lokální obranné mechanismy hostitele. Protože invazivitu buněk *S. aureus* podporují četné enzymy a toxiny, infekce může snadno pronikat hlouběji do okolních tkání. Zánětlivá léze je zpočátku charakterizována serózně-fibrinózní exudací, ke které se rychle přidružuje imigrace leukocytů. Infekce se tak mění v purulentní reakci, která má tendenci k nekrotickým změnám a proteolytické

kolikvaci. Stafylokoková invazivní onemocnění ve velké většině případů vytvářejí abscesová ložiska. Méně často se šíří bez ohraničení jako flegmonózní zánět.⁽²²⁾

Stafylokokové infekce mají sklon k recidivám nebo k chronickému průběhu, což má patrně příčinu v neobyčejně bohatém spektru faktorů virulence a ve značné odolnosti vůči lysozomálním enzymům a dočasném přežívání buněk *S. aureus* v makrofázích.

Ze zánětlivých lézí mohou bakterie pronikat do krevního řečiště. Dochází buď k dočasné bakteriémii, nebo k masivnějšímu intermitentnímu pronikání s celkovými symptomy sepse. Stafylokokové buňky mohou být zaneseny proudem krve do nejrůznějších míst makroorganismu, kde vznikají metastatická pyogenní ložiska. Může tak vzniknout sekundární pneumonie, osteomyelitida, endokarditida, meningitida, pyelonefritida nebo absces v kterémkoliv orgánu. Tyto metastatické infekce mohou výjimečně vycházet i ze zcela banálních infekcí nepatrného rozsahu.⁽²²⁾

1.2.1.1.2. Koaguláza-negativní

Staphylococcus epidermidis se vyskytuje na kůži a sliznicích lidí i zvířat jako součást jejich fyziologické mikroflóry. Nachází se také v bezprostředním okolí svých hostitelů a v potravinách živočišného původu.^(3, 22)

S. epidermidis je typický oportunní patogen, který napadá oslabené pacienty (v důsledku popálenin, těžkých úrazů, chirurgických zákroků a imunologické nedostatečnosti). V posledních letech stále přibývá onemocnění vyvolaných tímto druhem. Je to způsobeno častějším používáním náročných invazivních vyšetření, komplikovaných a dlouho trvajících chirurgických zákroků a léčebných metod spojených s imunosupresí.

Důležitým predisponujícím faktorem pro vznik infekce je přítomnost cizího tělesa. Jedná se především o předměty z umělých hmot, zavedených do těla pacientů lékařským zákrokem (katétry, cévní náhrady, umělé chlopně a kloubní náhrady atd.). Stafylokokové buňky velmi dobře adherují na povrchu umělých náhrad a katétrů. Do svého okolí přitom produkují polysacharidovou substanci, vytvářející kolem buněk slizovou vrstvu, která upevňuje adhezenci a zabraňuje průniku antibiotik, protilátka a

kontaktem s fagocyty. Kontaminující bakterie pocházejí z povrchu kůže a sliznic buď samotného pacienta, nebo ošetřujícího personálu. Mohou chronicky zaplavovat organismus a způsobovat sepse, endokarditidy, meningitidy nebo infekce močových cest.⁽³⁾

1.2.1.2. Rod *Streptococcus*

Grampozitivní, fakultativně anaerobní kokovité bakterie z čeledi *Streptococcaceae*, s typickým řetízkovitým uspořádáním, jejichž kolonie jsou i na obohacených půdách někdy velmi drobné. Jsou citlivé na vankomycin a mnohé na krevním agaru hemolyzují.

Většinou dělíme streptokoky dle hemolýzy, rozeznáváme hemolýzu beta, alfa a gama.⁽²²⁾ Beta-hemolýza se projevuje kolem kolonie streptokoka úplným projasněním erytrocytů v krevním agaru. Úplnou hemolýzu působí *Streptococcus pyogenes* a beta-hemolytické streptokoky skupin C, G a F. Neúplná hemolýza je typická pro *Streptococcus agalactiae*. Podstatou alfa-hemolýzy neboli viridace („viridis“ znamená latinsky „zelený“) je změna krevního barviva na zelený verdoglobin. Alfa-hemolýzu streptokoky vyvolávají tvorbou peroxidu vodíku a velice záleží na složení média a atmosféry, jestli se alfa-hemolýza vůbec projeví či nikoliv. V tomto případě pak označíme kmen za gama-hemolytický čili nehemolytický. Alfa-hemolýzu je vidět u *Streptococcus pneumoniae* a u skupiny tzv. viridujících streptokoků z dutiny ústní i u dalších skupin (např. *S. suis*, *S. anginosus* group apod.). Jak mezi viridujícími, tak beta-hemolytickými streptokoky se vyskytují kmeny nehemolytické, nejvíce ve skupině *Streptococcus bovis*.

Dále streptokoky rozdělujeme podle biochemických a fyziologických charakteristik. Sem patří zejména znaky sloužící k rozlišení streptokoků, jako jsou velikost kolonií a některé biochemické testy.

Důležitým kritériem sérologického třídění streptokoků je přítomnost skupinově specifického polysacharidu C. Je-li polysacharid C přítomen, pak umožňuje rozlišit antigenní skupiny A-Z dle Lancefieldové. Lékařsky významné streptokoky obsahují antigeny A (*S. pyogenes*), B (*S. agalactiae*), C (*Streptococcus dysgalactiae* ssp.

equisimilis a *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*), D (*S. bovis*), G (*S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*) a další.

Kritériem pro rozdělení streptokoků může být i patogenní působení a místo výskytu, potom je dělíme na pyogenní (kam se řadí zejména *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. equi*, *S. equisimilis*, event. *S. pneumoniae*), na streptokoky ústní (skupina se v podstatě kryje s označením streptokoky viridující), na enterokoky (pro něž byl vytvořen samostatný rod *Enterococcus*) a na laktokoky (sérologická skupina N). V poslední době se užívá dělení streptokoků jen na beta-hemolytické (nazývané souhrnně též pyogenní) a non-beta-hemolytické nebo též non-hemolytické.⁽²²⁾

Streptococcus pyogenes dle stěnového antigenu, který obsahuje N-acetylglusamin a ramnózu, patří mezi beta-hemolytické streptokoky do skupiny A. Pro člověka je primárně patogenní a člověk je jediným přirozeným zdrojem infekce. *S. pyogenes* je původcem faryngitid, spály, infekcí kůže a podkoží (pyoderma, erysipel), systémových infekcí, streptokokového toxického šoku a poststreptokokových následků. V patologickém materiálu a v mladých kulturách v tekutých půdách zůstávají seřazeni do řetízků složených z několika desítek jedinců. Velmi dlouhé řetízky se tvoří po delší inkubaci v tekuté půdě. Patří mezi růstově náročné bakterie, rostoucí na komplexních kultivačních půdách.⁽³⁾

Streptococcus agalactiae patří do skupiny B dle stěnového polysacharidového antigenu a je to také pyogenní streptokok. Je častou příčinou novorozeneckých sepsí a meningitid, komplikací v šestinedělí, hnisavých osteomyelitid, artritid a infekcí ran. Na krevním agaru vyvolává zpravidla beta-hemolýzu, za anaerobních podmínek tvoří žlutý pigment. *S. agalactiae* má pouzdro, které je významným faktorem patogenity, neboť brání bakterii před fagocytózou.⁽³⁾

1.2.2. Gramnegativní tyčinky

1.2.2.1. Čeleď *Enterobacteriaceae*

Některé bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* způsobují typická závažná onemocnění jako např. mor, tyfus, dyzenterii, salmonelózu. Ostatní jsou součástí normální střevní mikroflóry, kde se uplatňují i jako nutný symbiont makroorganismu.

Mohou se však uplatňovat i jako podmíněně patogenní mikroorganismy. Závažný je např. jejich značný podíl na nozokomiálních infekcích.⁽²²⁾

1.2.2.1.1. Rod *Escherichia*

Escherichia coli jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní, nesporulující rovné tyčinky, které se vyskytují jednotlivě nebo po dvou. Pohybují se pomocí bičíků nebo jsou nepohyblivé. *E. coli* je nejprozkoumanějším mikrobiálním druhem, neboť slouží jako modelový organismus pro biochemické, genetické a fyziologické studie.⁽³⁾

E. coli je běžnou součástí střevní mikroflóry zdravých lidí. Je komenzálem, částečně saprofytem a také symbiontem, neboť svým působením jednak znemožňuje průnik patogenů (produkuje tzv. koliciny, které jsou pro některé jiné bakterie toxické), jednak je makroorganismu prospěšná i přímo – podílí se na tvorbě některých vitaminů, především vitamin K.⁽²²⁾

Jde ale také o podmíněně patogenní bakterii, která může způsobovat i chorobné stavy. Ve střevě je to možné jen tehdy, když je kmen vybaven specifickými faktory virulence; mimo střevo je *E. coli* téměř vždy patogenní.⁽²²⁾

Patogenita *E. coli* se uplatňuje ve dvou typech onemocnění: extraintestinálním (zejména onemocnění močových cest, septická onemocnění, infekce ran, hnisavé procesy) a při infekcích v gastrointestinálním traktu provázených průjmy (což platí jen pro určité kmeny).

U infekcí v močovém traktu se uplatňují především ty kmeny, které mají tzv. P-fimbrie, jimiž adherují na sliznici močových cest. Uropatogenní *E. coli* je vůbec nejčastějším původcem uroinfekcí.⁽³⁾

V zažívacím traktu se určité kmeny *E. coli* uplatňují jako patogeny s různými mechanismy, podle kterých se tyto tzv. enteropatogenní kmeny dělí do čtyř skupin. Enteropatogenní *E. coli* (v užším slova smyslu) – EPEC, které vyvolávají novorozenecké průjmy, při kterých dochází velmi rychle k dehydrataci organismu.⁽³⁾ Patogenetickým mechanismem je těsná vazba bakterií s enterocyty střeva, při čemž dochází k rozpouštění mikrokloků (mikrovili). Konečným důsledkem je potom poškození

epiteliálního povrchu ve střevě. Druhou skupinou jsou enterotoxigenní *E. coli* – ETEC, které kolonizují tenké střevo pomocí kolonizačních faktorů, což jsou proteinové fimbrie (druhově specifické). Mohou také produkovat dva typy enterotoxinů. Enterotoxigenní *E. coli* mohou vyvolat průjemy jak u dětí, tak u dospělých. Vyskytují se převážně ve velmi teplých oblastech a do této skupiny patří i tzv. cestovatelské průjemy. Třetí skupina, enteroinvazivní *E. coli* – EIEC, mají podobný mechanismus patogenity jako shigely, tj. pronikají do buněk a množí se v nich. Infekce těmito kmeny vede ke krvavým průjmům. Poslední skupina, enterohemoragické *E. coli* – EHEC, mají podobný mechanismus adherence jako enteropatogenní kmeny, ale váží se převážně v tlustém střevě. Navíc jsou producenty toxinu, který se označuje jako podobný shigelovému (shiga-like toxin), nebo verotoxinu. Kmeny EHEC působí tzv. hemoragickou kolitidu s krvácením, u některých nemocných se může vyvinout i hemolyticko-uremický syndrom.⁽³⁾

