

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Habilitační práce

Ortopedie

Chronická infekce kloubních náhrad kyčelního a kolenního kloubu

Diagnostika, stanovení kauzálního patogena

Nosiče antibiotik k lokální terapii

Chronic prosthetic joint infection of hip and knee

Diagnosis, assessment of a causal pathogen

Antibiotic carriers for the local treatment

odb. as. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem habilitační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

Hradec Králové, 2019

Obsah

1.	Předmluva	5
2.	Použité zkratky	8
3.	Úvod do problematiky	10
3.1.	Definice infekce kloubní náhrady	10
3.2.	Diagnostika infekce kloubní náhrady	12
3.2.1.	Anamnéza a klinický obraz.....	12
3.2.2.	Zobrazovací metody	13
3.2.3.	Vyšetření markerů z periferní krve	15
3.2.4.	Vyšetření synoviálních markerů	16
3.2.5.	Histologické vyšetření periprotetické tkáně.....	21
3.2.6.	Mikrobiologické vyšetření periprotetické tkáně	21
3.2.7.	Vyšetření extrahovaných komponent pro průkaz biofilmu.....	23
3.2.8.	Molekulární diagnostika	28
3.2.9.	Skórovací systém k diagnostice infekce kloubní náhrady	30
3.2.10.	Telefonní aplikace	32
3.3.	Antibiotická léčba v rámci terapeutických možností chronické infekce kloubní náhrady.....	32
4.	Klinická studie	36
4.1.	Cíle klinické studie	36
4.1.1.	Cíle I. části	37
4.1.2.	Cíle II. části.....	38
4.2.	Metodika	39
4.2.1.	Kritéria chronické infekce kloubní náhrady klinické studie	39
4.2.2.	I. část.....	41
4.2.2.1.	Předoperační diagnostika	41
4.2.2.2.	Kultivační vyšetření	42
4.2.2.3.	Statistická analýza	45
4.2.3.	II. část	46
4.2.3.1.	Hodnocení spektra patogenů a jejich citlivosti k antibiotikům	46
4.3.	Výsledky	48
4.3.1.	I. část.....	48
4.3.1.1.	Výsledky předoperační diagnostiky.....	48
4.3.1.2.	Výsledky kultivačních metod a porovnání shody s předoperační diagnostikou	55

4.3.1.3. Statistické hodnocení skupin pacientů s definitivní diagnózou aseptického a septického uvolnění endoprotézy.....	71
4.3.1.4. Stanovení nejvýznamnějších předoperačních diagnostických parametrů pro odlišení chronické IKN a aseptického uvolnění endoprotézy	74
4.3.1.5. Porovnání přínosnosti kultivačních metod pro rozlišení chronické IKN a aseptického uvolnění endoprotézy.....	75
4.3.1.6. Význam prolongované kultivace.....	75
4.3.2. II. část	77
4.3.2.1. Analýza spektra patogenů chronické infekce kloubní náhrady a jejich citlivosti k antibiotikům	77
4.4. Diskuse	81
4.5. Závěr.....	87
5. Experimentální studie	90
5.1. Cíle experimentální studie	90
5.2. Metodika	92
5.2.1. Porovnání eluční kinetiky vankomycinu a gentamicinu z vybraných nosičů	92
5.2.2. Vliv nosičů s antibiotiky na proliferaci mezenchymálních kmenových buněk	95
5.2.3. Vliv iniciační vyšší koncentrace antibiotik na proliferaci mezenchymálních kmenových buněk	100
5.2.4. Citlivosti různých koncentrací vankomycinu a gentamicinu k planktonickým formám a na biofilm u vybraných patogenů chronické infekce kloubních náhrad	101
5.2.5. Statistická analýza	102
5.3. Výsledky	103
5.3.1. Porovnání eluční kinetiky vankomycinu a gentamicinu z vybraných nosičů	103
5.3.2. Vliv nosičů s antibiotiky na proliferaci mezenchymálních kmenových buněk	117
5.3.3. Vliv iniciační vyšší koncentrace antibiotik na proliferaci mezenchymálních kmenových buněk	119
5.3.4. Citlivosti různých koncentrací vankomycinu a gentamicinu k planktonickým formám a na biofilm u vybraných patogenů chronické infekce kloubních náhrad	122
5.4. Diskuse	127
5.5. Závěr.....	134
6. Závěrečné shrnutí.....	137
7. Použitá literatura	139

1. Předmluva

Habilitační práce je rozdělena na tři hlavní části – úvod, klinickou a experimentální studii., které na sebe navazují. Těžiště práce je v experimentální studii, která se věnuje lokálním nosičům antibiotik po zjištění spektra patogenů chronické infekce kloubních náhrad a jejich citlivosti k antibiotikům v klinické části. Správný výběr a použití lokálních nosičů antibiotik by nám umožnily další posun vpřed v léčbě chronické infekce kloubních náhrad, zejména v možnosti indikovat jednodobou reimplantaci u více pacientů, což by přineslo výhody jedné operace, jedné hospitalizace, kratší doby léčby a snížení ekonomických nákladů.

Úvod obsahuje současné poznatky problematiky infekce kloubních náhrad, které mají vztah ke klinické i experimentální části, a vycházejí z dokumentu *International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection* konaného 25. – 27. 7. 2018 ve Philadelphii, USA. Nebylo tedy cílem podrobně diskutovat jednotlivé diagnostické metody, ale nastínit současný stav, z kterého ve své praxi vycházíme, a poukázat na možnosti dalšího vývoje.

Klinická studie vyhodnocuje soubor pacientů výhradně z Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové. Nejprve byla ověřována správnost naší diferenciální diagnostiky aseptického a chronického septického uvolnění totálních endoprotéz kyčelního a kolenního kloubu metodami dostupnými v době realizace studie (základní předoperační diagnostika – anamnéza, klinické vyšetření, zobrazovací metody, markery zánětu z periferní krve). Pro zlepšení diagnostiky byl tento proces doplněn kultivačními technikami založenými na prodloužené kultivaci více vzorků tkání a sonikací implantátů. Poté bylo zjištěno spektrum patogenů chronické infekce kloubních náhrad léčených na našem pracovišti a jejich citlivost k antibiotikům.

Experimentální studie byla realizována na pracovištích Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové, tato část prošla recenzním řízením a byla publikována v odborném časopise s impact factorem:

KUCERA, T., RYSKOVA, L., SOUKUP, T., MALAKOVA, J., CERMAKOVA, E., MERICKA, P., SUCHANEK, J., SPONER, P. Elution kinetics of vancomycin and gentamicin from carriers and their effects on mesenchymal stem cell proliferation: an in vitro study. *BMC Musculoskeletal Disorder*, 2017, 18(1):381. Impact Factor 1,998.

V této části byla zjištěná kombinace antibiotik, ke které byla citlivá většina patogenů chronických infekcí kloubních náhrad, testována z hlediska farmakokinetiky při jejich uvolňování z nosičů a z hlediska vlivu na proliferaci mezenchymálních kmenových buněk. Byla tedy snaha postihnout zásadní požadavek na lokální nosiče antibiotik, uvolnění antibiotika v dostatečné baktericidní koncentraci, ale bez negativního vlivu na reparaci tkáně.

Habilitační práce je založena na zkušenostech, které jsem získal při příležitosti vést oddělení septické ortopedie Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové v letech 2007 až 2016 a dále jako primář kliniky od roku 2017 dosud. Rovněž cenné byly poznatky ze stáží na několika evropských ortopedických pracovištích zabývajících se infekcemi kloubních náhrad v rámci Travelling Fellowship, The European Bone and Joint Infection Society (Ankaran, Lausanne, Milán, Barcelona), 2017.

V této části bych rád poděkoval doc. MUDr. Pavlu Šponerovi, Ph.D., přednostovi Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové za umožnění věnovat se této problematice, podporu a cenné rady. Také děkuji doc. MUDr. Karlu Urbanovi, CSc. za podporu v mé medicínské a vědecké praxi.

Zvláštní poděkování patří prim. MUDr. Lence Ryškové, Ph.D. z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové za pomoc

při realizaci klinické i experimentální studie a za revizi práce z pohledu mikrobiologa. Dále MUDr. Tomáši Soukupovi, Ph.D. z Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové za pomoc při realizaci experimentální studie. V neposlední řadě je to poděkování RNDr. Evě Čermákové z Ústavu lékařské biofyziky Lékařské fakulty v Hradci Králové za statistické zpracování.

Rovněž děkuji své rodině za trpělivost, podporu a poskytnutí času k realizaci této práce.

2. Použité zkratky

ATP – adenosintrifosfát

ATB – antibiotikum

BM MSC – mezenchymální kmenové buňky z kostní dřevě

C – cement

CFU – colony forming unit

CONTROL – kontrolní skupina

Cor. - *Corynebacterium*

CRP – C-reaktivní protein

CT – výpočetní tomografie

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DPSC – mezenchymální kmenové buňky ze zubní pulpy

F – alogenní spongiózní kost s fibrinovým lepidlem

FDG-PET/CT – fluorodeoxyglukózová-pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie

FW – sedimentace erytrocytů

H – Herafill beads G®

IKN – infekce kloubní náhrady

IL-6 – interleukin 6

KEB – koeficient energetické bilance

Kol. – kolektiv

L – lyofilizovaná kost

MALDI-TOF – Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight

MBC – minimální baktericidní koncentrace

MBEC – minimální eradikační koncentrace pro biofilm

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MRI – magnetická rezonance

MRSA – meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

NGS – sekvenování nové generace

PCR – polymerázová řetězová reakce

qRT-PCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce

S – alogenní spongiózní kost

SC – Septocoll®

Sp. – species

St. – *Staphylococcus*

TEP – totální endoprotéza

V – trikalcium fosfát (Vitoss)

3. Úvod do problematiky

Bolest v oblasti implantované endoprotézy může mít řadu příčin jak extraartikulárních, tak intraartikulárních. V případě intraartikulární patologie je jednou z možností léčby revizní operace s výměnou implantátů. Tato operace je nejčastěji prováděna pro uvolnění endoprotézy. Diferenciální diagnostika aseptického uvolnění endoprotézy a chronické infekce kloubní náhrady (IKN) je velmi důležitá.

Úskalí chronické IKN spočívají v její nejednotné definici a často obtížné, zejména předoperační diagnostice.

3.1. Definice infekce kloubní náhrady

Coventryho klasifikace definovala akutní pooperační infekce vznikající perioperační kontaminací virulentními patogeny, pozdní chronické infekce jako ty, které vznikly nejméně 8 týdnů po primoimplantaci s málo vyjádřenou symptomatikou, a pozdní – hematogenní infekce, které mohly teoreticky vzniknout kdykoliv po operaci a projevovaly se jako akutní (Coventry, 1975). Široce užívaná je rovněž Fitzgeraldova klasifikace, která jako chronické infekce označuje hluboké infekce vzniklé mezi 3 měsíci a 2 lety po primoimplantaci způsobené méně virulentními kmeny. Typičtí pacienti udávají bolesti trvale od implantace endoprotézy (Fitzgerald et al., 1977). Tato klasifikace je tak založena na době trvání příznaků, což je často obtížně identifikovatelné. Patří sem i tzv. „low-grade“ infekce, které se nemusí prezentovat bolestí, ani elevací zánětlivých markerů. Může být přítomno časné uvolnění endoprotézy, které je obtížně odlišitelné od aseptického uvolnění. Tomsova klasifikace zahrnuje mezi chronické infekce i ty, které jsou klinicky nevýrazné a nemají jednoznačný časový začátek (Toms et al., 2006). Tsukayama a kolektiv (kol.) doplnili skupinu pozitivních peroperačních kultur u předpokládaného aseptického uvolnění endoprotézy. Jako **pozitivní** byl definován nálezní identických patogenů v nejméně

dvou vzorcích z celkového počtu nejméně pěti odebraných vzorků (Tsukayama et al., 1996). Zimmerli vyvinul skórovací systém, ve kterém používal také laboratorní a radiologické parametry. Tento systém měl sloužit i pro zhodnocení výsledků léčby, ale nebyl příliš akceptován pro jeho nízkou specifitu (Zimmerli et al., 2003). Schmalzried a kol. doplnili další typy infekcí – přímé rozšíření infekce z okolí kloubu a rekurentní infekci (Schmalzried et al., 1992). Rekurentní infekce může znamenat jak recidivu předchozí infekce, tak novou infekci – reinfekci. Oba typy rekurentní infekce by byly rozlišitelné genetickou shodou/neshodou mezi jejich původci (Landor et al., 2012). Prognostické klasifikace IKN se opírají o komplexní popis pacienta – například klasifikace navržená McPhersonem a kol. Autoři provádějí infekční staging určením typu IKN, klinickým odhadem stavu imunity pacienta a zhodnocením lokálního nálezu (McPherson et al., 2002).