1.2.2.1.2. Rod *Klebsiella*

Klebsiely jsou nepohyblivé gramnegativní tyčinky, většinou výrazně opouzdřené polysacharidovým pouzdrem. Žijí ve vodě a v půdě, u člověka se vyskytují v dýchacím a zažívacím traktu. Ze šesti druhů jsou nejznámější: *Klebsiella pneumoniae*, častý původce pneumonie, *Klebsiella ozaenae*, původce vlekého zánětu nosní sliznice, *Klebsiella rhinoscleromatis* a druh *Klebsiella oxytoca*.^(3, 22)

Jedná se o podmíněný patogen, působí však závažná onemocnění respiračního a močového traktu, u dětí meningitidy. Závažná je pro svou častou polyrezistenci na antibiotika. Je i častou příčinou nozokomiálních nákaz, a tak se může uplatnit i u pooperačních infekcí ran.⁽²²⁾

1.2.2.1.3. Rod *Proteus*

Nápadnou vlastností je plazivý růst, tvoří uzavřené kolonie. Patří sem druhy: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* a *Proteus penneri*. Jde o saprofyty dokonale přizpůsobené k likvidaci organických zbytků v odpadcích. Vyskytují se v půdě, na

roślinách, ve stolici lidí a zvířat. Nejsou přítomni v každém lidském střevě jako běžná flóra. Patogenem bývají spíše mimo střevo, zejména v močových cestách, ale objevují se jako sekundární infekce i v ranách či dekubitech.⁽³⁾

1.2.2.1.4. Rod *Enterobacter*

Je pohyblivá opouzdřená gramnegativní tyčinka, vyskytuje se v půdě, ve vodě, někdy v zažívacím traktu, může vyvolat infekci močových cest a může se uplatnit podobně jako klebsiely i jako významné nemocniční agens. Nejčastěji se identifikují *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, ojedinelé i *Enterobacter sakazakii*.⁽³⁾

1.2.2.1.5. Rod *Serratia*

Svým způsobem života připomínají gramnegativní nefermentující tyčinky. Najdeme je spíše ve vnějším prostředí než ve střevě, např. v půdě nebo ve vodě. Vzdorují dezinfekci a jsou výraznými nozokomiálními patogeny. Typickým zástupcem je druh *Serratia marcescens*. Většinou jde o kmeny pigmentované (chrání se před sluncem) cihlově červeně, ale některé kmeny jsou nepigmentované, pak se mohou snad přehlédnout anebo jsou chybně identifikovány. Tvoří proteinázy a lipázu. Mohou způsobovat různé infekce, např. dýchací či infekce ran, často v nemocničním prostředí.⁽³⁾

1.2.2.2. Čeleď *Pseudomonadaceae*

1.2.2.2.1. Rod *Pseudomonas*

Pseudomonas aeruginosa se vyskytuje hojně v různých vodách včetně odpadních, v půdě, ve stolici domácích zvířat i lidí. V čisté vodě se nemnoží. Ve velkém množství může zamořovat nemocniční prostředí, kde s oblibou kontaminuje katétry, infuzní roztoky, dýchací přístroje, kloubní náhrady apod. Buňky bývají obaleny slizovou vrstvou, nemají pouzdro. Je přítomen i v hnisu, který díky jeho přítomnosti je zbarven do modrozelená.^(3, 22)

Na patogenitě se ze strany mikroba uplatňují jednak faktory vázané na bakteriální buňku (extracelulární polysacharid, slizová vrstva, stěnový lipopolysacharid), jednak extracelulární produkty (enzymy, toxiny, pigment).⁽³⁾

Přestože tato bakterie disponuje širokou řadou virulentních faktorů, vyvolává infekci jen při snížení lokální nebo celkové odolnosti organismu (u zdravého člověka ve zvláště kontaminovaném prostředí může dojít ke kolonizaci, avšak nevznikne onemocnění). Podmínkami vzniku onemocnění jsou defekty fagocytózy, rozsáhlé popáleniny, maligní procesy (hlavně leukémie), podávání cytostatik, imunosupresiv, kortikoidů, dlouhodobé podávání antibiotik, které umožní osídlení rezistentními pseudomonádami, těžké operativní výkony, dlouhodobé zavedení cévních katétrů nebo katétrů do močových cest, diabetes. Závažná je infekce u nemocných cystickou fibrózou, kdy dýchací cesty jsou kolonizovány mukoidními kmeny s vysokou produkcí proteolytických enzymů. Z povrchové kolonizace může vzniknout systémové onemocnění.⁽³⁾

1.2.3. Anaerobní nesporulující bakterie

Vyskytují se ve smíšených infekcích do 10 % a jsou pravděpodobně hlavními původci tzv. mitigovaných infekcí, proto je třeba při revizních operacích mít k dispozici i možnost anaerobního transportu odebraného materiálu k mikrobiologickému vyšetření.

1.2.3.1. Rod *Propionibacterium*

Příslušníci rodu jsou součástí běžné mikroflóry kůže, dutiny ústní a nosohltanu, gastrointestinálního a urogenitálního traktu. Mohou se uplatnit při smíšených endogenních anaerobních infekcích, vzácně při sepsích. Patří k nejčastěji nalézaným nesporulujícím anaerobům v klinickém materiálu. K nejvýznamnějším patří *Propionibacterium acnes*. Je znám jako jedna z příčin acne juvenilis, bývá však izolován i z hemokultur při endokarditidách a sepsích, z katétrů apod.⁽²²⁾

1.2.3.2. Rod *Actinomyces*

Sdružuje velmi pleomorfní mikroorganismy tvořící dlouhá větvená vlákna s tendencí k terminální fragmentaci na kokovité či kokobacilární útvary. Pro vlákna aktinomycet je charakteristické větvení ve tvaru Y nebo V. Spleť vláken připomíná mycelium hub. Vlákna mají tendenci se rozpadat v tyčinky až koky. Aktinomycety svým vzhledem připomínají plísňe. Jejich stěna obsahuje druhově specifický peptidoglykan a také mykolové kyseliny, což je poněkud přibližuje k mykobakteriím. Nález aktinomycety v hnisu ve společenství s jinými bakteriemi je vždy vysoce podezřelý a znamená zpravidla (bez ohledu na ostatní flóru), že jde o aktinomykózu, i když aktinomyceta je ve směsi ve výrazné menšině. Nejvýznamnějším druhem je *Actinomyces israelii*, aktinomykózu u člověka však mohou vyvolat i další druhy, jako např. *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces meyeri* a další.⁽²²⁾

1.3. Bakteriální biofilm

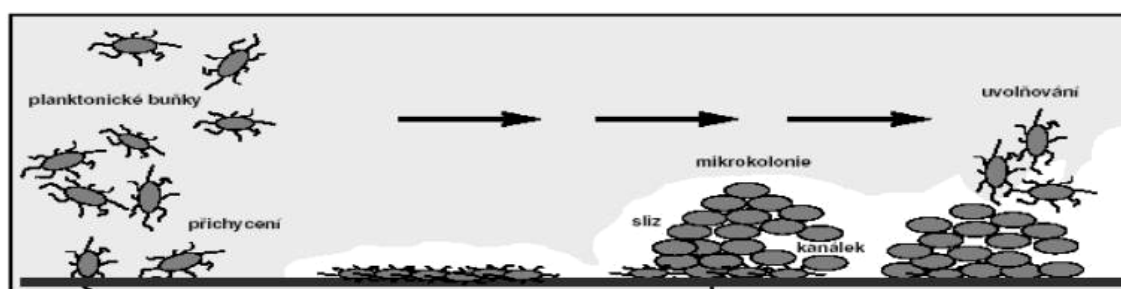
Díky své fenotypové přizpůsobivosti představují bakterie nejúspěšnější formu existence života na Zemi.⁽¹⁸⁾ Tradičně byly bakterie považovány za individuální organismy rostoucí a žijící v homogenní planktonické populaci. Nicméně bakterie se v přirozeném prostředí většinou vyskytují přichyceny na pevném povrchu a mezi sebou navzájem v ochranném filmu sekretovaných polymerů. Ukazuje se, že existence v biofilmu je pro bakterie z mnoha důvodů výhodnější a ve většině prostředí je také základním způsobem jejich existence. Bakterie v biofilmu získávají ochranu matrix proti účinku protilátek a fagocytů. Tyto „frustrované fagocyty“ pak způsobují většinu destrukcí měkkých tkání při chronickém zánětu.⁽¹⁰⁾

Biofilm není homogenní, skládá se z agregátů a četných dutin. Z pozorování a měření byl vytvořen model architektury a funkce biofilmu. Bakterie jsou v něm rozloženy nerovnoměrně, rostou v mikrokoloniích (shlucích bakterií kuželovitého nebo houbovitého tvaru). Mikrokolonie jsou spojeny spletími, vzájemně propojenými kanálky rozmanitého tvaru. Většími mikrokoloniemi kanálky procházejí, jsou však

tenčí, představují jakési póry. Na povrchu je biofilm omýván kapalinou obsahující molekuly živin. Ta proniká i do biofilmu a póry se dostává až do nitra mikrokolonií.⁽⁵⁾

Biofilm jediného bakteriálního druhu má jednodušší stavbu než biofilm obsahující společenství více druhů. V přirozeném prostředí je ovšem společenství více druhů obvyklejší. Tloušťka biofilmu závisí na dostupnosti živin a na tom, zda je složen z jednoho bakteriálního druhu nebo více druhů. Naměřené hodnoty tloušťky biofilmu kolísají od několika až po stovky mikrometrů.⁽⁵⁾

Tvorba biofilmu je komplexní proces, přičemž prvním krokem je adheze mikroorganismů na povrch. Jestliže pohybující se (planktonické) buňky hladovějí, přichytí se svými aktivními molekulami (adheziny) na nějaký pevný povrch, který skýtá dostatečný přísun živin. Adheziny mohou být molekuly látek různé povahy – bílkoviny, glykopeptidy, polysacharidy. Při přichycení se uplatňují i bičíky, fimbrie nebo curli (nový typ fimbrií). Biofilm je elastický a když jeho elasticita nestačí udržet buňky pohromadě, odtrhávají se (viz Obr. 1).^(18, 24)