Současný pohled nedoporučuje dělit IKN na akutní a chronické na základě časového období od primoimplantace. Obecně se infekce v oblasti endoprotézy vyvíjí od svého začátku s přechodem do chronicity, vytváří se a zraje biofilm. Rychlost tohoto procesu a klinická symptomatika závisí na mnoha faktorech, především typu, množství a virulenci patogena, obranyschopnosti organismu, stabilitě implantátu. V přítomnosti obranných mechanismů imunitního systému se zralý biofilm vytváří během 2 až 6 týdnů (Vidlak et al., 2016).

Na základě vzájemné interakce typ patogena – antibiotická profylaxe – imunitní stav hostitele a schopnost zánětové odpovědi lze rozlišit 4 klinické scénáře u pacienta s implantátem a přítomným adhezujícím patogenem tvořícím biofilm:

1. **Subklinická prezentace** – bakterie a biofilm neovlivňují funkci implantátu, nejsou přítomny symptomy infekce a markery infekce nejsou zvýšené.

2. **Malfunkce implantátu** – bakterie a biofilm indukují jen minimální symptomy, markery infekce zůstávají nezvýšené. Pro diagnostiku pomalu rostoucích patogenů je třeba prolouvaná kultivace, metody zaměřené na detekci biofilmu, genetické metody.
3. **Low-grade infekce** – indukce mírných klinických symptomů a lehké zvýšení markerů infekce. Diagnostika je založena na prolouvané kultivaci a metodách zaměřených na detekci biofilmu.
4. **High-grade infekce** – klasické příznaky infekce a elevace markerů. Diagnostika může být provedena tradičními mikrobiologickými technikami. Prolouvaná kultivace a metody zaměřené na detekci biofilmu mohou být nápomocné v případě předchozí antibiotické léčby (Drago et al., 2017).

Z klinického hlediska je důležité odlišení akutní a chronické infekce pro rozhodnutí o léčebném postupu a odhad úspěšnosti léčby – debridement, antibiotika a ponechání komponent u akutní infekce nebo extrakce komponent u chronické infekce.

3.2. Diagnostika infekce kloubní náhrady

K diagnostice IKN nelze použít jeden samostatný test, ale je založena na syntéze klinického nálezu, zobrazovacích metod, laboratorních výsledků z periferní krve a synoviální tekutiny, výsledků kultivací a histologického vyšetření periprotetické tkáně, peroperačního nálezu.

3.2.1. Anamnéza a klinický obraz

Z anamnestických dat je nejdůležitější údaj o bolesti. Klinický obraz je u akutní infekce náhlý, po předchozím asymptomatickém období, projevuje se bolestí a/nebo otokem. Chronická infekce je charakteristická mírnou až střední bolestivostí, jejíž přesný začátek

nelze jednoznačně určit. S tímto tvrzením poněkud nekoresponduje „bolest od implantace“ jako charakteristika chronické IKN podle Fitzgeralda (Fitzgerald et al., 1977). Různě vyjádřená klinická symptomatika je ovlivněná výše uvedenými faktory, IKN může být vyloučena až po zhodnocení komplexního vyšetření. Pečlivá anamnéza a klinické vyšetření může rovněž pomoci k odlišení extraartikulárního, nejčastěji vertebrogenního, zdroje potíží.

Jedním z jistých příznaků IKN obsaženým ve všech dosavadních konsensech (Parvizi et al., 2011, Parvizi et al., 2013, Parvizi et al., 2018) je přítomnost píštěle komunikující s endoprotézou. Je definována jako abnormální kanál přes měkké tkáně, který umožňuje komunikaci endoprotézy s vnějším prostředím, je kolonizovaný bakteriemi a je možno tuto komunikaci potvrdit buď přímou vizualizací implantátu nebo zobrazovacími vyšetřeními (fistulografie, ultrazvukové vyšetření, CT, MRI). Zároveň je nutné odlišit přítomnost píštěle jako jisté známky infektu a na druhé straně skutečnost, že její mikrobiální flóra velmi často nekoresponduje s kauzálními patogeny IKN (Tetreault et al., 2013).

Otázka, kdy se prolongovaná sekrece z pooperační rány stává časnou píštělí, není dosud spolehlivě zodpovězena, je však zřejmé, že signifikantně zvyšuje pravděpodobnost IKN. Saleh a kol. ve své práci uvádějí, že tato sekrece trvající více jak 5 dní zvyšuje riziko IKN 12,5x (Saleh et al., 2002).

3.2.2. Zobrazovací metody

Zobrazovací metody jsou využívány jako pomocné metody nejen k diferenciální diagnostice aseptického/septického uvolnění endoprotézy, ale i při diagnostikovaném septickém uvolnění k určení rozsahu poškození tkání infekcí, a tedy nutného debridementu.

RTG snímky: Patří mezi základní vyšetření v diagnostickém procesu, mají však malou senzitivitu, i v případě IKN může být nález zcela v normě. Na druhou stranu srovnávání

rentgenových snímků v čase s tvorbou progresivních radiolucentních linií, nepravidelných erozí, periostální reakce, migrací implantátu, časným uvolněním podporuje tuto diagnózu. Stumpe a kol. uvádějí ve své studii senzitivitu tohoto vyšetření 84 %, ale na druhé straně specificitu 57 % (Stumpe et al., 2004).

CT vyšetření: Také toto vyšetření samo o sobě nevede k diagnóze IKN. Na rozdíl od prostého rentgenového snímku může zobrazit i abnormality měkkých tkání (tekutinová kolekce ve svalech, tuku, naplněný kloub, burzy), což vede k podezření na IKN (Kapadia et al., 2016). Může být také vodítkem pro diagnostickou punkci.

UZ vyšetření: Využití má zejména v oblasti kyčelního kloubu pro detekci tekutinových kolekcí v hlouběji uložených tkáních obtížně klinicky vyšetřitelných, než je například náplň kolenního kloubu. Může být také vodítkem pro diagnostickou punkci.

MRI vyšetření: V současné době je MRI vhodná metoda k diagnostice osteomyelitidy bez přítomnosti kovových implantátů, podobnou senzitivitu a specificitu mají scintigrafické metody (Termaat et al., 2005). I přes nové metody redukující kovové artefakty, není k dispozici dostatek studií dokumentujících využití MRI v přítomnosti kovových implantátů.

Vyšetřovací metody nukleární medicíny: Tato vyšetření nejsou indikována v první linii. Jsou většinou indikována u pacientů, kdy trvá suspekce na IKN a dosavadní vyšetření jsou neprůkazná, například „suchá punkce“. Třífázová scintigrafie musí být provedena minimálně jeden rok od primoimplantace, její negativní výsledek prakticky vylučuje infekci, při pozitivitě musí být provedena další vyšetření k potvrzení nebo vyloučení infekce (první volbou je vyšetření značenými leukocyty) (Ouyang et al., 2014). Názory na využití FDG-PET/CT (fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography) se liší. Evropská společnost nukleární medicíny ve svých doporučeních udává senzitivitu 95 % a specificitu 98 % pro FDG-PET u IKN kyčelního a kolenního kloubu

(Jamar et al., 2013). Kwee a kol. hodnotili přínos FDG-PET/CT ve srovnání s radiologickým vyšetřením, sérovými markery a synoviálními testy, se závěrem, že přínost tohoto vyšetření je sporný (Kwee et al., 2018). Negativní roli pro využití FDG-PET/CT rovněž hraje obtížná dostupnost a vysoká cena tohoto vyšetření.

3.2.3. Vyšetření markerů z periferní krve

Výhodou je snadnost odběru a možnost jeho opakování. Nevýhodou je ovlivnění jejich hodnot operačním výkonem, typem patogena, souběžnou antibiotickou léčbou a komorbiditami – zánětlivými onemocněními, malignitami, jinými infekcemi. Záleží rovněž na zvolené hraniční hodnotě u jednotlivých markerů (Alijanipour et al., 2013).

V první linii vyšetření je doporučováno stanovení sedimentace erytrocytů (**FW**) a hodnot C-reaktivního proteinu (**CRP**), mezní hodnoty jsou 30 mm/hod pro FW a 10 mg/l pro CRP. Huerfano a kol. uvádějí senzitivitu 86 % a specificitu 72,3 % pro FW, respektive 86,9 % a 78,6 % pro CRP. Z jejich meta-analýzy vyplývá, že negativita obou testů vylučuje přítomnost infekce před revizní operací (Huerfano et al., 2017). Na druhou stranu negativní hodnoty markerů mohou být přítomny v případě IKN způsobené pomalu rostoucími patogeny jako jsou *Cutibacterium acnes* nebo koagulázanegativními stafylokoky (McArthur et al., 2015). Vzhledem k elevaci CRP v pooperačním období a postupnému poklesu, je mezní hodnota CRP pro akutní pooperační infekci stanovena dle konsensu z roku 2013 na 100 mg/l (Parvizi et al., 2014).

Leukocytóza a neutrofilie mají pro diagnostiku IKN podle studie Berbariho a kol. senzitivitu 45 % a specificitu 87 % a nedoporučují se k tomuto účelu (Berbari et al., 2010).

Výhodou **interleukinu 6 (IL-6)** je rychlé nastoupení hladin a rychlý návrat k normě, může být využit k diagnostice akutní pooperační infekce nebo k monitoraci infekce před reimplantací endoprotézy (Di Cesare et al., 2005). Hladina IL-6 může být zvýšena

rovněž u polyetylénového otěru bez přítomnosti infekce (Bottner et al., 2007). Xie a kol. provedli meta-analýzu 17 studií týkajících se hladin IL-6 v séru a zjistili pro diagnostiku IKN senzitivitu vyšetření 72 % a specificitu 89 % (Xie et al., 2017). Tyto hodnoty jsou srovnatelné s hodnotami pro FW a CRP a stanovení IL-6 není zatím doporučeno pro rutinní diagnostiku IKN.

Využití **prokalcitoninu** v diagnostice IKN bylo analyzováno Xie a kol., byla zjištěna senzitivita vyšetření 53 % a specificita 92 % (Xie et al., 2017). Pro nízkou senzitivitu není toto vyšetření v diagnostice IKN indikováno.

Slibným testem v diagnostice IKN se jeví stanovení hladiny **D-dimeru**. Shahi a kol. prokázali senzitivitu vyšetření 89 % a specificitu 93 %, což převyšuje hodnoty u FW a CRP (Shahi et al., 2017).

Z hlediska využití sérových markerů v diagnostice IKN lze konstatovat, že stanovení FW a CRP je stále důležitým screeningovým testem při vědomí výše uvedených omezení. Nicméně budou důležité další studie a hledání vhodného markeru a/nebo jejich kombinací, které by zpřesnily diagnostiku infektu a pomohly se správným načasováním reimplantace. Jsou tak zkoumány další markery, ale jejich přínos pro diagnostiku musí být ještě validován: ICAM-1 (Soluble intercellular adhesion molecule-1), TBARS (thiobarbituric acid reactive substance), TLR-2 (Toll-Like Receptor 2 in Serum), LBP (lipopolysaccharide binding protein) a další (Ettinger et al., 2015).

3.2.4. Vyšetření synoviálních markerů

Kloubní punkce

Kloubní punkce za aseptických kautel by měla být provedena ve všech případech, kdy je podezření na IKN. Při negativním výsledku a trvající suspekci na infekci má být opakována.

Zatímco v případě kolenního kloubu bývá technické provedení punkce snadné, u kyčelního kloubu je získání tekutiny k vyšetření obtížnější, zejména v případě chronické IKN. V oblasti kyčelního kloubu existuje několik technik punkce, vždy za aseptických kautel, nejlépe na operačním sále, případně na radiologii. Punkce kyčelního kloubu orientovaná dle anatomických struktur není vhodná – je vyšší riziko poranění nervové cévního svazku, TEP kyčelního kloubu nemusí být ve správném centru rotace, není tedy zaručena punkce kloubu, jsou možné heterotopické ossifikace bránící průniku jehly (Leopold et al., 2001).

Punkci je vhodné provést pod navigací rentgenem, ultrazvukem nebo CT (zejména v případě heterotopických ossifikací). Za správnou polohu jehly je považován její kontakt se superolaterálním okrajem krčku endoprotézy (Yee et al., 2013). Při negativní aspiraci je možné aplikovat 10 ml fyziologického roztoku a zpětně aspirovat (Partridge et al., 2018).

Na závěr vyšetření lze v případě TEP kyčelního kloubu provést artrografii, kontrastní látka může zatékat do abscesových kavit nebo zobrazí píštěl v měkkých tkáních, která ještě neústí na povrch.

Alternativním řešením je provedení peroperační punkce se statim vyšetřením punktátu, podle Spanghla a kol. má toto vyšetření senzitivitu 94 % a specificitu 97 % (Spanghel et al., 1999). I přes správné provedení punkce nemusí být získáno žádné nebo nedostatečné množství synoviální tekutiny, například Ali a kol. uvádějí až 32 % případů (Ali et al., 2006). Rizikem jsou rovněž falešně pozitivní nebo falešně negativní nálezy. Samozřejmostí je absence antibiotické léčby minimálně 2 týdny před provedením punkce (Della Valle et al., 2010). Podle doporučení Infectious Diseases Society of America je nutné punktát transportovat co nejdříve ke zpracování do mikrobiologické laboratoře ve sterilní nádobě při pokojové teplotě, pokud je ho dostatečné množství, je doporučeno část transportovat v aerobní hemokultivační lahvičce (Osmon et al., 2013).

Mühlhofer a kol. provedli analýzu prací publikovaných v letech 1990–2015 na téma IKN kyčelního a kolenního kloubu. Ve zhodnocených publikacích senzitivita vyšetření aspirované tekutiny v obou oblastech byla uváděna v širokém rozsahu 12 % – 89 %, specificita 50 % - 100 % (Mühlhofer et al., 2017).

Hodnocení aspirované tekutiny

Kultivace

Kauzální patogen IKN byl v Mühlhoferem analyzovaných studiích získán v 44 % - 80 %, negativní vliv výtěžnost měla krátká doba kultivace (48 hod), v některých studiích nebyla 2 týdny před punkcí vysazena antibiotika (Mühlhofer et al., 2017).

Biomarkery

Biomarkery v synoviální tekutině reflektují reakci organismu na přítomnost patogenů v kloubu.

Nejdůležitějším parametrem se jeví **stanovení počtu leukocytů a procentuální zastoupení polymorfonukleárních neutrofilů** v synoviální tekutině. Senzitivita a specificita vyšetření závisí na stanovených mezních hodnotách, tyto hodnoty se mění podle typu infektu – akutní/chronický, podle typu kloubu – kyčelní kloub/kolenní kloub, podle komorbidit (zánětlivá systémová onemocnění, krystalové artropatie, na druhé straně imunokompromitovaní pacienti s leukopenií a/nebo neutropenií). U TEP kolenního kloubu je udávána za signifikantní pro bakteriální infekci hodnota pro leukocyty > 1700 leukocytů/μl (senzitivita 94 %, specificita 88 %), pro granulocyty > 65 % (senzitivita 97 %, specificita 98 %). U TEP kyčelního kloubu pro leukocyty > 4200 leukocytů/μl (senzitivita 84 %, specificita 93 %), pro granulocyty > 80 % (senzitivita 84 %, specificita 82 %). Parvizi a kol. ve své recentní práci udávají pro chronickou IKN společné hodnoty > 3000 leukocytů/μl a > 80 % granulocytů (Parvizi et al., 2018).

V posledních letech byla zkoumána řada biomarkerů pro diagnostiku IKN:

- cytokiny (interleukiny 1, 6, 8, 10, 17, TNF- α , Interferon- γ , resistin, thrombospondin),
- reaktivní proteiny (CRP),
- baktericidní leukocytární enzymy obsažené v polymorfonukleárních leukocytech (esteráza, elastáza, bactericidal/permeability-increasing protein, gelatinase-associated lipocalin, lactoferrin),
- markery angiogeneze (vascular endothelial growth factor),
- antimikrobiální proteiny (α -defensin, β -defensin, cathelicidin LL-37) (Patel et al., 2016).

Hladina synoviálního **CRP** má podle studie Parviziho a kol. pro stanovení diagnózy IKN senzitivitu 85 % a specificitu 95 % (cut-off 6,9 mg/l) (Parvizi et al., 2012). Naopak De Vecchi a kol. udávají větší senzitivitu a specificitu vyšetření leukocytární esterázy ve srovnání s CRP (De Vecchi et al., 2016). Deirmengian a kol. uvádějí, že vyšetření synoviálního CRP nemusí být spolehlivé v případě méně virulentních kmenů, jako je *Staphylococcus (St.) epidermidis*, *Corynebacterium (Cor.) species (sp.)* (Deirmengian et al., 2016).

Levným a spolehlivým vyšetřením je test **leukocytární esterázy** (produkována aktivovanými neutrofily), které je možné provést pomocí kolorimetického papírku standardně používaného pro vyšetření moči. Senzitivita vyšetření je udávána v meta-analýze 81 %, specificita 97 % (Wyatt et al., 2016). V případě kontaminace krví je třeba provést centrifugaci tekutiny (Aggarwal et al., 2013).

Doporučovaným markerem pro diagnostiku periprotetické infekce je **α -defensin** – antimikrobiální peptid uvolněný aktivovanými neutrofily a působící na membránu patogena, jeho senzitivita není ovlivněna předchozí antibiotickou léčbou. V meta-analýze je udávána senzitivita 100 % a specificita 96 % vyšetření metodou ELISA v laboratoři

(Wyatt et al., 2016). Bonanzinga a kol. ve své studii uvádějí senzitivitu 97 % a specificitu 97 %, falešně pozitivní byl výsledek u metalózy a polyetylénového otěru, falešně negativní u drénující se píštěle (Bonanzinga et al., 2016). Gehrke a kol. vyšetřovali α -defensin pomocí Synovasure® Alpha Defensin Lateral Flow testu (Zimmer Biomet, USA), což je chromatografický test, jehož výsledek je možné stanovit za 10 minut, senzitivita testu byla stanovena na 92,1 % a specificita na 100 % (Gehrke et al., 2018). Suen a kol. ve své metaanalýze upřednostňují vyšetření α -defensinu v laboratoři metodou ELISA (Suen et al., 2018).

Dalším synoviálním markerem může být **calprotectin**. Je přítomný v cytoplazmě neutrofilů, uvolňuje se při jejich aktivaci a má antimikrobiální účinky. Lze ho kvantitativně relativně rychle stanovit imunochromatografickou metodou na testovacím papírku podobně jako α -defensin (lateral flow immunoassay), ale vyšetření je levnější (Wouthuyzen-Bakker et al., 2018).

Potencionálním synoviálním markerem obsaženým v neutrofilech je **NGAL - neutrophil gelatinase-associated lipocalin**, označovaný také jako **lipocalin-2**. V boji s bakteriální infekcí interferuje s vychytáváním železa bakteriemi. Verdara a kol. stanovili cut-off mezi infekcí a aseptickým uvolněním při nejvyšší senzitivitě (86,3%) a specificitě (77,2%) na 152 ng/ml v synoviální tekutině při vyšetření modifikovaným enzymovým imunotestem spojeným s chemiluminiscencí (Verdara et al., 2019).

Karbysheva a kol. zkoumali využití **D-laktátu** jako synoviálního markeru v diagnostice IKN a úspěšnosti operační léčby na 224 pacientech (137 s aseptickým uvolněním endoprotézy, 87 s IKN). Cut-off D-laktátu byla stanovena na 1,2 mmol/l při senzitivitě 98% a specificitě 84%, při úspěšné léčbě IKN byl zaznamenán pokles D-laktátu pod cut-off za 4 týdny od operace (Karbysheva et al., 2017). D-laktát lze stanovit spektrofotometricky, fluorimetricky nebo chromatograficky (Hyšpler et al., 2015).

Další zatím teoretickou možností je stanovení cytologického složení synoviální tekutiny a **koeficientu energetické bilance (KEB)** závislého na produkci adenosintrifosfátu (ATP) podle Kelbicha a kol. (Kelbich et al., 2017).

2.2.5. Histologické vyšetření periprotetické tkáně

Morawietz a kol. publikovali histologickou klasifikaci 4 typů periprotetické tkáně založenou na přítomnosti cizích tělísek, granulační tkáně a polymorfonukleárů (typ I – otěr, typ II – infekce, typ III – kombinace, typ IV – neurčený), přičemž typy II a III znamenají IKN (Morawietz et al., 2006). Infekce je prokazována na podkladě přítomnosti neutrofilů. Jednotliví autoři se liší v udávané mezní hodnotě polymorfonukleárů v poli pro průkaz infekce. Ve vydaných kritériích pro průkaz IKN na podkladě konsensů je za pozitivní histologický nález považováno > 5 neutrofilů na pole s vysokým rozlišením, v 5 polích, při zvětšení 400x (Parvizi et al., 2011, Parvizi et al., 2013, Parvizi et al., 2018).

Odběr vzorků tkáně k vyšetření by měl být ze stejné oblasti, odkud se odebírají vzorky tkáně na kultivaci. Specificita tohoto vyšetření je udávána mezi 89,5 % až 100 %, zatímco senzitivita mezi 18 % až 100 % (Cör, 2012). Pro vysokou specificitu negativní výsledek histologie prakticky vylučuje přítomnost infekce, naopak pozitivní histologie díky možné nízké senzitivitě neznamena její potvrzení.

3.2.6. Mikrobiologické vyšetření periprotetické tkáně

Mikrobiologické vyšetření periprotetické tkáně je považováno za zlatý standard k potvrzení nebo vyloučení IKN (Bauer et al., 2006).

Odběr vzorků tkání k mikrobiologickému vyšetření

Optimálně se peroperačně na mikrobiologické vyšetření odesílá 3–5 vzorků periprotetické tkáně (ideálně tkáň mezi endoprotézou a kostí), synoviální tekutina

a komponenty endoprotézy. Každý vzorek tkáně by měl být odebrán samostatnými sterilními nástroji, aby se zabránilo kontaminaci, a ihned odeslán do laboratoře k vyšetření. Neměly by se provádět stěry, ale odesílat části tkáně (Drago et al., 2017).

Doba kultivace

Schäfer a kol. vyhodnotili kultivace po 14 dnech od 284 pacientů. Medián doby do izolace patogena byl 4 dny. Stafylokoky, streptokoky, enterokoky a enterobakterie byly detekovány během prvních sedmi dní. *Cutibacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp. a aerobní grampozitivní tyčinky rostly během 7 až 14 dní (Schäfer et al., 2008). Na druhou stranu Portillo a kol. ve své studii vyjádřili obavu, že delší doba kultivace je rizikem pro kontaminaci vzorků, která vede k falešně pozitivním výsledkům (Portillo et al., 2014). Podle *International Consensus on Musculoskeletal Infection 2018* by měla být standardní doba kultivace 5 až 7 dní. Pokud je podezření na infekci málo virulentním patogenem nebo při tomto podezření byla předoperační kultivace negativní, kultivaci je třeba prolongovat na 14 až 21 dní.

Barvení podle Grama

Tato diagnostická technika je sice vysoce specifická, ale málo senzitivní, proto se její využití k zjištění periprotetické infekce u revizní artroplastiky nedoporučuje (Bauer et al., 2006).

Kritérium positivity pro periprotetickou infekci

Atkins a kolektiv stanovili požadavek 2 a více pozitivních nálezů identických kmenů patogenů pro potvrzení IKN (Atkins et al., 1998).

3.2.7. Vyšetření extrahovaných komponent pro průkaz biofilmu

Biofilm

Biofilm je možné definovat jako heterogenní společenství bakterií kooperujících v extracelulární matrix vykazující změněný fenotyp s ohledem na růst, genovou expresi a produkci proteinů (Donlan et al., 2002).

Rozlišují se následující období vývoje biofilmu:

- **Fáze adheze bakterií k povrchu implantátu** – nejprve reverzibilní, posléze ireverzibilní. Adheze planktonických bakterií je závislá na schopnosti patogenů se specificky vázat nebo nespecificky interagovat s povrchy a také na fyzikálně chemických vlastnostech substrátu. Důležitou roli hraje velikost bakteriální nálože a doba expozice, tato fáze trvá v řádech hodin. (Clarke et al., 2006).
- **Fáze růstu a zrání biofilmu** – bakterie proliferují a produkují extracelulární matrix, tvoří se vnitřní komunikační systém biofilmu a funkční a morfologická specializace jednotlivých bakterií biofilmu. Tvoří se 3D struktura biofilmu. Pomocí proteáz, nukleáz, delta hemolysinu a dalších faktorů dochází rovněž ke kontrolované degradaci extracelulární matrix a k možnosti uvolnění bakterií a osídlení dalších lokalit (Le et al., 2014).
- **Fáze expanze biofilmu** – uvolňování jednotlivých bakterií a jejich aglomerátů z biofilmu a udržování infekce. Subpopulace metabolicky aktivních planktonických bakterií může být suprimována antibiotiky, ale jen po dobu jejich podávání.