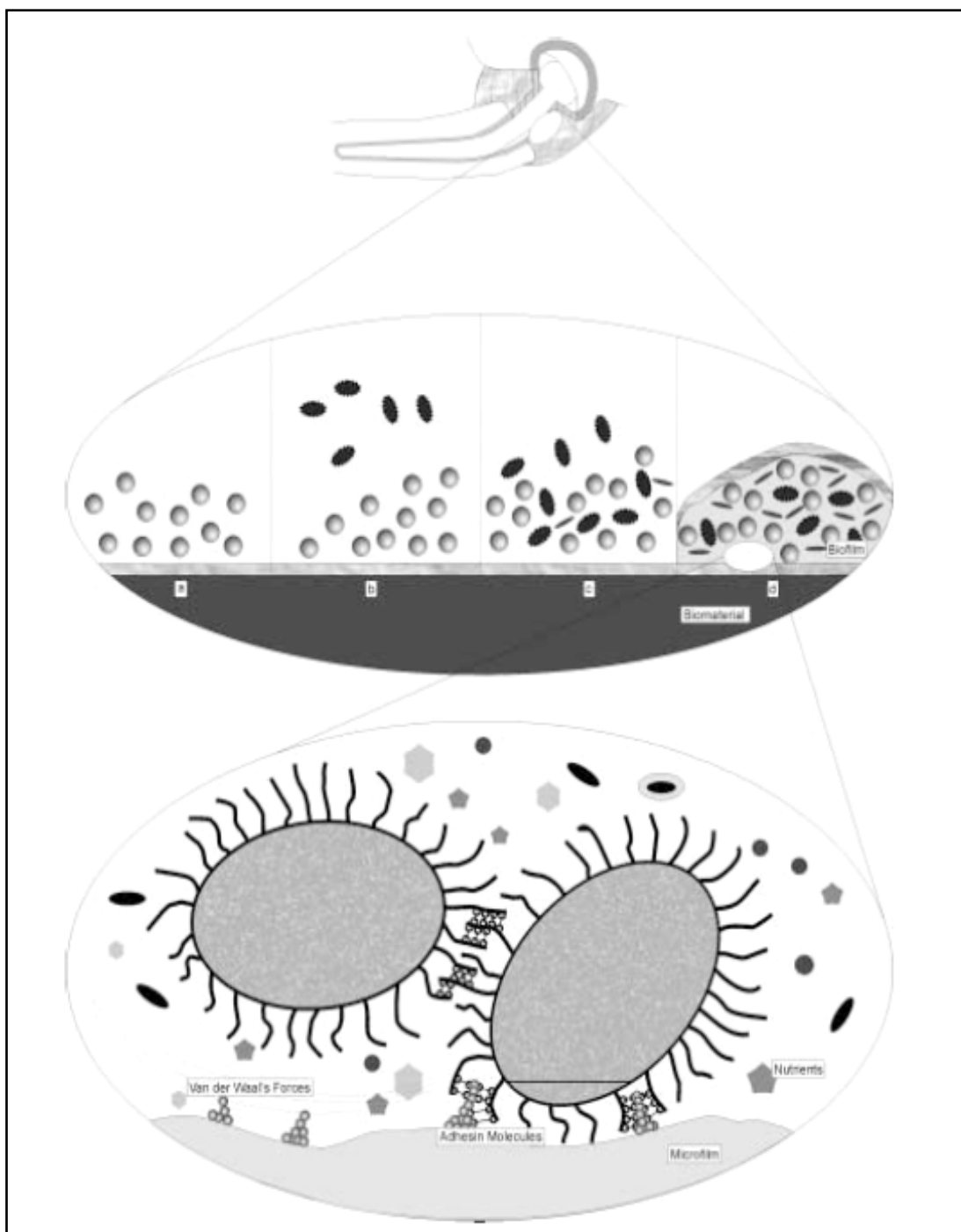


Obr. 1: Vznik a struktura biofilmu.⁽¹⁸⁾

Bakteriální adheze na pevné povrchy je zprostředkována pomocí elektrostatických, van der Waalsových a hydrofobních interakcí. Ty jsou určeny na základě fyzikálně-chemických povrchových vlastností, především hydrofobicity a elektrického náboje bakteriální buňky a substrátu.

Mechanismus vzniku bakteriálního biofilmu je nastíněn v Obr. 2. Ihned po vložení protézy je povrch pokryt množstvím makromolekul nebo buněk (a). Upravený film nebo i čistý povrch protézy je kolonizován bakteriemi: vzduchem, operativně, kůží nebo krevní cestou (b). Nespecifická bakteriální adheze je tvořena van der Waalsovými

silami, kyselým prostředím, elektrostaticky a dalšími interakcemi (c). Biofilm je nezvratně přichycen k biomateriálu přes specificky četné vazby (hlavně adheze molekul) (d). Zralý bakteriální biofilm je zapouzdřený v množství fibrózní tkáně.⁽⁹⁾



Obr. 2: Vznik bakteriálního biofilmu⁽⁹⁾

Po pevném přichycení (ireverzibilní adhezi) k povrchu změní bakterie své chování, změní se jejich fenotyp. Bakterie začnou produkovat do prostředí velké množství polysacharidu, který je podobný škrobu a také má podobné lepivé vlastnosti. Hmotnost polysacharidu může být až stokrát větší než hmotnost bakteriálních těl, jež ho produkují. Tato hlenová matrice obsahuje kromě polysacharidu i proteiny a nukleové kyseliny. Matrice drží buňky pohromadě a vytváří lešení, v němž se buňky množí. Tvoří se mikrokolonie. Zároveň vznikají kanálky a již zmíněná složitá struktura. V husté populaci používají buňky chemické signály, jimiž upozorňují okolní buňky na svou přítomnost. Signální látky jsou jednoduché molekuly složené z mastné kyseliny a aminokyseliny serinu. U grampozitivních bakterií jsou to peptidy, jež lze přirovnat k hormonům. Řídí dělení buněk, a tím hustotu populace v biofilmu, a tvorbu hlenové matrice.^(14, 6)

Některé buňky se také z mikrokolonií na určitý impuls odlučují, přecházejí do planktonického stavu (odplouvají) a kolonizují další části povrchu. Příčinou může být konkurence a neúnosnost další existence ve společenství. Chemické signály vycházející z buněk a umožňující buňkám zjišťovat existenci okolních buněk prostě dalšímu zhušťování populace zabrání. Tento jev se označuje termínem „*quorum sensing* systém“.⁽¹⁴⁾

Zdánlivě prostý jev usazování bakteriálního povlaku je spojen s komplikovanou souhrou mnoha genů. Nutno ovšem říci, že biofilm byl většinou studován u gramnegativních mikrobů. Je to snazší, protože tyto bakterie jsou lépe vybaveny pro přichycení na povrchu. Biofilm tvoří ovšem i grampozitivní bakterie, např. stafylokoky, které jsou původci hnisavých povrchových i celkových infekcí.⁽¹⁸⁾

Za normálních podmínek je biofilm v lidském organismu pravidelně přítomen jako zubní plak. Je víceméně fyziologický, vzniká přirozeně. Lze ho sice odstranit, ale vždy se vytvoří znovu.

Biofilm vytvořený ve tkáních může být ohniskem infekce, která by mohla kdykoliv propuknout. Vytváří se zejména v nekrotických tkáních, ve žlučových cestách, při infekci kostní dřeně, při zánětu prostaty nebo při cystické fibróze. Zde masa slizu produkovaná zejména *Pseudomonas aeruginosa* a příbuznými bakteriemi ucpává

dýchací cesty. Nejčastěji tvoří biofilm stafylokoky, pseudomonády, *Escherichia coli*, někdy streptokoky. Biofilm bývá příčinou chronické infekce, jejíž příznaky nejsou tak zřetelně vyjádřeny jako při infekci akutní.⁽¹²⁾

Biofilm se snadno tvoří na dlouhodobě zavedených katétrech, tracheálních cévkách a na umělých implantátech jako jsou umělé srdeční chlopně, kardiostimulátory, umělé kloubní náhrady apod.⁽¹⁷⁾

Naneštěstí patří k základní charakteristice biofilmu, že buňky jsou velmi odolné k antimikrobním látkám a dezinfekcím. Údajně jsou buňky biofilmu vůči antibiotikům až tisíckrát odolnější než buňky planktonické.⁽⁵⁾

Vysvětlení zvýšené rezistence se stále hledá. Jako první se nabízí možnost, že je difuze antibiotika snížena hustým prostředím polysacharidové hmoty. Hraje tu roli i sorpce, avšak antibiotikum po určité delší době přece jen do biofilmu pronikne. Další možností je, že buňky jsou v biofilmu převážně v klidovém stavu, množí se velmi pomalu, hladovějí a antibiotika, která působí jen na buňky rostoucí, zde neúčinkují. Mechanismus zvýšené rezistence nebyl doposud uspokojivě vysvětlen. Zatím lze tedy pouze shrnout, že jde o jednu z fenotypových změn, které jsou pro buňky charakteristické.⁽¹⁸⁾

1.4. Laboratorní metody

Pro diagnostiku infekcí kloubních náhrad se používají tyto materiály: punktát, tekutina z drénu, stěr z kultivační rány, tkáň z okolí implantátu, vyjmutá kloubní náhrada.^(4, 1)

Senzitivita mikrobiologického vyšetření punktátu (mikroskopické i kultivační vyšetření aerobní i anaerobní flóry) je uváděna v rozmezí 60 až 97 %. Kloubní aspirace je vhodná pod ultrasonografickou kontrolou. Kultivace z tekutiny z drénu nebo konce drénu není vždy směrodatná a nekoreluje s etiologií.⁽⁴⁾

Peroperační odběr má význam u reoperace. Stěr z operační rány se kultivuje aerobně i anaerobně. Doporučuje se odebírat vedle punktátu nebo stěru více vzorků tkáně z okolí implantátu, a to do redukované (např. dusíkaté) atmosféry, do hermeticky uzavřené nádoby. Je nezbytné provádět tzv. prodlouženou desetidenní kultivaci.⁽⁴⁾

Zdokonalení mikrobiologického vyšetření se předpokládá při zavedení ultrazvukového odstraňování glykokalixu v kultivačním médiu z povrchu vyjmutých implantátů, čímž by se významnou měrou měl zvýšit záchyt mikroorganismů perzistujících v biofilmu a neprokazatelných kultivačně klasicky zpracovanými odběry.^(4, 16, 21)

1.4.1. Kultivace

Kultivace bakterií je umělé množení bakterií, které provádíme na bezbuněčných kultivačních (živných) půdách. Účelem kultivace je získání čisté kultury mikroba z vyšetřovaného vzorku. Čistá kultura je předpokladem pro úspěšnou biochemickou, sérologickou, nebo i další identifikaci vypěstovaného izolátu bakteriální kultury.⁽²³⁾

Fyzikálně-chemické podmínky kultivace:

- 1. Přítomnost vody** – je nutnou podmínkou pro vstřebávání živin. Tuto podmínku splňují půdy tekuté i půdy pevné.
- 2. Optimální pH** – u většiny půd se pH upravuje na pH 7,2 – 7,4.
- 3. Izotonie kultivačního prostředí** – se zajišťuje přidáním NaCl do většiny kultivačních půd (0,5 %).
- 4. Optimální plynná atmosféra** – pro kultivaci aerobů a fakultativních anaerobů je s atmosférickou koncentrací kyslíku; anaeroby vyžadují bezkyslíkaté prostředí (anaerobní kultivace).