IKN je v současnosti koncipována jako komplexní proces začínající bakteriální adhezí na implantát a tvorbou biofilmu, následovaný různou formou interakce mezi hostitelem, implantátem, mikroorganismy a jejich produkty, proto je také diagnostika a léčba IKN obtížná.

Lze tedy pojmenovat některá úskalí biofilmu a v něm obsažených bakterií:

- Schopnost matrix koncentrovat nutrienty (Beveridge et al., 1997).
- Rezistence k antimikrobiálním faktorům daná nízkou úrovní metabolismu a bakteriemi ve fázi G0, které sídlí v hloubce biofilmu (Brown et al., 1993).
- Působení biofilmu jako difuzní bariéry, která zpomaluje penetraci antimikrobiálních látek (Xu et al., 2000).
- Možnost uvolnění a disperze bakteriálních buněk.

Biofilm tak značně redukuje možnosti imunitního systému pro boj s infekcí.

Diagnostika periprotetického infektu z izolovaného biofilmu by tak měla zvyšovat senzitivitu mikrobiologického vyšetření založeného na analýze periprotetické tkáně.

Biofilm lze prokázat přímo nebo nepřímo na povrchu implantátu.

Přímé zobrazení biofilmu na povrchu implantátu

Tyto metody nejsou v klinické praxi využitelné, zejména pro časovou náročnost přípravy vzorku k mikroskopickému vyšetření, nutnost technického vybavení a finanční náklady na vyšetření. Jedná se o mikroskopické metody (transmisní elektronová mikroskopie, rastrovací elektronová mikroskopie, konfokální laserová scanovací mikroskopie – kombinace s reverzně transkriptázovou PCR, fluorescenční in situ hybridizace (FISH).

Nepřímý průkaz biofilmu na povrchu implantátu

Spočívá v šetrném snesení biofilmu z povrchu endoprotézy v kombinaci s kultivačním a PCR průkazem původce infekce.

Biofilm lze získat z implantátu mechanickými, fyzikálními nebo chemickými metodami.

1. Mechanické metody

Vortexování: Uvolnění biofilmu je způsobeno generovanými střížnými silami mezi implantátem a vortexovanou tekutinou na vortexu (třepače). Tyto síly mohou být zvětšeny přidáním detergentu nebo antikoagulancií do tekutiny. Samostatně se vortexování k diagnostice nepoužívá.

2. Fyzikální metody

Sonikace: Uvolnění biofilmu pomocí ultrazvuku v ultrazvukové lázni. Pro zvýšení senzitivity vyšetření je možné před sonikací zařadit vortexování.

3. Chemické metody

0,1 % roztok dithiothreitolu: Chemicky uvolňuje biofilm, microDTTect je uzavřený systém v plastovém obalu zabraňující kontaminaci. Součástí vyšetření je rovněž vortexování. Nevýhodou jsou relativně vysoké ekonomické náklady na vyšetření.

První práce o sonikaci endoprotézy kyčelního kloubu byla publikována Tunneyem a kol. (Tunney et al., 1998), kdy byl demonstrován větší záchyt patogenů touto metodou ve srovnání s kultivací tkáně u 120 pacientů. Další studii publikovali Trampuz a kol. v roce 2006, na 78 pacientech prokázal větší senzitivitu sonikace než u kultivace tkání (75 % versus 54 %), ale menší specificitu (87 % versus 98 %). Menší specificita sonikace se připisovala zejména kontaminaci vzorků při netěsnění polyetylenových transportních sáčků (Trampuz et al., 2006). V roce 2011 byla publikována práce Holinky a kol., kde právě použití plastových kontejnerů a vortexování před vlastní sonikací zvýšilo specificitu na 95 % (Holinka et al., 2011). Meta-analýzu prací na téma sonikace provedli v roce 2014 Zhai a kol. s nálezem, že sonikace je spolehlivá metoda k detekci patogenů periprotetického infektu, přičemž kultivace prodloužená na 14 dní v anaerobním prostředí zvyšuje senzitivitu metody (82 %) a vortexování před vlastní sonikací specificitu metody (99 %). Zároveň však poukázali na některé nedostatky studií: různá metodika sonikace, nedostatek prospektivních studií (Zhai et al., 2014). Monsen a kol. publikovali práci

o možném inhibičním efektu sonikace na gramnegativní bakterie, zejména *Escherichia coli* (Monsen et al., 2009). Van Diek a kol. shrnuli další potencionální rizika snižující význam sonikace: obtížné porovnání studií pro různou metodiku sonikace a kultivace, různý počet vzorků tkáně k porovnání, vliv předchozí léčby antibiotiky, riziko kontaminace (studie buď neuvádějí, nebo mají různé mezní hodnoty colony-forming unit (CFU) ze sonikační tekutiny). Autoři použili jako signifikantní hodnotu ≥ 50 CFU/ml. Na druhou stranu také tato práce a její výsledky nejsou plně porovnatelné s ostatními studii, protože je zde nehomogenní skupina pacientů s výrazným zastoupením akutních infekcí, což může vysvětlovat výslednou nízkou senzitivitu sonikace 47 % (Van Diek et al., 2017).

Nicméně nastavení mezní hodnoty CFU a vůbec metodiky studií výrazně ovlivňuje výslednou senzitivitu a specificitu sonikace ve srovnání s kultivací vzorků tkáně. Často citovaná práce Trampuze a kol. z roku 2007 udává senzitivitu sonikace 79 % ve srovnání s vyšetřením tkáně 61 % při mezní hodnotě 5 CFU na naočkovanou Petriho misku s kultivačním médiem (odpovídá hodnotě 50 CFU/ml). V případech, kdy byla zjištěna kultivační pozitivita sonikátu (tekutiny, do které se uvolňují bakterie z povrchu komponent při sonikace v ultrazvukové lázni; obvykle se používá fyziologický roztok) a negativita tkáně, byl pozitivní kultivační nález potvrzen nálezem stejného agens v kloubní tekutině nebo v předchozích tkáňových vzorcích (Trampuz et al., 2007). Puig-Verdié a kol. uvádějí senzitivitu sonikace 90 %, kultivace tkáně 67 % při stejné mezní hodnotě 5 CFU na kultivační misku, přičemž zdůrazňují význam sonikace u chronických, ale ne u akutních IKN (Puig-Verdié et al., 2013). Liu a kol. revidovali 16 recentních studií ohledně významu sonikace v diagnostice periprotetické infekce a zjistili senzitivitu sonikace 79 % a specificitu 95 %, studie se však lišily ve svém designu a mezních hodnotách CFU (Liu et al., 2017).

Snahou o zlepšení laboratorní diagnostiky periprotetické infekce je vyšetřování sonikátu v hemokultivačních lahvičkách. Portillo a kol. ve své studii zjistili, že senzitivita sonikace klesá z 87 % na 77 % a kultivace tkáně z 59 % na 55 % při předchozí léčbě antibiotiky, zatímco senzitivita vyšetření sonikátu v hemokultivační lahvičce je v obou skupinách 100 % (Portillo et al., 2015).

Rak a kol. vyšetřovali pomocí PCR přítomnost bakteriální 16S rRNA v periprotetické tkáni (senzitivita 76 %, specifická 93 %) a v sonikátu (senzitivita 95 %, specifická 97 %), nicméně i přes slibné výsledky problémem dle autorů zůstává rozlišení aseptického uvolnění a low-grade infekce při malém množství bakterií v klinických vzorcích, pod mezí detekce PCR (Rak et al., 2016). Nevýhodou je rovněž možnost zachycení neživých bakteriálních kmenů (Renz et al., 2017).

Dalšími metodami může být mikrokolorimetrie nebo hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight), tato metoda se uplatňuje také v rychlejší identifikaci patogena a určení citlivosti k antibiotikům (Harris et al., 2010). MALDI-TOF umožňuje identifikovat bakteriální nebo mykotický mikroorganismus z jedné narostlé kolonie během řádově desítek minut. Z testovaného mikroorganismu se připraví nátěr na destičku, nechá se působit matrice (obvykle kyselina skořicová) a posléze se vloží do hmotnostního spektrometru. Ve válci vyplněném vákuem se laserem ostřeluje povrch nátěru a uvolňují se z něj proteiny, které putují k detektoru různou rychlostí dle své molekulové hmotnosti. Získané časy doletu vytvoří spektrum specifické pro konkrétní bakteriální nebo fungální druh a porovnáním s databází již naměřených spekter je testovaný mikroorganismus identifikován. Podobně lze identifikovat agens z pozitivní hemokultury, kdy se připraví nátěr z tekuté půdy. V současné době se využívá této technologie k rychlému průkazu vybraných fenotypů rezistence.

Původní mikrobiologické techniky obvykle umožnily identifikovat narostlé kultury za 24 – 48 hodin, po zavedení metody MALDI – TOF do rutinní diagnostiky, došlo k výraznému urychlení identifikace, do desítek minut.

3.2.8. Molekulární diagnostika

Molekulárně biologické metody lze použít pro přímý průkaz etiologického agens ve vzorku. V praxi lze provádět při omezeném počtu předpokládaných agens cílené PCR reakce umožňující detekci konkrétní bakterie. Jinou možností je provádění PCR s primery cílenými do oblasti 16S rRNA společné všem bakteriím s následnou sekvenací dle Sangera (Sanger et al., 1977). Následuje automatické vyhodnocení pomocí identifikačních programů, volně dostupných na internetu (BLAST, SepsisTest™ BLAST). Pomocí těchto programů je hledána shoda zjištěné sekvence s referenčními sekvencemi bakterií. Metoda 16S rDNA sekvenování dle Sangera má i svá omezení. Je méně citlivá než specifické PCR reakce. Další možností je provedení tzv. multiplex PCR zahrnující primery pro nejčastější skupiny patogenních mikrobů – např. komerčně vyrobený kit Unyvero i60 ITI (Curetis GmbH, Holzgerlingen, Německo). Zároveň tato metoda může poskytnout informace o přítomných genech antibiotické rezistence. Podle Malandaina a kol. je tato metoda například vhodná u pacientů léčených antibiotiky před začátkem diagnostických procesů IKN (Malandain et al., 2018). Nejnovějším postupem je sekvenování nové generace (next generation sequencing – NGS). Tato technika umožňuje přečíst celý genom (whole genom sequencing) nebo cílené sekvenování (targeted sequencing) (Besser et al., 2018).

Molekulárně biologické metody jsou vhodné především tam, kdy je infekce způsobena obtížně kultivovatelnými nebo nekultivovatelnými mikroby (např. borrelie, bartonely, mykobakteria) nebo tam, kde došlo k odběru materiálu až po nasazení antibiotik a následné

falešné kultivační negativitě. Po rozpadu bakteriálních buněk může po omezenou dobu DNA v místě infekce přetrvávat a lze tak i po léčbě odhalit původce infekce.

Při interpretaci výsledků je zásadní rozhodnutí, zda identifikovaná bakterie je původcem onemocnění, patogenem nebo se jedná o kontaminantu. Vzhledem k tomu, že se zjišťuje přítomnost genu pro 16S rRNA, který je společný téměř všem bakteriím, je zřejmé, že metoda je velmi náchylná ke kontaminaci. Rovněž je nutné zvážit klinické hledisko (anamnestické údaje, imunita pacienta, předchozí ATB terapie). Při hodnocení výsledků sekvenační analýzy je nutná spolupráce mikrobiologa a ošetřujícího lékaře.

Gallo a kol. porovnávali u kloubních punktátů odebraných od pacientů s infekcí kloubní náhrady výtěžnost kultivační metody a průkaz etiologického agens pomocí sekvenace a zjistili, že senzitivita a specifická u sekvenace dosáhla 71 % a 97 %, kdežto u kultivace se jednalo 44 % a 94 % (Gallo et al., 2008).

Další potenciální možností je perioperační detekce exprese genů některých markerů IKN ze vzorku tkáně. Fillerová a kol. zjistili, že kombinace vyšetření metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR) exprese genů DEFA1 (kódující α -defensin), IL1B (kódující interleukin 1 β) a LTF (kódující lactoferrin) odlišila během 45 minut aseptické uvolnění a IKN se senzitivitou 94,5% a specifíciou 95,7% (Fillerova et al., 2017).