Anaerobní kultivace. Podmínkou pro anaerobní kultivaci mikrobů je nízký oxidoredukční potenciál kultivačního prostředí, neboť u anaerobů neprobíhají při nevhodném redox-potenciálu fosforylační reakce, které jsou nezbytné pro získání energie. U striktních anaerobů je limitující potenciál -200 mV, u méně náročných anaerobů se pohybuje v rozmezí 0 až +150 mV, kdežto půdy pro aerobní kultivaci mají hodnotu redox-potenciálu asi +300 mV.

Redukčního prostředí (záporné hodnoty redox-potenciálu) dosahujeme v tekutých a polotuhých půdách použitím čerstvě připravené a rychle ochlazené půdy, nebo jejím povařením po dobu 20 minut a rychlým ochlazením těsně před použitím, dále přidavkem redukujících chemických substancí (nejčastěji kyseliny thioglykolové nebo její sodné soli, cysteinu, glukózy, redukovaného železa) nebo rozemleté živočišné tkáně (svalovina, játra, mozek). Lze využít i přidání malého množství agaru (0,1-0,3%), který podstatně omezuje difuzi vzdušného kyslíku do půdy. Takto redukované tekuté a polotuhé půdy se chrání před oxidací převrstvením povrchu sterilním parafinovým olejem. U pevných (agarových) půd používáme média čerstvě připravená nebo regenerovaná těsně před použitím a inkubujeme v anaerobní nádobě (anaerostatu).⁽²⁵⁾

5. Optimální teplota – při hodnocení závislosti růstu na teplotě se udávají tři důležité teploty: minimální, maximální a optimální. Minimum je nejnižší teplota, při které se zastavuje růst příslušného mikrobiálního druhu, podobně maximum je nejvyšší teplota, při níž se růst zastaví, ale po ochlazení na nižší teplotu dále pokračuje. Optimum je pak tepelný bod, při kterém je rychlost růstu bakterií maximální. Medicínsky významné bakterie a většina možných kontaminant patří do skupiny mezofilů, jejichž optimální teplota je v rozmezí 30 až 40°C. Proto se většinou naočkované půdy v laboratořích lékařské mikrobiologie inkubují při teplotě 35°-37°C. Při této teplotě ponecháváme naočkované půdy v inkubátoru (biologickém termostatu) s automatickou regulací teploty po dobu 24 – 48 hodin až několik týdnů, podle růstové intenzity mikrobiálního druhu.⁽²⁵⁾

6. Nároky bakterií na živiny – většina bakterií patří mezi mikroorganismy chemoheterotrofní. Ty jsou závislé na zdrojích chemické energie a využívají organické sloučeniny jako hlavní zdroj uhlíku. Jejich požadavky na živiny splňují kultivační půdy, které obsahují různé soli, kovové ionty, cukry, aminokyseliny, vitamíny a jiné růstové faktory. Kultivační půda má svým

složením zajistit získání růstově optimální a vzhledově charakteristické kultury bakterií.⁽²⁵⁾

1.4.2. Sonikace

Sonikace je prováděná v ultrazvukové lázni (např. Kraintek 25KE). Jde o běžné modely ultrazvukových lázní, které jsou osazeny ultrazvukovými generátory od firmy KLN Ultraschall GmbH. Jedná se o řadu modelů s digitální regulací (možnost nastavení výkonu ultrazvukového generátoru). Všechny modely mají nerezový plášť. Modely řady KE mají elektronickou regulaci intenzity ultrazvukového pole, výkon generátorů lze odstupňovat po 10 %, takže se lze mnohem lépe přizpůsobit podmínkám daného pokusu. Také časovač je elektronický a lze volit automatické vypnutí v čase od 0 do 90 minut. Nastavené hodnoty se kontrolují na displeji. Lze nastavit deset různých programů. Nastavené i aktuální hodnoty se zobrazují na displeji. Ohřev lázně je možný od +30 do +80 °C.⁽²⁹⁾

Závěsné košíky k lázním firmy Kraintek se u laboratorních van staví na dno. Jsou opatřeny nožičkami z tvrdého chemicky odolného plastu, aby nedošlo k poškrábání dna vany. U van průmyslových jsou koše v provedení jak s nožičkami tak v závěsu. Koše k lázním jsou celonerezové, dno tvoří nerezová síťovina s velikostí oka 7x7 mm. Na zakázku lze dodat koše ve speciálním provedení potažené plastem. Toto provedení je nutné při čištění či jiné práci s výrobky s leštěným povrchem, chrání čištěné předměty před poškrábáním.⁽²⁹⁾

Teorie čištění = sonikace

Obecně lze čištění charakterizovat jako proces rozpuštění a odstraňování nečistoty, po kterém následuje většinou oplach a sušení, případně pasivace či konzervace. Čištění rozlišujeme na mezioperační a finální.^(29, 21)

1.4.3. Metody pro průkaz biofilmu

Lze rozdělit na metody genotypové a metody fenotypové, avšak ne všechny jsou vhodné pro mikrobiologickou praxi. Pomocí genotypových metod se prokazují geny zodpovědné za adhezi mikrobiálních buněk k povrchům nebo geny zodpovědné za syntézu extracelulární matrix. Tyto metody však indikují pouze potenciální schopnost tvořit biofilm. Skutečná tvorba biofilmu u vyšetřovaného kmenu se prokazuje metodami fenotypovými.⁽¹⁷⁾

Genotypové metody

Použití molekulárně biologických metod je u většiny mikroorganismů komplikováno poměrně velkým počtem genů, které se mohou na tvorbě biofilmu podílet. U stafylokoků se prokazují geny extracelulární matrix operonu, zodpovědné za tvorbu klíčové složky biofilmu – extracelulární polysacharidové substance, nejčastěji pomocí PCR.⁽¹⁹⁾ U ostatních mikroorganismů, např. u kvasinek, pneumonád, enterobakterií a enterokoků, nebyly vzhledem ke složitosti celého procesu prokázány geny s takovou klíčovou úlohou při tvorbě biofilmu, jako mají např. geny extracelulární matrix operonu u stafylokoků. Molekulárně biologické metody bývají spíše využívány k výzkumným účelům.⁽¹⁷⁾

Fenotypové metody

Mezi nejčastěji používané fenotypové metody patří postupy prokazující tvorbu biofilmu na stěně kultivační nádoby, např. Christensenova zkumavková metoda, případně její modifikace. Také je možno prokázat schopnost tvorby extracelulární polysacharidové substance, např. u stafylokoků pomocí kultivace na agaru s kongo červení. Dále je možno použít např. mikroskopické techniky a další laboratorní postupy, jako jsou elektromigrační techniky.⁽¹⁷⁾

2. Cíle práce a hypotéza

2.1. Cíl

Cílem této bakalářské práce je zavést novou metodu pro zlepšení diagnostiky infekcí totálních náhrad kloubů na OLM Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.

2.2. Hypotéza

Při komplikacích spojených s nesprávnou funkcí ortopedické náhrady je vyšetřován vzorek, ve kterém nemusely být prokázány bakterie. V takovém případě se jedná o aseptickou komplikaci, ale toto může být i nesprávná diagnóza, neboť bakterie se mohou ukrývat ve vrstvě biofilmu a potom je běžnými metodami nelze prokázat.

Avšak pomocí nové metody, které napomáhá ultrazvuková lázeň, se biofilm rozruší a mohou být odhaleny bakterie, které jsou v něm ukryty. Tím může být zvýšen záchyt původců infektů ortopedických náhrad.

3. Metodika

3.1. Metodika pro vyšetřování TEP

3.1.1. Laboratorní potřeby

- **ultrazvuková lázeň 150 W / 50 Hz**

Jde o ultrazvukovou lázeň Kraintek 25KE z produkce slovenského výrobce, které jsou osazeny ultrazvukovými generátory od firmy KLN Ultraschall GmbH. Je to řada modelů s digitální regulací (možnost nastavení výkonu ultrazvukového generátoru), které mají nerezový plášť. Viz příloha č. 1 – 4.

- **sterilní skleněné dózy vhodných rozměrů s nerezovými víčky**

Viz příloha č. 5 – 7.

- **sterilní kádinky o obsahu 250 ml a 500 ml**

Kádinky jsou překryté alobalem, aby byl zamezen přístup bakterií po sterilním ošetření. Viz příloha č. 8.

- **sterilní plastové kontejnerky se šroubovacím uzávěrem nebo sterilní zkumavky** pro přepravu materiálu. Viz příloha č. 10.

- **25 % Ringerův roztok, aqua pro inj.**

Těmito tekutinami jsou plněny dózy a kádinky, ve kterých jsou materiály vyšetřovány.

- **sterilní destilovaná voda**

Vodou se plní ultrazvuková lázeň dle návodu. Viz příloha č. 11.

- **kultivační média**

1. krevní agar č. 3 a č. 4

Samotný agar je sušená hydrofilní substance získaná z mořské řasy (*Agar agar*). Přidává se v 1,5 až 5 % koncentraci do půd k jejich zpevnění. Ve vodném prostředí připravovaného média znovu váže vodu (bobtná), získaná rosolovitá hmota se při 100° > C rozváří a tuhne mezi 25 – 60°C. Různé druhy peptonů, agarů a extraktů jsou komerčně dostupné.

2. agar pro kultivaci anaerobních mikrobů

Běžné tekuté pomnožovací půdy pro anaeroby jsou východiskem pro přípravu pevných půd. Je to například VL – bujón (VL je odvozeno z francouzského výrazu „viande-levure“, tj. „maso-*kvasničný*“) nebo Schaedler bujón. Vyznačují se nízkým oxidoredukčním potenciálem. To se dociluje mimo jiné jejich obohacením o redukující látky, jako jsou hemin a cystein apod. Vyskytuje se i pevné agarové verzi..

3. selektivní média

Selektivní pomnožovací půdy jsou tekutá média, obsahující inhibiční složku(y), která(é) inhibuje(i) v množení nežádoucí skupiny bakterií a přitom umožňuje(i) růst hledané skupině mikrobů nebo přímo bakteriálnímu rodu či druhu.

4. agar pro mykologickou kultivaci

Mykologické půdy jsou speciální půdy tekuté i pevné – k nejnámějším patří Sabouraudova půda, jedná se o selektivní půdu pro houby, obsahuje pepton, agar a cukry (glukózu nebo maltózu) s pH 5,0. Dále to mohou být Zapek-Dox, kvasnicový agar, Littmanova půda a mycose agar. Inkubují se po dobu 10 – 30 dnů při teplotě 25°C. (Eventuálně další dle pokynů lékaře.)