I přes své limitace mají tyto metody jistě budoucnost, zejména při diagnostice low-grade infekce a u pacientů užívajících před diagnostikou antibiotika.

3.2.9. Skórovací systém k diagnostice infekce kloubní náhrady

Parvizi a kol. navrhli skórovací systém k diagnostice IKN, viz Tab.1 (Parvizi et al., 2018). Výhodou nového skórovacího systému je usnadnění předoperační diagnostiky, protože nejsou použity ve vedlejších kritériích peroperační nálezy (hnis, jedna pozitivní kultivace, pozitivní histologie), ale sérové a synoviální markery.

Další pozitivní vlastností systému je připuštění neprůkazných nálezů, tzv. „šedé zóny“, se kterými se setkáváme v klinické praxi. Na druhou stranu předkládaná kritéria nemusí být spolehlivá u pacientů s adverse local tissue reaction – nepříznivou lokální reakcí tkáně na kovy, u krystalových artropatií, u aktivních zánětlivých artropatií, u infekcí vyvolaných pomalu rostoucími mikroorganismy – například *Cutibacterium acnes*.

Tab. 1. Diagnostika periprotetické infekce na podkladě skórovacího systému pro chronickou infekci (Parvizi et al., 2018).

Hlavní kritéria (splnění aspoň jednoho kritéria)	Výsledek
Dvě pozitivní kultivace identického patogena	INFEKCE
Píštěl s prokázanou komunikací s kloubem nebo viditelná endoprotéza	

	Vedlejší kritéria		Skóre	Výsledek
	Předoperační diagnostika	<i>Sérum</i>	CRP > 10 mg/l nebo D-Dimery > 860 ng/ml	2
FW > 30 mm/hod			1	
<i>Synovie</i>		Synoviální leukocyty > 3000 buněk/μl nebo pozitivní leukocytární esteráza	3	
		Pozitivní alfa-defensin 1,0	3	
		Synoviální polymorfonukleáry > 80 %	2	
		Synoviální CRP > 6,9 mg/l	1	
Peroperační diagnostika	Neprůkazné předoperační skóre nebo suchá punkce		Skóre	Výsledek
	Předoperační skóre		-	≥ 6 INFEKCE 4–5 NEPRŮKAZNÉ ≤ 3 VYLOUČENÁ INFEKCE
	Pozitivní histologie (> 5 neutrofilů na pole s vysokým rozlišením, v 5 polích, při zvětšení 400x)		3	
	Pozitivní nález hnisu		3	
	Jedna pozitivní kultivace		2	

3.2.10. Telefonní aplikace

V současné době jsou dostupné aplikace pro Apple i Android pro spočítání rizika periprotetické infekce – PJI Risk Calculator.

3.3. Antibiotická léčba v rámci terapeutických možností chronické infekce kloubní náhrady

Léčba chronické IKN kyčelního nebo kolenního kloubu zahrnuje tyto možnosti:

- * dvoudobá reimplantace,
- * jednodobá reimplantace,
- * artrodéza,
- * resekční artroplastika,
- * trvalá antibiotická supresivní terapie,
- * amputace.

Součástí všech postupů je cílená antibiotická léčba, proto je důležité během diagnostického postupu nejen potvrdit nebo vyloučit IKN, ale také diagnostikovat kauzálního patogena/y a určit citlivost k antibiotikům.

Antibiotika lze podávat celkově a/nebo lokálně, nejčastěji na určitém nosiči.

Pro celkové podání je vhodné baktericidní antibiotikum účinkující na kauzální etiologické agens, s dobrým průnikem do kosti, nejlépe také do biofilmu, v dostatečné dávce a minimálními celkovými a lokálními toxickými účinky. Pro lokální podání je ideální systém resorbovatelného nosiče s antibiotiky, který má jasnou farmakokinetiku s uvolňováním antibiotika po dostatečně dlouhou dobu, s udržováním jeho baktericidní

koncentrace tak, aby nedošlo k rozvoji rezistence k antibiotiku. Tato koncentrace antibiotik nesmí být rovněž toxická pro okolní tkáň.

V endoprotetice se jeví jako perspektivní kombinace obou přístupů. Celkové podání antibiotik cílí na patogeny perioperační kontaminace a na patogeny, které mohou působit infekt hematogenní cestou z fokusů. Tento způsob však nevytvoří dostatečnou ochrannou bariéru kolem implantátu proti vytvoření biofilmu díky nižší penetraci do kosti. Na druhé straně lokálně podaná antibiotika mohou být účinná na bakterie *in situ*, zejména v avaskulárních oblastech (Kuehn et al., 2017). Tato výhoda se jeví zvláště významná v případě léčby chronické IKN s přítomností planktonických i sesilních patogenů v biofilmu.

Pro lokální podání byla již testována antibiotika jako gentamicin, v současnosti jsou prováděny klinické studie na další antibiotika pro použití v léčbě periprotetické infekce, zejména citlivá na již rezistentní kmeny (daptomycin, fosfomycin, tigecyclin a další).

Lokální léčba antibiotiky nabývala také na významu ve spojení s jednoduchou reimplantací, která se stává více populární, kdy podle některých studií při srovnatelných výsledcích s dvoudobou reimplantací přináší výhody pro pacienta i nižší náklady na celkovou léčbu (Tibrewal et al., 2014).

Nejdéle používaným nosičem antibiotik je kostní cement. Rozsáhlá studie čerpající z Norského registru endoprotéz udávala, že použití cementu s antibiotiky spolu s celkově podanými antibiotiky mělo nejnižší riziko revizní operace po 0 – 14 letech od primoimplantace (Engesaeter et al., 2003). Na druhou stranu nevstřebatelný cement s antibiotiky působí jako cizí těleso, které může být kolonizováno bakteriemi. Navíc prolongovaná eluce subinhibičních koncentrací antibiotik může indukovat bakteriální rezistenci (Boo et al., 2015). Neut vyšetřil cementové kuličky s gentamicinem odstraněné v druhé době dvoudobé reimplantace pro infekci a identifikoval bakterie na povrchu 18

z 20 kuliček, navíc 19 z 28 bakteriálních kmenů bylo rezistentních na gentamicin (Neut, 2001).

Řešením problému s cementem jako cizím tělesem je vývoj degradabilních nosičů antibiotik, zejména těch, které mohou zároveň eradikovat mikroby a podpořit kostní regeneraci a biologickou inkorporaci implantátu. Winkler používal lyofilizovanou kost, kdy štěpy byly inkubovány v roztoku antibiotik po 24 hod, jednalo se tedy o přípravu nosiče již před operací. Vysušený nosič měl výhodu i v lepším nasátí roztoku antibiotik. (Winkler, 2000). Evropská buněčná a tkáňová banka (European Cell and Tissue Bank - ECTB) vyvinula úpravou alogenní kosti, impregnací vankomycinem nebo tobramycinem a lyofilizací materiály OSTEOMycin™ V® s vankomycinem a OSTEOMycin™ T® s tobramycinem. Jednotná technologie přípravy deklaruje vyšší koncentraci antibiotik v celém objemu štěpu, uvolňování antibiotik do 4 týdnů, u vankomycinu je první den udávaná uvolněná koncentrace z 1 g kosti 10 – 20 000 mg/l, šestý den 60 – 130 mg/l. Skladování je deklarováno 2 roky (Winkler et Haiden, 2017). Výhodou popsaného postupu je certifikovaná příprava každého materiálu s definovanou farmakokinetikou, hladiny uvolněných antibiotik mohou tak převyšovat minimální eradikační koncentraci pro zbytky biofilmu (MBEC). Využití tohoto materiálu s necementovanou endoprotézou, případně potaženou antimikrobiálním povrchem, může být směrem pro léčbu chronické IKN jednodobou reimplantací. Navíc antibiotika impregnovaná do kostních štěpů mohou zabránit jejich bakteriální kolonizaci (Ketonis et al., 2011). Nevýhodou je vysoká pořizovací cena materiálu, nutnost jeho zajištění v dostatečném množství před operací, na přesně definovanou farmakokinetiku se nelze spoléhat, může být rozdílná u různých pacientů zejména podle velikosti vyplňovaného defektu a stavu lokálního cévního zásobení. Rovněž upravovaná kost včetně lyofilizace již antibiotiky impregnovaného

nosiče může mít vliv na kostní hojení a na vlastnosti antibiotik včetně jejich antibakteriální účinnosti (Melicherčík et al., 2010).

Další možností je perioperační impregnace nosiče antibiotiky. Existují různé techniky impregnace, od manuálních (například smíchání nakouskovaných kostních štěpů s antibiotiky) až po speciální míchací zařízení (Bormann et al., 2014). Mimo kostní štěpy lze použít i náhrady kostních štěpů. Množství antibiotika se perioperačně lépe vztahuje k objemu nosiče než k jeho hmotnosti. Je tak možné připravit nosič v odpovídajícím množství dané situaci u konkrétního pacienta. Kostní štěpy se dále neupravují, lze tedy očekávat jejich lepší biokompatibilitu a rovněž stabilitu antibiotik. Nezanedbatelná je i nižší cena ve srovnání s OSTEOMycinemTM V/T®. Nevýhodou je obtížně předpověditelná farmakokinetika z již samotných impregnovaných štěpů s kratší dobou eluce antibiotik a jejich nižšími koncentracemi.

4. Klinická studie

4.1. Cíle klinické studie

Pacienti byli zařazováni do klinické studie, která je předmětem habilitační práce, od roku 2009, tedy v době, kdy ještě nebyla stanovena kritéria diagnostiky chronické IKN ve formě pozdějších konsensů (Parvizi et al., 2011, Parvizi et al., 2013, Parvizi et al., 2018). Diagnostika před začátkem studie byla založena na anamnéze (zejména údaj o chronické bolesti v oblasti endoprotézy v klidu a také byl významný údaj o absenci nebolestivého časového intervalu od primoimplantace), dále na klinickém nález (zejména píštěl komunikující s endoprotézou), na výsledku laboratorního vyšetření z periferní krve – FW a CRP (hodnoty CRP > 10 mg/l a FW > 30 mm/hod) a rovněž na zhodnocení rentgenových snímků s jejich porovnáním v čase (časná tvorba radiolucenčních linií kolem endoprotézy, migrace komponent). Předoperační punkce kloubu nebyla na našem pracovišti rutinně prováděna pro malou výtěžnost vyšetření, zejména v případě chronické IKN kyčelních kloubů. Definitivní diagnóza byla stanovena na podkladě výsledků kultivačního vyšetření tkáně získané při operaci.

Při vědomí toho, že do současné doby neexistuje samostatný test k diagnostice IKN s absolutní přesností (Fernández-Sampedro et al., 2017), byly zároveň hledány další možnosti vyplývající z požadavků naší klinické praxe, jak zlepšit diagnostiku. V malé míře to byl důvod pozitivních výsledků kultivace u původně předpokládaného aseptického uvolnění, významnějším důvodem byl požadavek izolace kauzálního patogena IKN u pacientů přijímaných na oddělení septické ortopedie s předpokládanou IKN, ale již po předchozí antibiotické nebo i operační léčbě na jiných pracovištích.

Prvním opatřením bylo rutinní zavedení požadavku prolongované kultivace vzorků periprotetické tkáně. Schäfer a kol. udávali po 7 dnech kultivace detekci pouze 73,6 % patogenů u 110 pacientů, proto doporučovali kultivaci až 14 dní (Schäfer et al., 2008).

Druhým zavedeným postupem bylo odesílání extrahovaných komponent endoprotézy na vyšetření sonikační metodou pro průkaz bakterií ve formě biofilmu. Tato vyšetřovací metoda v době začátku naší klinické studie byla v odborné literatuře prezentována jako vhodný prostředek k určení patogena IKN, zejména při předchozí antibiotické léčbě. Později byly prezentovány studie, které poukázovaly na její nedostatky, v poslední době je ale opět prezentována jako nejsenzitivnější metoda k diagnostice chronické IKN (Fernández-Sampedro et al., 2017), nicméně dosud není konsensus pro její použití.

Po revizi diagnostiky IKN bylo rovněž nutné analyzovat spektrum patogenů IKN a jejich citlivost k antibiotikům, zejména k těm, které byly používány pro celkovou a lokální léčbu.

Klinická studie byla rozdělena na dvě části.