- **sterilní pomůcky (rukavice, nůžky, pinzeta, špičky)**
- **automatická pipeta**
- **třepačka**

3.1.2. Typy materiálů dodávaných k vyšetření

- pevné komponenty endoprotézy, viz příloha č.12 – 29.
- tkáň, popř. tekutina z bezprostředního okolí endoprotézy
- stěr a aspirát z operační rány

3.1.3. Odběr a transport

Odběr je třeba provádět před nasazením ATB terapie.

- ***Pevné komponenty endoprotézy***

Všechny komponenty endoprotézy jsou po vyjmutí na operačním sále uloženy separátně do sterilních rukavic a v anaerobním válci v mikroaerofilní až anaerobní atmosféře dodány, co nejrychleji do laboratoře. Viz příloha č. 9.

- ***Tkáň, popř. tekutina z bezprostředního okolí endoprotézy***

Jsou odebrány standardním způsobem do sterilního plastového kontejneru se šroubovacím uzávěrem nebo do sterilní zkumavky a jsou dodány co nejrychleji do laboratoře, současně s pevnými komponenty endoprotézy v anaerobním válci.

- ***Stěr a aspirát***

Jsou odebrány standardním způsobem na tampon zanořený ve Stuartově mediu a aspirát do anaerobního transportního systému v injekční stříkačce pro rutinní aerobní a anaerobní kultivaci a dodány co nejrychleji do laboratoře.

3.1.4. Pracovní postup

- ***Pevné komponenty endoprotézy***

Před zahájením práce vydezinfikujeme UV lázeň a naplníme vanu lázně sterilní destilovanou vodou po dno závěsného košíku lázně.

Z anaerobního válce vyjmeme sterilně komponenty endoprotézy a vložíme do sterilních skleněných nádob se 100ml 25% Ringerova roztoku (dřík do podélné skleněné dózy, acetabulum do kádinky), nádoby zakryjeme ihned sterilními víčky nebo sterilním alobalem. Takto připravené nádoby umístíme do závěsného košíku UV lázně. Do vany UV lázně doplníme opatrně sterilní destilovanou vodu do výše hladiny Ringerova roztoku ve skleněných nádobách. Viz příloha č. 30 – 31.

UV lázeň zapneme na 5 minut bez nastavení teploty. Po sonikaci odebíráme sterilně z roztoku v jednotlivých nádobách automatickou pipetou po 0,5 ml a

inokulujeme tuhá media tak, že inokulum na tuhých půdách nerozočkováváme, pouze rozlijeme po povrchu agaru.

Bujon dále vyočkováváme 7. a 14. den inkubace na pevné půdy a ty inkubujeme v 35 – 37 °C po dobu 48 – 72 hodin.

- ***Tkáň, popř. tekutina z bezprostředního okolí endoprotézy***

Ke tkáni přidáme 5 ml 25 % Ringerova roztoku a homogenizujeme 3 minuty na třepačce (1000 kmitů).

Po homogenizaci odebíráme sterilně z roztoku po 0,5ml a postupně inokulujeme tuhá a tekutá media.

Bujon dále vyočkováváme 7. a 14. den inkubace na pevné půdy a ty inkubujeme v 35 – 37 °C po dobu 48 – 72 hodin.

- ***Stěr a aspirát***

Naočkujeme po dodání do laboratoře na sadu pevných půd a do bujónu. Bujon dále vyočkováváme 7. a 14. den inkubace na pevné půdy a ty inkubujeme v 35 – 37 °C po dobu 48 – 72 hodin.

3.1.5. Inkubace a odečítání

1. Inkubace se provádí při 35 – 37 °C aerobně a anaerobně.
2. Primárně naočkované pevné půdy odečítáme 1. až 7. den.
3. 8. – 10. den a 15. – 17. den od začátku kultivace ještě odečítáme pevné půdy, na které byly vyočkovány bujony.

3.1.6. Identifikace

1. Mikroskopicky v barvení dle Grama.
2. Orientační identifikace izolovaných mikroorganismů probíhá pomocí jednoduchých testů, podrobná identifikace izolovaných mikroorganismů podle pokynů odečítajícího lékaře pomocí biochemických řad a aglutinačních sér,

eventuálně pomocí komerčně vyráběných identifikačních sad, např. LACHEMA, REMEL, latexové ID testy různých výrobců atd.

3.1.7. Stanovení rezistence k AML

Izolovaný mikroorganismus testujeme vždy difuzní diskovou metodou, sadu ATB vybíráme dle pokynů odečítajícího lékaře. Dle pokynu odečítajícího lékaře případně dále testujeme i MIC.

Vzhledem k dlouhodobé kultivaci je nezbytně nutná důsledná kontrola sterility používaných kultivačních médií.

4. Výsledky

Do roku 2008 byly v Nemocnici Jindřichův Hradec, a.s. na Oddělení lékařské mikrobiologie pro průkaz septických komplikací kloubních náhrad používány standardně metody kultivačního vyšetřování tkáně, popř. tekutiny z bezprostředního okolí endoprotézy, dále stěr z rány a aspirát (viz Tab.1, Graf 1).

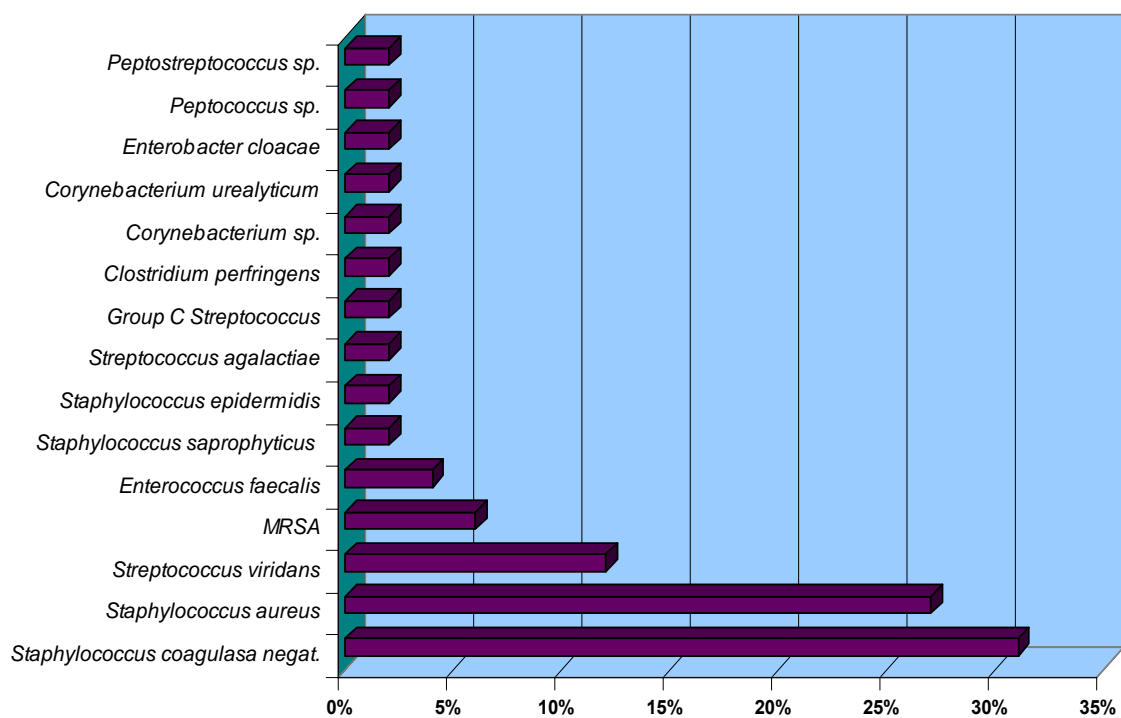
Tab. 1: Záchyt bakterií standardně používanými metodami od 1. 1. do 31. 12. 2007

| Etiologické agens | Absolutní počet | Materiál |
|--|------------------------|------------------------------|
| <i>Staphylococcus coagulasa negat.</i> | 16 | PUKO, SHLF, SKYC, VRAN |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 14 | PUKL, PUKO, PURA, VRAN, VYPO |
| <i>Streptococcus viridans</i> | 6 | PUKO, SKKL, SKYC, VRAN, VYPO |
| <i>MRSA</i> | 3 | SKUZ, VRAN |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 2 | SKUZ |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 1 | VRAN |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | VRAN |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | VRAN |
| <i>Group- C Streptococcus</i> | 1 | VRAN |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 1 | VRAN |
| <i>Corynebacterium sp.</i> | 1 | VRAN |
| <i>Corynebacterium urealyticum</i> | 1 | VRAN |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 1 | VRAN |
| <i>Peptococcus sp.</i> | 1 | VRAN |
| <i>Peptostreptococcus sp.</i> | 1 | VRAN |
| Celkem | 51 | |

Zdroj: Vlastní výzkum

Tab. 1 znázorňuje absolutní počet vyskytujících se bakterií, které byly nalezeny za rok 2007 při použití standardně používaných metod. Celkem bylo zpracováno 51 vzorků, které byly odebrány při ortopedických zákrocích, a to např. punktát kloubní (PUKL), punktát kloubní z kolena (PUKO), punktát kloubní z ramene (PURA), dále stěr z hlavice femuru (SHFL), stěr z kolenního kloubu (SKKL), stěr z kůže (SKUZ), stěr z kyčle (SKYC), výtěr z rány (VRAN) nebo výpotek (VYPO).

Graf 1 znázorňuje procentuální výskyt jednotlivých bakterií u souboru 51 pacientů, kteří byli vyšetřováni standardně používanými metodami. Nejčastěji se vyskytují dále uvedená etiologická agens: koaguláza-negativní *Staphylococcus* v 31%, *Staphylococcus aureus* v 27 %, *Streptococcus viridans* ve 12 %, MRSA (Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*) v 6 %, *Enterococcus faecalis* ve 4 % . Ostatní se vyskytovala po 2%, např. *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Group-C Streptococcus*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium sp.*, *Corynebacterium urealyticum*, *Enterobacter cloacae*, *Peptococcus sp.*, *Peptostreptococcus sp.*



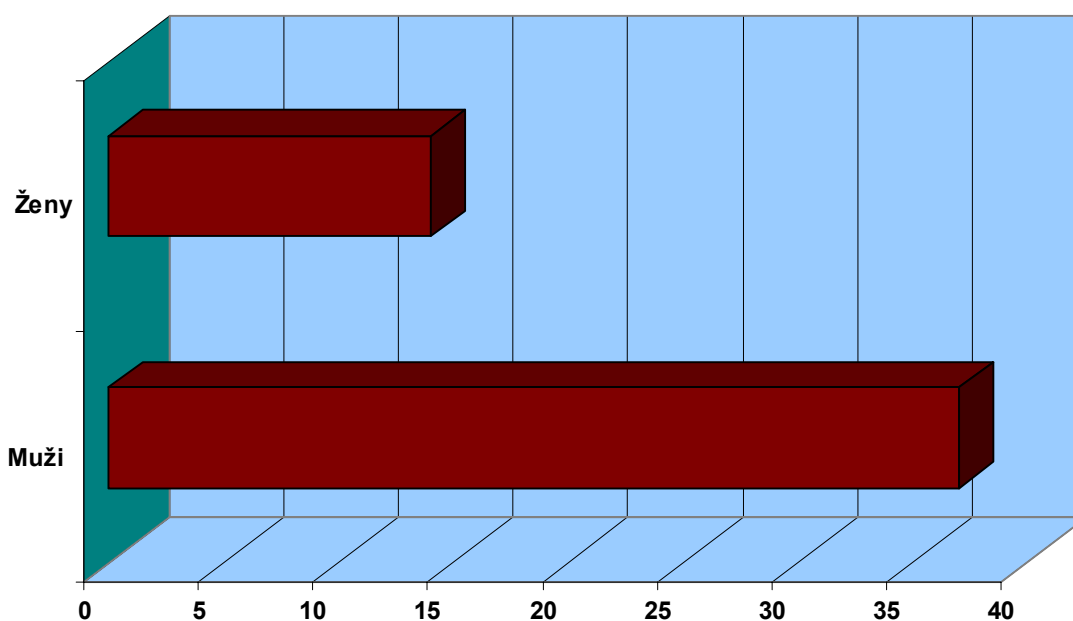
Graf 1: Výskyt jednotlivých agens

Zdroj: Vlastní výzkum

Pro zlepšení diagnostiky jsme zavedli novou metodu s využitím sonikace, která pomocí ultrazvuku rozvolní biofilm, a tím je možno lépe prokázat výskyt bakteriálních původců kloubních náhrad.

Tato metoda je založena na přímém vyšetření vyjmutých kloubních náhrad – endoprotéz při tzv. reoperaci. Reoperace je ojedinělá, a proto nebylo možné získat tyto náhrady v době vymezené pro tuto práci (viz Graf 2, 3, 4). Proto se v závěru odkazují na mezioborové semináře Třeboň 2007 a Třeboň 2008.

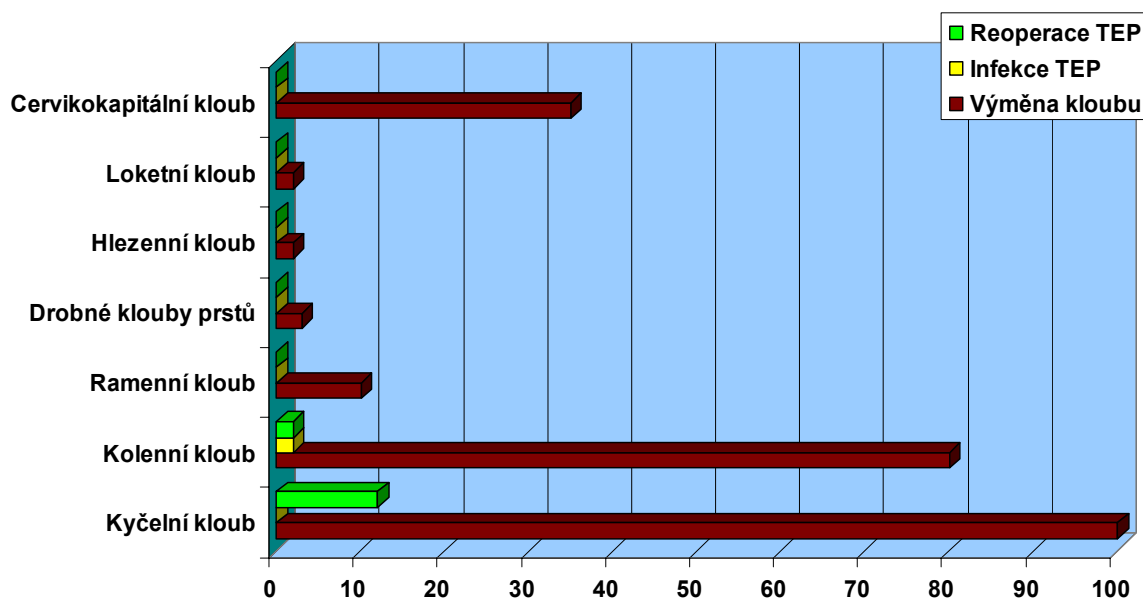
Graf 2 znázorňuje soubor 51 pacientů, z kterých bylo 37 mužů a 14 žen, kterým byl odebrán vzorek z operační rány po ortopedickém zákroku. Průměrný věk u mužů byl 54 let a u žen 73 let.



Graf 2: Počet vzorků od jednotlivých pohlaví

Zdroj: Vlastní výzkum

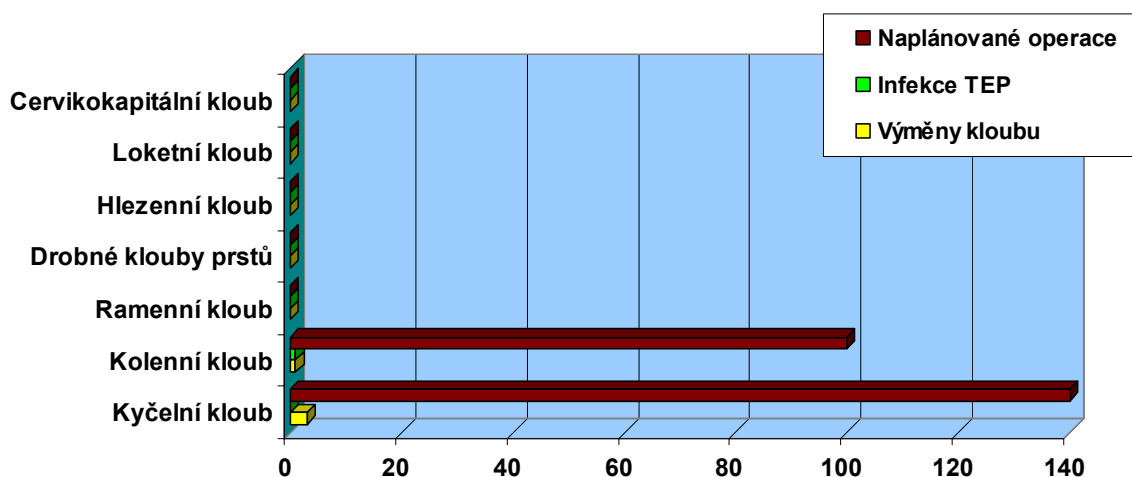
Graf 3 znázorňuje srovnání počtu operací výměn kloubů s operacemi infekční TEP a s reoperací TEP. Dohromady proběhlo 232 operací, při nichž byl vyměněn kloub za kloubní náhradu, z toho bylo 100 kyčelních kloubů, 80 kolenních kloubů, 10 ramenních kloubů, 3 drobné klouby prstů, 2 hlezenní klouby, 2 loketní klouby a 35 cervikokapitálních kloubů při zlomenině femorálního krčku. Dále jsou v grafu vyznačeny operace infikovaných totálních kloubních náhrad, které byly za rok 2007 jen 2, a to kolenního kloubu. A v neposlední řadě jsou zde znázorněny reoperace totálních kloubních náhrad, kterých se v roce 2007 udělalo celkem 14, přičemž se jednalo o 12 kyčelních kloubů a o 2 kolenní klouby.



Graf 3: Operace TEP za rok 2007

Zdroj: Vlastní výzkum

Graf 4 znázorňuje operace, při kterých byl vyměněn kloub do května 2007, a to ve čtyřech operacích. Z toho 3 kyčelní klouby a jeden kolenní kloub. V grafu je zmíněna jedna operace infikované totální kloubní náhrady, a to kolenního kloubu, provedená do května 2008. Dále je zde plán operací výměn kloubu, který je dán od pojišťovny, která tyto výkony proplácí.



Graf 4: Operace TEP za rok 2008

Zdroj: Vlastní výzkum

Na mezioborových seminářích Třeboň 2007 a Třeboň 2008 referovala MUDr. Eliška Běbrová o dlouhodobých výsledcích mikrobiologických vyšetřování suspektních infekcí kloubních náhrad, kdy metodikou s použitím ultrazvuku zpracovali vzorky od pacientů s diagnózou aseptické uvolnění kloubů, u nichž nebyly evidovány projevy celkové ani lokální infekce a s odstupem byla u nich potom provedena reimplantace kloubu.⁽³³⁾

Z obou příspěvků jednoznačně vyplynulo, že:

- **relativně vysoké procento pozitivních kultivací** bakteriálních kmenů izolovaných z vyňatých endoprotéz od pacientů s diagnózou aseptického uvolnění kloubů, u nichž nebyly evidovány projevy celkové ani lokální infekce,

při použití popsané sonikační metody a prakticky negativní výsledky ze standardně zpracovaných vzorků nasvědčují tomu, že metodika s použitím ultrazvuku umožňuje zdokonalení detekce infekčních agens, která mohou být následně příčinou komplikací po reimplantacích kloubních náhrad

- je tedy **jednoznačně vyšší záchyt po sonikaci a rozrušení biofilmu než před sonikací**
- **zachycené kmeny odpovídají literárním údajům** o nejčastějších původcích, kteří zmíněné komplikace vyvolávají
- **nálezy koaguláza-negativních stafylokoků jsou spojeny spíše s aseptickým uvolněním kloubních náhrad**, zatím co nálezy *Staphylococcus aureus* jsou obvykle spojené se septickým uvolněním

5. Diskuze

Infekce kloubních náhrad a tím i jejich diagnostika je velmi obtížná, ale v dnešní době se tímto problémem zabývá čím dál více odborníků, nejen z řad mikrobiologů a ortopedů, ale i mnoho dalších. O této problematice proběhla řada prezentací, mimo jiné i na mezioborových seminářích v Třeboni v letech 2007 a 2008, dále se tato problematika prezentovala na konferenci o septických komplikacích v ortopedii v Českých Budějovicích v roce 2006.