4.1.1. Cíle I. části

- 1. Porovnání shody předoperační diagnostiky chronické IKN a aseptického uvolnění endoprotézy s definitivní diagnózou na základě výsledků kultivačních metod.**
- 2. Stanovení nejvýznamnějších předoperačních diagnostických parametrů pro odlišení chronické IKN a aseptického uvolnění endoprotézy.**
- 3. Porovnání přínosnosti jednotlivých kultivačních metod včetně sonikace extrahovaných implantátů a prolongované kultivace pro rozlišení chronické IKN a aseptického uvolnění endoprotézy.**

4.1.2. Cíle II. části

- 1. Zjištění spektra patogenů chronické IKN a stanovení jejich citlivosti k antibiotikům.**

4.2. Metodika

4.2.1. Kritéria chronické infekce kloubní náhrady klinické studie

Chronická IKN byla časově definována jako infekce prezentující se nejméně 3 měsíce od implantace endoprotézy.

Chronická IKN byla předoperačně definována jako jistá:

*** při přítomnosti píštěle komunikující s endoprotézou (Obr. 1)**



Obr. 1

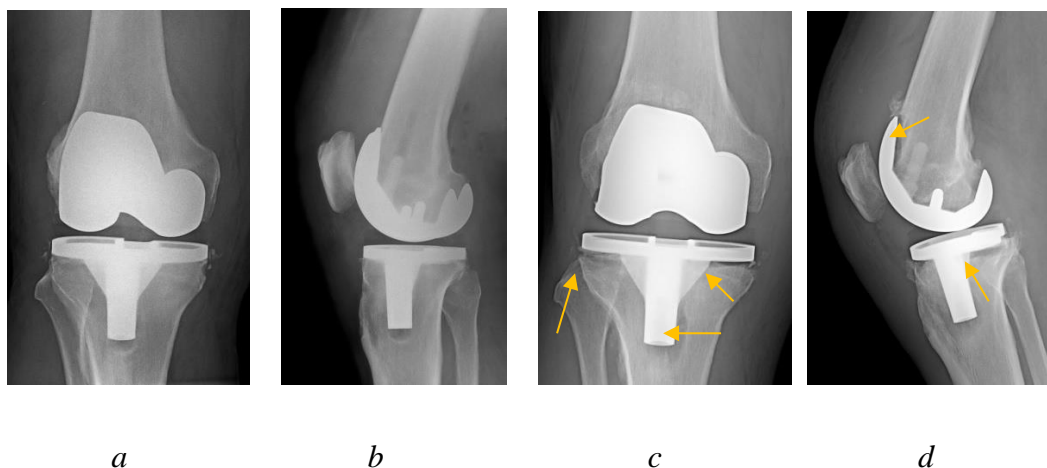
RTG pravého kyčelního kloubu v AP projekci, při fistulografii kontrastní látka zatéká až pod laterální okraj jamky endoprotézy.

A jako **pravděpodobná** na základě kombinace následujících kritérií:

*** subjektivních obtíží** – chronická bolest v oblasti endoprotézy bez vazby na zátěž končetiny, hodnocen byl typ bolesti při počátku obtíží,

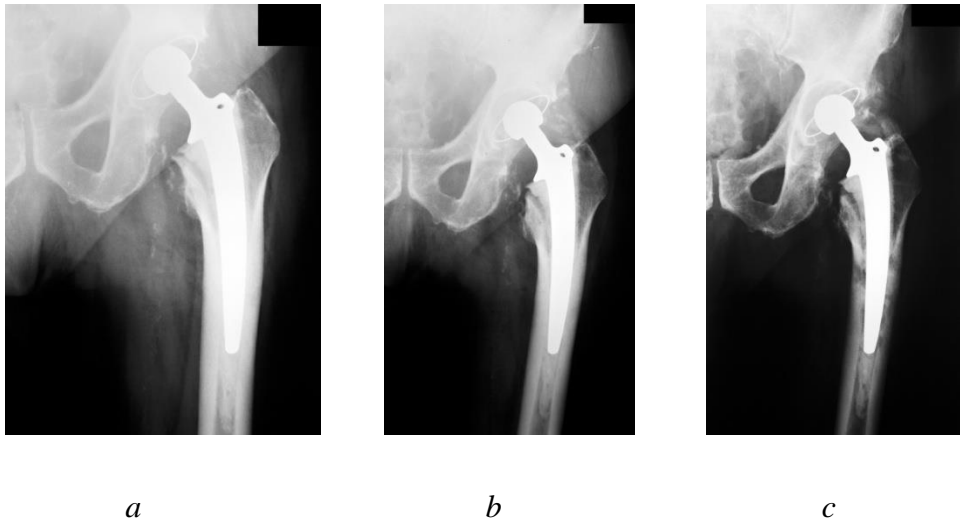
*** CRP > 10 mg/l a FW > 30 mm/hod** – pokud nebyla známá jiná příčina elevace markerů jako revmatoidní artritida nebo maligní tumor,

* **rychlé progresse uvolnění endoprotézy při srovnání rentgenových snímků** – tvorba radiolucenčních linií ≥ 2 mm, nepravidelného tvaru, s neostrými okraji, dále migrace komponent > 10 mm, periostální reakce během jednoho roku (Miller, 2006, Tigges et al., 1994, Tande et Patel, 2014). Linie projasnění byly hodnoceny u kyčelního kloubu dle Gruena v oblasti dřívku (Gruen et al., 1979), DeLee a Charnleye v oblasti jamky (DeLee et al., 1976) a dle Ewalda u kolenního kloubu (Ewald, 1989). Vždy byl zhotoven rentgenový snímek centrováný na totální endoprotézu (TEP) tak, aby byl viděn celý implantát na jednom snímku (Obr. 2 a-d, Obr. 3 a-c).



Obr. 2

RTG snímky pravého kolenního kloubu v AP a bočné projekci: a), b) pooperační snímky, c), d) rychlá progresse radiolucenčních linií po 4 měsících (šipky), Ewaldovy zóny u tibiální komponenty 1,4,5, u femorální komponenty 1,5.



Obr. 3

*RTG snímky levého kyčelního kloubu v AP projekci po TEP u pacienta s anamnézou karcinomu prostaty, stav po radioterapii, současná hormonální léčba, primoimplantace v září 2011, časný infekce *St. aureus*, proveden debridement, výměna hlavičky, proplachová laváž, antibiotika, patrná rychlá progresie rtg změn během roku – nepravidelná projasnění v Gruenových zónách 1–7, punkce negativní, FW 63/95, CRP 32 mg/l, a) 5. 1. 2012, b) 18. 7. 2012, c) 8. 10. 2012*

V ostatních případech byla chronická IKN hodnocena jako nepravděpodobná.

4.2.2. I. část

4.2.2.1. Předoperační diagnostika

V období 2009 – 2012 bylo vyšetřeno na naší klinice 100 pacientů s diferenciální diagnózou aseptického uvolnění a chronické IKN TEP kyčelního nebo kolenního kloubu.

Před operací byly zaznamenány: věk a pohlaví pacientů, typ endoprotézy (primární – revizní, TEP kyčelního kloubu – kolenního kloubu, cementovaná – hybridní - necementovaná), bolest v tříse a/nebo ve stehně u TEP kyčelního kloubu nebo v oblasti

TEP kolenního kloubu (vázaná na zátěž – klidová – náhle vzniklá, bolest od implantace – vznik po období bez obtíží, délka trvání bolesti), doba od implantace a doba obtíží, hodnoty FW a CRP a onemocnění v osobní anamnéze pacientů, která měla vliv na hodnotu těchto markerů, rentgenové změny (radioluce – migrace komponent). Zvýšená pravděpodobnost pro chronickou IKN byla také udávána, pokud k uvolnění endoprotézy došlo do 5 let od primoimplantace (Parvizi et al., 2011), proto byl sledován také tento parametr. Zároveň bylo cíleně zjišťováno užívání antibiotik v posledním roce před indikačním vyšetřením. Byl vyhodnocen Charleson comorbidity index u jednotlivých pacientů vyjadřující jejich předpokládanou mortalitu za 10 let podle komorbidit (Charleson et al., 1987).

Na základě výše uvedených kritérií byli pak pacienti řazeni do dvou skupin po 50 pacientech: chronická IKN nepravděpodobná a chronická IKN jistá nebo pravděpodobná.

Pacienti byli zařazeni do skupin tak, jak přicházeli náhodně k vyšetření a byli po sobě indikováni k operaci, žádný pacient nebyl vyloučen. Podmínkou dalšího hodnocení byl odběr 2–3 vzorků periprotetické tkáně a 2–3 částí implantátů dle operátora k mikrobiologickému vyšetření.

V první skupině byla provedena jednodobá reimplatace TEP, v druhé skupině byla TEP extrahována, při perspektivě dvoudobé reimplantace byl implantován dočasně antibiotický spacer s gentamicinem. Před operací nebyla minimálně 2 týdny podávána žádná antibiotika.

4.2.2.2. Kultivační vyšetření

Během operace byly odebrány 2–3 vzorky tkáně: tkáň z acetabula a dřevného kanálu femuru u TEP kyčelního kloubu, resp. tkáň pod femorální a tibiální komponentou u TEP

kolenního kloubu, eventuálně část pseudokapsuly. Dále byly vloženy 2–3 komponenty TEP do sterilní rukavice, následně do sterilního pevného kontejneru a ihned odeslány k mikrobiologickému vyšetření (Obr. 4).



a



b

Obr. 4

a) vložení polyetylénového pláta do sterilní rukavice, b) transport v plastovém kontejneru

Materiál byl zpracován v laboratoři Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty v Hradci Králové okamžitě po přijetí. Zpracování probíhalo v laminárním boxu. Odebrané tkáně byly před naočkováním kultivačních médií homogenizovány, extrahované komponenty kloubních náhrad byly zpracovány sonikační metodou v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut – podle metody publikované Trampuzem a kol. (Trampuz et al., 2007) a později Pilnáčkem a kol. (Pilnáček et al., 2011). Sonikát (fyziologický roztok, do kterého se uvolnily případné mikroorganismy z biofilmu na povrchu implantátů) a tkáně byly očkované na sadu kultivačních médií zvolených tak, aby byl umožněn průkaz pravděpodobných etiologických agens. Použita byla následující kultivační média: krevní agar, modifikovaný čokoládový agar, Mac Conkeyův agar,

Schaedlerův agar pro záchyt anaerobních mikroorganismů, Sabouraudův agar pro záchyt kvasinek, pro vzorky tkáně byl jako pomnožovací půda použit játrový bujón, 10 ml sonikační tekutiny bylo inokulováno do hemokultivační lahvičky BD BACTEC® Anaerobic.

Kultivační média byla inkubována při 37 °C v aerobním i anaerobním prostředí po dobu 14 dnů. Byla zaznamenána doba do uzavření definitivního mikrobiologického nálezu (typ patogena a citlivost k antibiotikům). Hemokultivační lahvičky byly vloženy do poloautomatického hemokultivačního přístroje BACTEC®. V případě pozitivního kultivačního nálezu byl izolát následně identifikován pomocí standardních bakteriologických identifikačních metod (barvení podle Grama, produkce plazmakoagulázy, VITEK identifikační testy pro podrobnou identifikaci grampozitivních, gramnegativních a anaerobních bakterií) a byla stanovena jeho citlivost k antibiotikům. K testování citlivosti k antibiotikům bylo použito doporučení Evropské komise EUCAST (kvalitativně – diskový difuzní test a kvantitativně – mikrodiluční metoda ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací nebo pomocí E-testu, proužku nasyceného antibiotikem v koncentračním gradientu). U jednotlivých izolátů byla testována jejich citlivost k řadě antibiotik, vhodných jednak k systémové, ale i lokální antibiotické terapii. U aerobních grampozitivních bakterií byla testována citlivost k oxacilinu, penicilinu, ampicilinu, ampicilinu/sulbaktamu, vankomycinu, rifampicinu, gentamicinu, cefoxitinu, klindamycinu, ciprofloxacinu a kotrimoxazolu; u gramnegativních bakterií byla testována citlivost k ampicilinu, ampicilinu/sulbaktamu, gentamicinu, cefuroximu, cefotaximu, ceftazidimu, imipenemu, meropenemu, ciprofloxacinu, amikacinu, kolistinu a kotrimoxazolu; u anaerobních bakterií pak byl testován vankomycin, klindamycin, metronidazol, amoxicilin/klavulanát.

Chronická IKN byla považována za prokázanou při kultivační pozitivitě ve ≥ 2 vzorcích s nálezem identického nebo identických agens, při kultivační pozitivitě pouze jednoho vzorku byl nález hodnocen jako kontaminace. Byla také porovnána identifikace i citlivost patogenů na antibiotika získaných z tkáně a ze sonikátu. **Mikrobiologické výsledky, a tedy průkaz infekce byl porovnán s předoperačním zařazením pacientů do skupin.**

Po průkazu chronické IKN nebo jejího vyloučení byly vytvořeny nové skupiny s definitivní diagnózou – aseptické a septické uvolnění TEP.