My jsme se zaměřili na zvýšení zachytu infekčního agens při komplikacích kloubních náhrad zavedením nových metod. Z Tab. 1 je zřejmé, že pomocí standardně používaných metod bylo zachyceno z celkového počtu 51 vzorků 31 % koaguláza-negativní *Staphylococcus*, 27 % *Staphylococcus aureus*, 12 % *Streptococcus viridans*, 6 % Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, 4 % *Enterococcus faecalis* a ostatní se vyskytovaly po 2 % jako byly *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalantiae*, *Group-C Streptococcus*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium sp.*, *Corynebacterium urealyticum*, *Enterobacter cloacae*, *Peptococcus sp.*, *Peptostreptococcus sp.*

Z nedostatku materiálu a díky ojedinelosti operace na výměnu endoprotézy, jak je zřejmé z Grafu 3 (znázorňuje počet operací infikovaných totálních kloubních náhrad, které byly za rok 2007 jen 2, a to kolenního kloubu, a reoperace totálních kloubních náhrad, kterých se v roce 2007 udělalo celkem 14, z toho 12 kyčelních kloubů a 2 kolenní klouby), nemohla být zavedená metodika v době zpracování této bakalářské práce ověřena praxí. Proto odkazuji na mezioborové semináře Třeboň 2007 a Třeboň 2008, kde referovala MUDr. Eliška Běbrová (práce prováděná týmem Běbrová, Pilnáček v Oblastní nemocnici Kladno, a.s.; zatím nepublikováno⁽³³⁾) o dlouhodobých výsledcích mikrobiologických vyšetřování suspektních infektů kloubních náhrad. Se zaměřením na metodiku s použitím ultrazvuku zpracovali vzorky od pacientů s diagnózou aseptického uvolnění kloubů, u nichž nebyly evidovány projevy celkové ani lokální infekce, s odstupem byla u nich potom provedena reimplantace kloubu.

Z těchto sdělení jednoznačně vyplynulo relativně vysoké procento pozitivních kultivací bakteriálních kmenů izolovaných z vyňatých endoprotéz od pacientů

s diagnózou aseptického uvolnění kloubů. Při použití popsané sonikační metody, prakticky negativní výsledky ze standardně zpracovaných vzorků nasvědčují tomu, že metodika s použitím ultrazvuku umožňuje zdokonalení detekce infekčních agens, která mohou být následně příčinou komplikací. Je tedy jednoznačně vyšší záchyt po sonikaci a rozrušení biofilmu, než před sonikací. Zachycené kmeny odpovídají údajům o nejčastějších původcích, kteří zmíněné komplikace vyvolávají, známým ze starších studií. Nálezy koaguláza-negativních stafylokoků jsou spojeny spíše s aseptickým uvolněním kloubních náhrad, zatímco nálezy *Staphylococcus aureus* jsou obvykle spojené se septickým uvolněním.

Z celé řady publikací také vyplývá, že díky sonikační metodě, která rozrušuje biofilm z povrchu implantátu, je zvýšená senzitivita kultivace, při které se vykultivuje širší spektrum bakterií, které bylo ukryto pod povrchem biofilmu (např. práce M. Tunney^(20, 21)). Dále se shodují výsledky i z prací L. L. Nguyen, kde autor zmiňuje použití ultrazvuku k rozvolnění biofilmu a kde také dochází k závěru, že se u asepticky diagnostikovaných komplikací kloubních náhrad vyskytuje množství bakterií.⁽¹⁶⁾ Především uvádí bakterie koaguláza-negativní *Staphylococcus a Staphylococcus aureus*.

6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zavést novou metodu pro zlepšení diagnostiky infekcí totálních náhrad kloubů na OLM Nemocnice Jindřichův Hradec a.s.

Pro zlepšení diagnostiky byla zavedena nová metoda sonikace, která za pomoci ultrazvuku rozvolní biofilm a tím je možné lépe prokázat výskyt bakteriálních původců kloubních náhrad.

Jelikož byla tato metoda zavedena v nemocnici v Jindřichově Hradci až na počátku roku 2008, nebylo možné ji vyzkoušet přímo na vyoperovaných kloubních náhradách. K využití metody sonikace kloubní náhrady je nutno vyjmout endoprotézu z těla, což je ovšem případ ojedinělé reoperace (viz Graf 3, 4).

Metoda byla v praxi nacvičena pouze na dříve vyjmutých demonstračních náhradách, ale ověřena v praxi bude z výše uvedených technických důvodů až v následujících měsících. Předpokládáme, že naše praktické výsledky potvrdí výsledky sdělené na mezioborových seminářích Třeboň 2007 a Třeboň 2008, kde referovala o dlouhodobých výsledcích mikrobiologických vyšetřování suspektních infektů kloubních náhrad MUDr. Eliška Bébrová (Bébrová, Pilnáček-Kladno), a výsledky publikované ve starších studiích (viz výše v textu práce).

S Oddělením lékařské mikrobiologie Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s. budu i nadále pokračovat ve spolupráci na této problematice a výsledky budeme v budoucnu publikovat (po 1 – 2 letech, podle počtu zpracovaných vzorků).

7. Seznam použité literatury

7.1. Publikované zdroje

1. BAHRS, Ch., MARSHAL, M., WEISE, K., et al. Acute Musculoskeletal Infection: Comparison of Different Methods for Intraoperative Bacterial Identification. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*. Praha: Galén, 2006, roč. 73, s. 237-242. ISSN 0001-5415.
2. BARTONÍČEK J. Pokroky v operační léčbě zlomenin. *Sanquis*. Praha: 2006, č. 46, s. 16-23. ISSN 1213-8118.
3. BEDNÁŘ, M., FRÁŇKOVÁ, V., SCHINDLER, et al. *Lékařská mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Triton, 1996. 560 s. ISBN 80-2380-297-6.
4. ČECH, O., DŽUPA, V. *Revizní operace náhrad kyčelního kloubu*. 1. vyd. Praha: Galén, 2004. 234 s. ISBN 80-7262-269-2.
5. ČERNOHORSKÁ, L., VOTAVA, M. Biofilmy a jejich význam v lékařské mikrobiologii. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. Praha: 2002, roč. 51, č. 4, s. 161-164. ISSN 1210-7913.
6. DONLAN, R. M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Mikrobiological Process. *Clinical Infectious Diseases*. Chicago: 2001, roč. 33, s. 1387–92. ISSN 1058-4838.
7. DŽUPA, V. Revizní endoprotetika kyčelního kloubu. *Sanquis*. Praha: 2006, č. 46, s. 24-28. ISSN 1213-8118.
8. GALLO, J., KOLÁŘ, M., KOUKALOVÁ, D., SAUER, P. Bakteriální původci periprotetických infekcí a možnosti jejich diagnostiky. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. Praha: 2006, roč. 12, č. 3, s. 117-123. ISSN 1211-264X.

9. GALLO, J., KOLÁŘ, M., NOVOTNÝ, R., et al. Pathogenesis of prosthesis-related infection. *Biomedical Papers*. Olomouc: 2003, roč. 147, č.1, s. 27-35. ISSN 1213-8118.
10. JAHODA, D., LANDOR, I., NYČ, J., et al. Moderní trendy v léčbě infekcí kloubních náhrad. *Sanquis*. Praha: 2007, č. 50, s. 32-35. ISSN 1213-8118.
11. JAHODA, D., LANDOR, I., NYČ, J., et al. Moderní trendy v léčbě infekcí kloubních náhrad. *Sanquis*. Praha: 2007, č. 51, s. 43-46. ISSN 1213-8118.
12. JAHODA, D., LANDOR, I., SOSNA, A., et al. Infekce kloubních náhrad. *Sanquis*. Praha: 2000, č. 8, s. 18-22. ISSN 1212-6535.
13. LANDOR, I., VAVŘÍK, P., JAHODA, D. Obecné principy léčby infekce kloubních náhrad. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*. Praha: Galén, 2005, roč. 72, s. 183-190. ISSN 0001-5415.
14. LEV, J. Biofilmy. *Biologické listy*. Praha: 2003, roč. 68, č. 1, s. 15-36. ISSN 0366-486.
15. MARIANI, B. D., TUAN R. S. Advance in the diagnosis of infection in prosthetic joint implants. *Molecular Medicine Today*. Tarrytown, NY: 1998, roč. 4, č. 5, s. 207-213. ISSN 1357-4310.
16. NGUYEN L. L., NELSON C. L., SACCENTE M., et al. Detecting bacterial colonization of implanted orthopaedic devices by ultrasonication. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. Philadelphia: 2002, roč. 403, s. 29-37. ISSN 0009-921X.
17. RŮŽIČKA F., HOLÁ V., VOTAVA M. Možnosti průkazu tvorby biofilmu v rutinní mikrobiologické praxi = Methods for detection of biofilm formation in routine

microbiological praktice. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. Praha: 2006, roč. 55 , č. 1 , s. 23-29. ISSN 1210-7913.

18. SCHINDLER, J. Mikrobiální biofilm – Jak žijí bakterie v přirozeném prostředí? *Vesmír*. Praha: 2001, roč. 80, s. 203-206. ISSN 1214-4029.

19. TRAMPUZ, A., STECKELBERG, J. M., OSMON, D. R., et al. Advances in the laboratory diagnosis of prosthetic joint infection. *Reviews in Medical Microbiology*. Glasgow: 2003, roč. 14, s. 1-14. ISSN 1473-5601.

20. TUNNEY M. M., PATRICK S., CURRAN M. D., et al. Detection of Prosthetic Hip Infection at Revision Arthroplasty by Immunofluorescence Microscopy and PCR Amplification of the Bacterial 16S rRNA Gene. *Journal of Clinical Mikrobiology*. Washington, DC: 1999, roč. 37, č. 10, s. 3281-3290. ISSN 0095-1137.

21. TUNNEY M. M., PATRICK S., GORMAN S. P., et al. Improved detection of infection in hip replacements: A currently underestimated problem. *Journal of Bone and Joint Surgery*. Boston, MA: 1998, roč. 80, č. 4, s. 568-572. ISSN 1535-1386.

22. VOTAVA, M., et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

23. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. Brno: Neptun, 2001. 247 s. ISBN 80-86850-00-5.

24. VOTAVA, M. Mikrobiální biofilm a jeho význam v lékařství. *Praktický lékař*. Praha: 2002, roč. 82, č. 9, s. 522-525. ISSN 0032-6739.

7.2. Elektronické zdroje

25. Kultivace bakterií, bakteriologické půdy, podmínky inkubace, vznik a morfologie bakteriálních kolonií, růstové fáze, množení bakterií v tekutých médiích. Selektivní pomnožení a izolace bakterií.

http://fv1.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum_03/index.html, 10. 12. 2007.

26. Náhrada kloubu – endoprotéza.

<http://www.tornero-ul.cz/nahrada-kloubu.php>, 10. 12. 2007.

27. Totální endoprotéza kyčelního a kolenního kloubu.

<http://www.orthes.cz/thr.htm>, 10. 12. 2007.

28. Podrobnosti o bakteriích produkujících toxiny.

<http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/bakterie.php>, 14. 4. 2008.

29. Ultrazvukové laboratorní vany.

<http://www.kraintekczech.kvalitne.cz/indexcz.html>, 25. 3. 2008.

30. Kloubní náhrady primární.

<http://www.biomet.cz/?cat=1>, 24. 4. 2008.

31. Aloplastika.

<http://www.beznoska.cz/>, 24. 4. 2008.

7.3. Nepublikované zdroje

32. Balejová, M. Infekce kloubních náhrad – možnosti mikrobiologické diagnostiky (nepublikovaný příspěvek, prezentován na Mezioborovém semináři Třeboň 2008, 7.-9. 1. 2008).