Pacientům s předoperační diagnózou aseptického uvolnění TEP a perioperačním průkazem IKN byla po reimplantaci podávána 6 týdnů antibiotika dle zjištěné citlivosti (3 týdny i.v., 3 týdny p.o.).

Všichni pacienti byli dále sledováni a byla zjišťována případná infekce v oblasti endoprotézy.

4.2.2.3. Statistická analýza

Pro statistickou analýzu byl použit program NCSS 9, Statistica 12. Pro kvantitativní hodnocení byla využita deskriptivní statistika (průměr, medián, standardní odchylka, standardní chyba, minimum, maximum, rozsah, kvartily – pro popis variability použit 1. a 3. kvartil). Kvantitativní porovnání mezi skupinami bylo provedeno t-testem. Testovala se hypotéza shody vůči alternativě neshody, byl použit neparametrický Mann-Whitney nebo Kolmogorov-Smirnov test. Pro hodnocení kvalitativních údajů byly použity tabulky absolutních četností, sloupcových procent (rozdělení v rámci skupiny), příspěvků chí-kvadrátu (pro popis případných závislostí). Zároveň se testovala hypotéza nezávislosti v kontingenční tabulce vůči alternativě závislosti. Byl použit chí-kvadrát test, při nesplnění předpokladů (minimální očekávaná četnost alespoň 5) byl použit Fisherův přesný test.

Pro výběr pořadí diagnostických parametrů, které nejvíce odlišovaly definitivní skupiny aseptického a septického uvolnění endoprotézy byla využita metoda logistické regrese (referenční skupina aseptického uvolnění, stanovení odds ratio s intervalem spolehlivosti).

Přínosnost jednotlivých metod kultivace (primokultivace tkáně, kultivace tkáně v pomnožovací tekuté půdě, primokultivace sonikační tekutiny, vyšetření sonikační tekutiny v hemokultivační lahvičce) na konečném výsledku aseptického nebo septického uvolnění endoprotézy byla hodnocena koeficientem kappa (hodnoty menší než 0,4 - nízká shoda, 0,4 - 0,75 - střední shoda, více jak 0,75 - vysoká míra shody).

Hladina významnosti byla $\alpha = 0,05$.

4.2.3. II. část

4.2.3.1. Hodnocení spektra patogenů a jejich citlivosti k antibiotikům

V druhé části se klinická studie zabývala hodnocením spektra patogenů a jejich citlivosti k antibiotikům u chronické IKN kyčelního nebo kolenního kloubu za období 2009 až 2014. Celkem byla v tomto časově vymezeném období hodnocena IKN u 93 pacientů (44 mužů, 49 žen), průměrného věku 68 let (rozmezí 45 – 89 let, medián 72 let).

Do studie byli zařazeni pacienti léčení na naší klinice, u kterých byla prokázána chronická IKN v oblasti TEP kyčelního nebo kolenního kloubu na základě kultivačního nálezu ve ≥ 2 vzorcích s identickými patogeny. Odběr vzorků tkání, implantátů k sonikaci a jejich zpracování bylo provedeno, jak je uvedeno v první části. Hodnoceno bylo zastoupení etiologických agens u IKN.

Bylo zaznamenáno spektrum patogenů chronické IKN a jejich citlivost k antibiotikům. U jednotlivých izolátů byla testována jejich citlivost k řadě antibiotik, vhodných jednak k systémové, ale i lokální antibiotické terapii (viz 4.2.2.2 Kultivační vyšetření).

Vzhledem k doporučené metodě léčby – dvoudobé reimplantaci s extrakcí TEP a implantaci spaceru, tvořeného cementem s obsahem antibiotika, kdy nejvíce používaný byl cement s obsahem gentamicinu, ale bylo možné použít i cement s klindamycinem nebo vankomycinem, byl věnován zvláštní zřetel k citlivosti patogenů k těmto antibiotikům a jejich kombinacím.

Studie nevyžadovaly schválení Etické komise.

4.3. Výsledky

4.3.1. I. část

4.3.1.1. Výsledky předoperační diagnostiky

1. skupina pacientů s nepravděpodobnou IKN

Skupinu 50 pacientů tvořilo 22 mužů (průměrný věk 63,9, rozsah 41,0 – 82,0, medián 63,5 let) a 28 žen (průměrný věk 69,2, rozsah 51,0 – 80,0, medián 70 let). Ve 44 případech se jednalo o TEP kyčelního kloubu (23x cementovaná TEP, 10x hybridní TEP, 11x necementovaná TEP, resp. 31x primární TEP, 13x revizní TEP). V 6 případech se jednalo o TEP kolenního kloubu, vždy cementovanou (3x primární TEP, 3x primární TEP s následnou osteosyntézou periprotetické zlomeniny). Průměrná doba revizní operace od implantace TEP byla 9,7 roku (rozsah 0,1 – 21,0, medián 9 let).

Pravděpodobnost přežití 10 let dle Charleson comorbidity indexu bylo u pacientů souboru průměrně 60,2 % (rozsah 0 – 96%, medián 77 %).

Bolesti pacienti udávali průměrně 22,7 měsíců (rozsah 1,0 – 84,0, medián 12,0 měsíců). V 7 případech byla bolest hodnocena jako náhle vzniklá po předchozím období nevýrazné bolesti vázané na zátěž (2x luxace TEP u malpozice komponent, 2x zlomenina dříku femorální komponenty – Obr. 5, 1x náhle uvolnění obou komponent při jejich malpozici, 2x periprotetická zlomenina femuru v terénu uvolněného implantátu).



Obr. 5

RTG snímek levého kyčelního kloubu. Tři měsíce klidové bolesti, předtím asi rok nevýrazné bolesti při zátěži končetiny, FW 8/16, CRP 1 mg/l, 17 let od revizní operace, kultura tkáň i sonikát negativní, klidové bolesti nebyly projevem infektu.

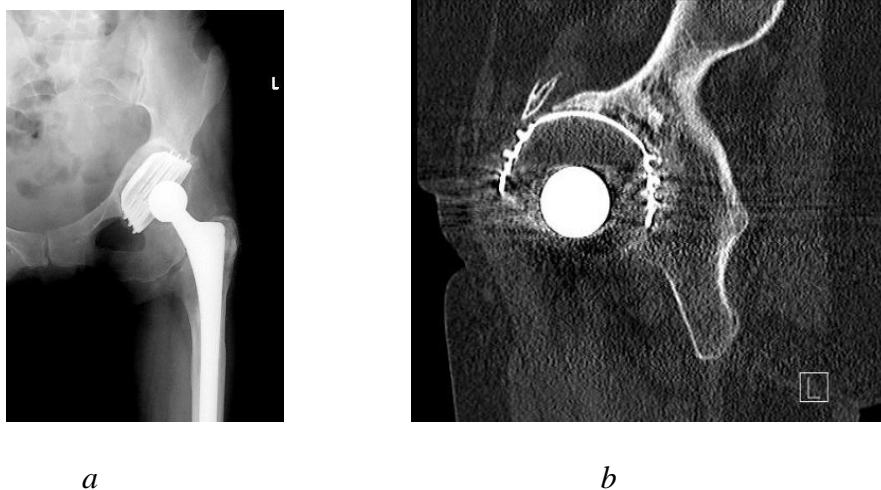
Ve 2 případech byla bolest hodnocena jako klidová (pacienti si nevzpomínali, že by předcházela bolest vázaná na zátěž, v jednom případě se jednalo o uvolnění TEP kyčelního kloubu s destrukcí acetabula, v druhém případě o uvolnění TEP kolenního kloubu se selháváním osteosyntézy periprotetické zlomeniny femuru – pro tyto známé příčiny klidové bolesti a nezvýšené CRP a FW nebyli zařazeni do skupiny pravděpodobné IKN). V 41 případech byla bolest charakterizována primárně jako vázaná na zátěž, klidové bolesti se přidaly u 23 pacientů z tohoto počtu při migraci komponenty implantátu. Žádný z pacientů neudával bolesti trvající od implantace.

Hodnoty CRP byly průměrně 4,1 mg/l (rozsah 0,0 – 16,0, medián 3,0 mg/l), hodnota nad 10,0 mg/l byla pouze u jednoho pacienta (16,0 mg/l) s infikovanou ulcerací při bazocelulárním karcinomu zad. Hodnoty FW byly průměrně 13 mm/hod (rozsah 1 –

43, medián 9 mm/hod), hodnoty nad 30 mm/hod byly nalezeny u 5 pacientů (3x revmatické onemocnění, 2x maligní tumor).

Pouze u 7 pacientů v této skupině byly zjištěny rentgenové změny splňující vstupní kritéria rychlé progresse uvolnění (důvody uvolnění jsou popsány výše – pacienti jsou identičtí s pacienty s náhle vzniklou bolestí, nebyli tedy zařazeni do skupiny pacientů s pravděpodobnou IKN).

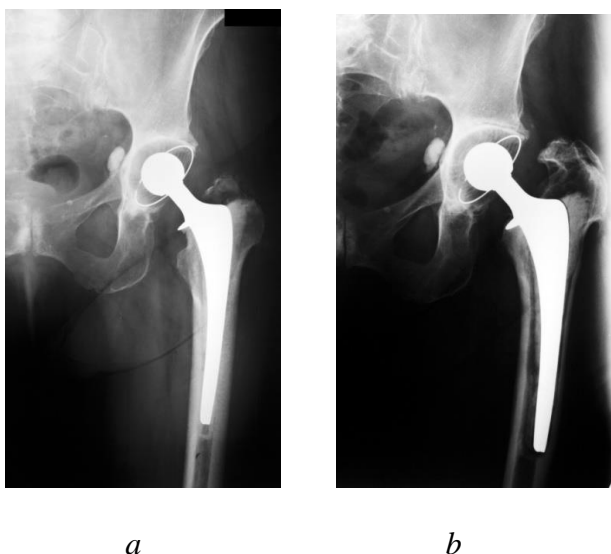
Do 5 let od implantace TEP byla zjištěna migrace implantátu nebo vznik radiolucenčních linií na rentgenovém snímku u 11 pacientů. U 3 pacientů se jednalo o akutní mechanické selhání krátkodobě po implantaci TEP pro původní malpozici komponent (náhle vzniklá bolest – 2x luxace TEP, 1x uvolnění celé TEP pro špatnou centraci komponent a cementovací techniku), u jedné pacientky byla příčinou bolesti uvolněná jamka a ventrálně prominující závitý závitorezná jamky při ventrálním kostním segmentálním defektu – iliopsoas impingement (Obr. 6).



Obr. 6

a) RTG snímek levého kyčelního kloubu, v AP projekci dobré krytí závitorezné jamky, pouze naznačen lem projasnění jamky v zóně II dle DeLee a Charnleye, b) na CT řezu ventrálně jamka nekryta, ossifikace ve šlaše m. iliopsoas, projasnění kolem jamky kraniálně a dorzálně, klinicky iliopsoas impingement sy s uvolněním jamky.

U ostatních 7 pacientů nebyla prokázána základními kritérii IKN (Obr. 7).



Obr. 7

a) RTG snímek levého kyčelního kloubu v AP projekci, st.p. TEP, b) uvolnění dříku po 4 letech od implantace, na AP projekci usurace laterální kortikalis femuru, nepravidelná projasnění kolem cementu dříku v Gruenových zónách 2-6, rtg obraz se suspekci na infekci, FW 3/11, CRP 1,5 mg/l, všechny kultivace tkání a sonikátů negativní.

V posledním roce před indikací operace žádný pacient neudával podávání antibiotik v souvislosti s bolestmi v oblasti postižené endoprotézy, pouze u jedné pacientky byla podávána antibiotická léčba (kotrimoxazol) pro recidivující infekci močových cest s provedením dilatace uretry.

2. skupina pacientů s jistou nebo pravděpodobnou IKN

Skupinu 50 pacientů tvořilo 23 mužů (průměrný věk 68,0, rozsah 50,0 – 85,0, medián 65 let) a 27 žen (průměrný věk 72,3, rozsah 49,0 – 89,0, medián 71 let). Ve 36 případech se jednalo o TEP kyčelního kloubu (18x cementovaná TEP, 4x hybridní TEP, 14x

necementovaná TEP, resp. 24x primární TEP, 12x revizní TEP). Ve 14 případech se jednalo o TEP kolenního kloubu, vždy cementovanou (12x primární TEP, 2x revizní TEP). Průměrná doba extrakce TEP od její implantace byla 4,1 roku (rozsah 0,5 – 17,0 let, medián 2 roky).