33. Bébrová, E., Pilnáček, J. Zpracování kloubních náhrad v mikrobiologické laboratoři (nepublikovaný příspěvek, prezentován na Mezioborovém semináři Třeboň 2008, 7.-9.1. 2008).

8. Klíčová slova

- kloubní náhrady
- reimplantát
- infekční komplikace
- biofilm
- bakterie
- ultrazvuková lázeň
- kultivace

9. Přílohy

9.1. Seznam příloh

- Příloha č. 1 Ultrazvuková lázeň Kraitek 25 KE
- Příloha č. 2 Ultrazvuková lázeň Kraitek 25 KE
- Příloha č. 3 Digitální regulace ultrazvukové lázně
- Příloha č. 4 Košík v ultrazvukové lázni
- Příloha č. 5 Skleněná dóza s nerezovým víkem a s kolenními komponenty
- Příloha č. 6 Skleněná dóza s nerezovým víkem a s kolenními komponenty
- Příloha č. 7 Skleněná dóza s nerezovým víkem a s kyčelními komponenty
- Příloha č. 8 Sterilní kádinky
- Příloha č. 9 Sterilní plastové kontejnerky s kloubními náhradami v rukavicích
- Příloha č. 10 Sterilní plastové kontejnerky se šroubovacím uzávěrem
- Příloha č. 11 Hladina destilované vody v ultrazvukové lázni
- Příloha č. 12 Oxford unipartmentální náhrada kolena (BIOMET CZ, s.r.o.)
- Příloha č. 13 Totální náhrada kolenního kloubu (Beznoska s.r.o., Kladno)
- Příloha č. 14 Totální náhrada kolenního kloubu (Beznoska s.r.o., Kladno)
- Příloha č. 15 AGC-RTG zobrazení náhrady (BIOMET CZ, s.r.o.)
- Příloha č. 16 AGC-RTG zobrazení náhrady (BIOMET CZ, s.r.o.)
- Příloha č. 17 AGC tibiální komponent (BIOMET CZ, s.r.o.)
- Příloha č. 18 AGC tibiální komponent (BIOMET CZ, s.r.o.)
- Příloha č. 19 AGC femorální komponent (BIOMET CZ, s.r.o.)
- Příloha č. 20 AGC femorální komponent (BIOMET CZ, s.r.o.)
- Příloha č. 21 Komponent pro femur (Beznoska s.r.o., Kladno)
- Příloha č. 22 Dual Articular 2000 revizní náhrada kolen. kloubu (BIOMET CZ, s.r.o.)
- Příloha č. 23 Jamka kyčelního kloubu standard-cementovaná (Beznoska s.r.o., Kladno)
- Příloha č. 24 Müller cementovaná acetabulární náhrada (BIOMET CZ, s.r.o.)
- Příloha č. 25 Zářezová necementovaná acetabulární náhrada (BIOMET CZ, s.r.o.)
- Příloha č. 26 Kovová hlavička (BIOMET CZ, s.r.o.)
- Příloha č. 27 Keramická hlavička (BIOMET CZ, s.r.o.)

Příloha č. 28 BiMetric femorální komponent (BIOMET CZ, s.r.o.)

Příloha č. 29 Endoprotéza cervikokapitální kyčel. kloubu cementovaná (Beznoska s.r.o.,
Kladno)

Příloha č. 30 Dóza v ultrazvukové lázni

Příloha č. 31 Dóza s náhradami v ultrazvukové lázni



Příloha č. 1 Ultrazvuková lázeň Kraitex 25 KE



Příloha č. 2 Ultrazvuková lázeň Kraitex 25 KE



Příloha č. 3 Digitální regulace ultrazvukové lázně



Příloha č. 4 Košík v ultrazvukové lázni



Příloha č. 5 Skleněná dóza s nerezovým víkem a s kolenními komponenty



Příloha č. 6 Skleněná dóza s nerezovým víkem a s kolenními komponenty



Příloha č. 7 Skleněná dóza s nerezovým víkem a s kyčelními komponenty



Příloha č. 8 Sterilní kádinky



Příloha č. 9 Sterilní plastové kontejnerky s kloubními náhradami v rukavicích



Příloha č. 10 Sterilní plastové kontejnerky se šroubovacím uzávěrem



Příloha č. 11 Hladina destilované vody v ultrazvukové lázni



Příloha č. 12 Oxford unipartmentální náhrada kolena (BIOMET CZ, s.r.o.)



Příloha č. 13 Totální náhrada kolenního kloubu
(Beznoska s.r.o., Kladno)



Příloha č. 14 Totální náhrada kolenního kloubu
(Beznoska s.r.o., Kladno)



Příloha č. 15 AGC-RTG zobrazení náhrady
(BIOMET CZ, s.r.o.)



Příloha č. 16 AGC-RTG zobrazení náhrady
(BIOMET CZ, s.r.o.)



Příloha č. 17 AGC tibiální komponent
(BIOMET CZ, s.r.o.)



Příloha č. 18 AGC tibiální komponent
(BIOMET CZ, s.r.o.)



Příloha č. 19 AGC femorální komponent
(BIOMET CZ, s.r.o.)



Příloha č. 20 AGC femorální komponent
(BIOMET CZ, s.r.o.)



Příloha č. 21 Komponent pro femur
(Beznoska s.r.o., Kladno)



Příloha č. 22 Dual Articular 2000 revizní náhrada
kolen. kloubu (BIOMET CZ, s.r.o.)



Příloha č. 23 Jamka kyčelního kloubu
standard-cementovaná
(Beznoska s.r.o., Kladno)



Příloha č. 24 Müller cementovaná acetabulární
náhrada (BIOMET CZ, s.r.o.)



Příloha č. 25 Zářezová necementovaná
acetabulární náhrada
(BIOMET CZ, s.r.o.)



Příloha č. 26 Kovová hlavička
(BIOMET CZ, s.r.o.)



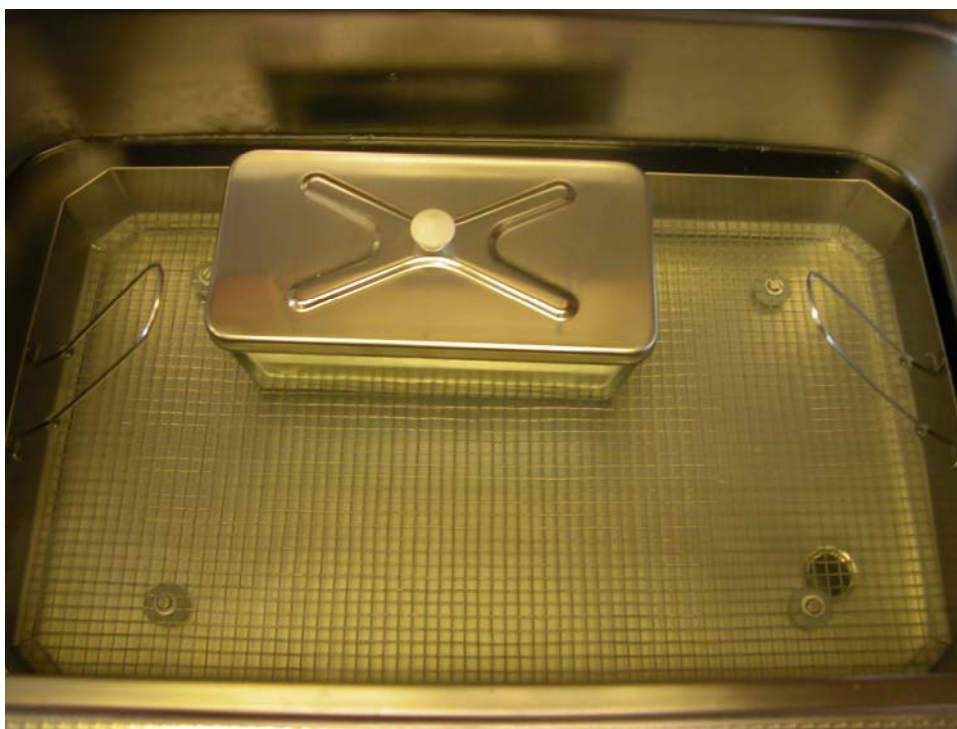
Příloha č. 27 Keramická hlavička
(BIOMET CZ, s.r.o.)



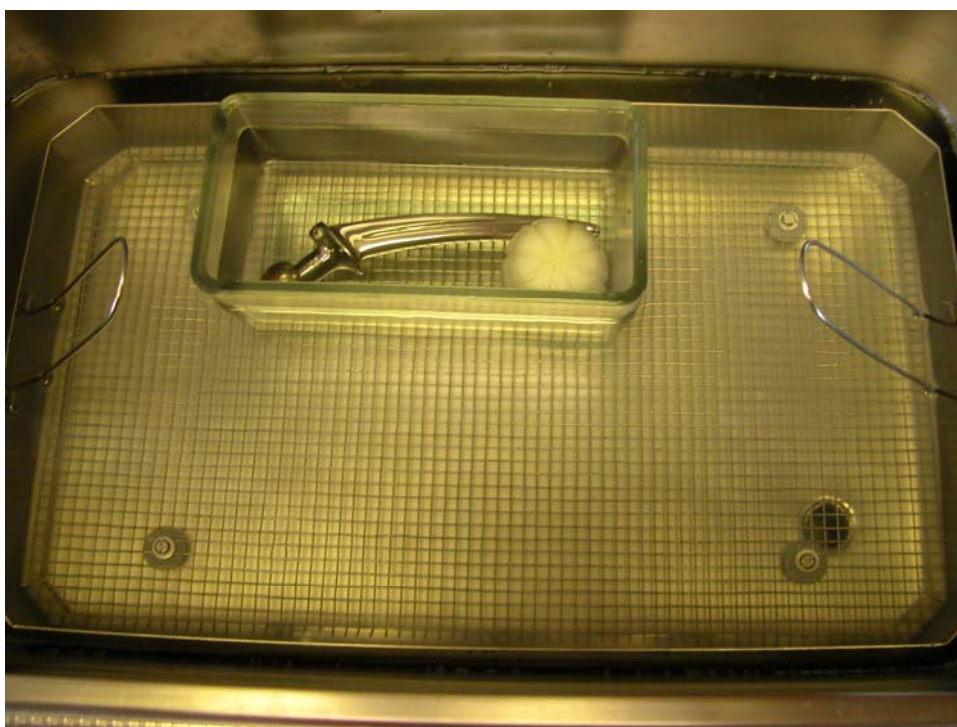
Příloha č. 28 BiMetric femorální komponent (BIOMET CZ, s.r.o.)



Příloha č. 29 Endoprotéza cervikokapitální kyčel. kloubu cementovaná (Beznoska s.r.o., Kladno)



Příloha č. 30 Dóza v ultrazvukové lázni



Příloha č. 31 Dóza s náhradami v ultrazvukové lázni