Pravděpodobnost přežití 10 let dle Charleson comorbidity indexu bylo u pacientů souboru průměrně 29 % (rozsah 0 – 96 %, medián 21 %).

Jistá IKN s nálezem píštěle komunikující s endoprotézou byla diagnostikována u 15 pacientů (30 % v souboru).

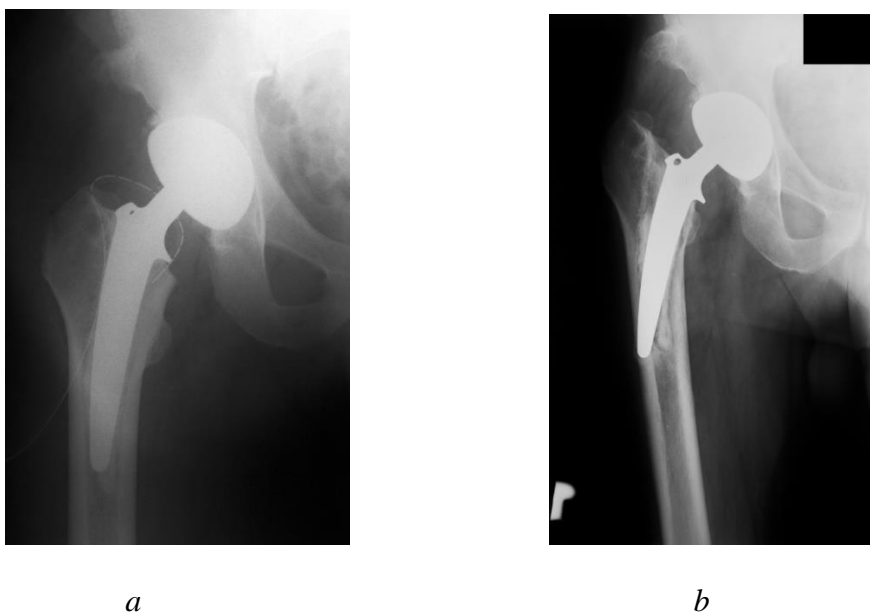
Bolesti pacienti udávali průměrně 10,1 měsíců (rozsah 1,0 – 30,0, medián 8,5 měsíců). Bolest v klidu, bez udávané vazby na zátěž končetiny, mělo 46 pacientů, z těchto pouze 8 uvedlo, že potíže mají trvale od implantace endoprotézy. V 4 případech byla bolest vázaná na zátěž končetiny (pro elevaci CRP a FW byli zařazeni do skupiny s pravděpodobnou IKN).

Z anamnestických údajů bylo zjištěno u těchto pacientů 50 operací v oblasti endoprotézy (reimplantace, revize pro infekt bez odstranění TEP), průměrně tedy 1 operace na jednoho pacienta po primoimplantaci. Reimplantace endoprotézy (celkem 14 pacientů, 12 kyčelních kloubů, 2 kolenní klouby) byly provedeny průměrně 3,8 roku po primoimplantaci (rozsah 0,1 – 17 let, přičemž 11 ze 14 reimplantací bylo provedeno do 5 let).

Hodnoty CRP byly průměrně 44,0 mg/l (rozsah 1,9 – 117,0, medián 38,7 mg/l), hodnoty pod 10,0 mg/l byly u 7 pacientů (všichni tito pacienti anamnesticky užívali antibiotika pro bolestivost v oblasti TEP, lehká zarudnutí, navíc u 3 pacientů byla přítomna píštěl komunikující s endoprotézou – hodnoceno jako jistá IKN, u ostatních dle dalších kritérií jako pravděpodobná IKN). Hodnoty FW byly průměrně 64 mm/hod (rozsah 14 – 120, medián 62 mm/hod), hodnoty pod 30 mm/hod byly nalezeny pouze u 2 pacientů

(u obou pacientů byla přítomna píštěl komunikující s endoprotézou, tedy hodnoceno jako jistá IKN, u první pacientky bylo patogenem *Cutibacterium acnes*, u druhého pacienta směs *St. hominis* a *St. caprae*).

Do 5 let od implantace TEP byla zjištěna migrace implantátu nebo vznik radiolucenčních linií na rentgenovém snímku u 39 pacientů (Obr. 8).



Obr. 8

a) RTG snímek pravého kyčelního kloubu v AP projekci, stav po TEP, b) po 4 letech septické uvolnění dřívku s varizací a perforací kortikalis femuru, FW 52/88, CRP 14 mg/l, kultivačně ve tkáni i sonikátu - *St. aureus*, *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*.

Z toho u 24 pacientů byly zjištěny rentgenové změny splňující vstupní kritéria rychlé progresi uvolnění. U ostatních 15 pacientů se v 13 případech jednalo o akutní IKN, která byla operacemi a antibiotickou léčbou změněná na chronickou bez rentgenových změn odpovídajících rychlé progresi uvolnění. U jednoho pacienta tato kritéria byla splněna hraničně – uvolnění jamky TEP kyčelního kloubu bylo zřejmé po 14 měsících, kultivačně bylo zjištěno *Cutibacterium acnes*. U poslední pacientky byly příčinou bolestí uvolněný

dřík a ventrálně prominující závitý závitorezná jamky při ventrálním kostním segmentálním defektu – iliopsoas impingement, tentokrát však s pozitivní zánětlivou laboratoří a kultivačně byl zjištěn *St. epidermidis*.

V 11 případech byla provedena extrakce endoprotézy po více než 5 letech od implantace. Z toho u 7 pacientů se jednalo o akutní IKN převedenou pozdní diagnostikou nebo supresivní léčbou do chronicity v odstupe 11 – 17 let od primoimplantace, u zbývajících 4 pacientů byla opožděně diagnostikována chronická IKN (6 – 7 let od primoimplantace). U těchto pacientů nebyly splněny podmínky rychlé progresu uvolnění.

V posledním roce před indikací operace byla 24 pacientům podávána antibiotika v souvislosti s bolestmi v oblasti postižené endoprotézy (17 x empiricky amoxicilin/klavulanát, 6 x empiricky klindamycin, 1 x cíleně cefotaxim a ciprofloxacin pro infekci *Salmonella Enteritidis*, která byla prokázána i jako původce IKN).

4.3.1.2. Výsledky kultivačních metod a porovnání shody s předoperační diagnostikou

1. skupina pacientů s nepravděpodobnou IKN (Tab. 2)

Tab. 2. Kultivační nálezy ve skupině pacientů s nepravděpodobnou IKN

Pozitivní kultivační nález
 Kontaminace

Číslo pacienta	Primokultivace tkáně	Kultivace tkáně v bujónu	Primokultivace sonikátů	Sonikát v hemokultivační lahvičce	Hodnocení Dg dle tkáně T Dg dle sonikátu S
1	3x negativní	3x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
2	1x negativní 1x <i>St. epidermidis</i> 1x <i>St. hominis</i>	3x negativní	3x negativní	3x negativní	Negativní S (dva neidentické patogeny, kontaminace tkáně)
3	3x negativní	3x negativní	3x negativní	3x negativní	Negativní T
4	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
5	3x negativní	3x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
6	3x negativní	3x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
7	3x negativní	3x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
8	3x negativní	3x negativní	3x negativní	3x negativní	Negativní T
9	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
10	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
11	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
12	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
13	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
14	3x negativní	3x <i>St. capitis</i>	2x <i>St. capitis</i>	2x <i>St. capitis</i>	Pozitivní T, S (identický patogen)

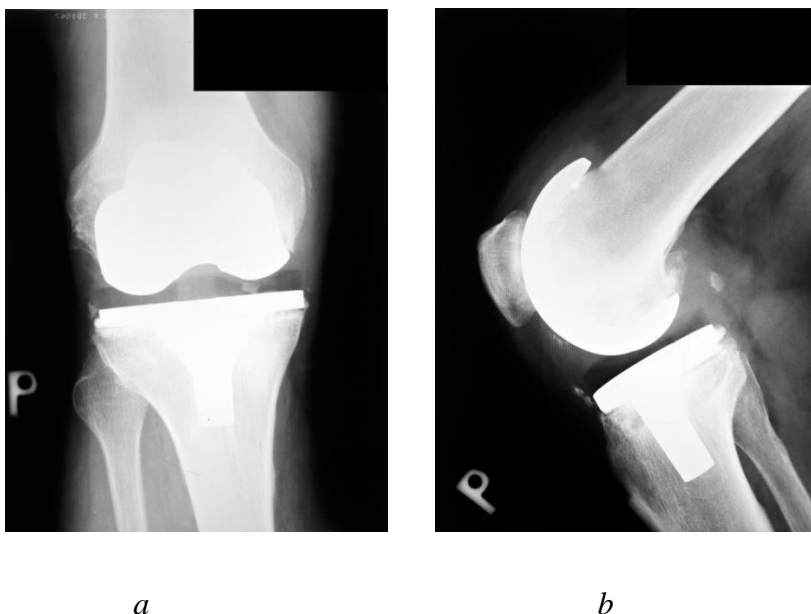
Číslo pacienta	Primokultivace tkáně	Kultivace tkáně v bujónu	Primokultivace sonikátů	Sonikát v hemokultivační lahvičce	Hodnocení Dg dle tkáně T Dg dle sonikátu S
15	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
16	2x negativní	2x negativní	3x negativní	3x negativní	Negativní T
17	3x negativní	3x negativní	3x negativní	3x negativní	Negativní T
18	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
19	3x negativní	3x negativní	3x negativní	2x negativní, 1x <i>St. capitis</i>	Negativní T (jeden patogen, kontaminace)
20	2x negativní 1x <i>St. warneri</i>	3x negativní	3x negativní	3x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní S (3x ident. pat., kontaminace tkáně)
21	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
22	2x negativní	2x negativní	2x negativní	1x negativní, 1x <i>Cutibacterium acnes</i>	Negativní T (kontaminace)
23	3x negativní	3x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
24	2x negativní	2x negativní	3x negativní	3x negativní	Negativní T
25	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
26	3x negativní	2x negativní, 1x <i>St. hominis</i>	2x negativní	2x negativní	Negativní S (kontaminace)
27	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
28	2x negativní	2x negativní	1x negativní, 1x <i>St. epidermidis</i>	2x negativní	Negativní T (kontaminace)
29	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
30	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
31	3x negativní	3x negativní	3x negativní	3x negativní	Negativní T
32	3x <i>St. epidermidis</i>	3x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní T (identické patogeny)

Číslo pacienta	Primokultivace tkáně	Kultivace tkáně v bujónu	Primokultivace sonikátů	Sonikát v hemokultivační lahvičce	Hodnocení Dg dle tkáně T Dg dle sonikátu S
33	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
34	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
35	3x negativní	3x negativní	3x negativní	3x negativní	Negativní T
36	2x negativní, 1x <i>St. cohnii</i>	2x negativní, 1x <i>St. cohnii</i> ze stejného vzorku tkáně	2x negativní	2x negativní	Negativní S (kontaminace)
37	3x negativní	3x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
38	1x <i>Cutibacterium acnes</i>	2x negativní	2x <i>Cutibacterium acnes</i>	2x <i>Cutibacterium acnes</i>	Pozitivní S (ident. patog.)
39	3x negativní	3x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
40	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
41	3x negativní	3x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
42	2x negativní	2x negativní	2x negativní	1x negativní, 1x <i>St. epidermidis</i>	Negativní T (kontaminace)
43	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
44	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
45	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
46	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
47	3x negativní	3x negativní	3x negativní	3x negativní	Negativní T
48	2x negativní	2x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T
49	3x negativní	3x negativní	3x negativní	3x negativní	Negativní T
50	3x negativní	3x negativní	2x negativní	2x negativní	Negativní T

Ze skupiny 50 pacientů s původní předoperační diagnózou nepravděpodobné IKN byl kultivačními metodami z peroperačních vzorků zjištěn infekt u 4 pacientů (8 %).

V prvním případě (pacient číslo 14) se jednalo o necementovanou TEP kyčelního kloubu, pacient měl bolesti při zátěži, negativní FW a CRP (FW 6 mm/hod, CRP 8 mg/l), nebyly známky rychlého uvolnění TEP (pouze projasnění v Gruenových zónách 1 a 2). Jediným pozitivním, ale vedlejším kritériem pro podezření na IKN, byla doba od primoimplantace 3 roky. Primokultivace tkáně byla negativní ve všech vzorcích, pozitivita byla v kultivaci tkáně v bujónu a obou typech kultivace sonikátu (*St. capitis*), definitivní diagnóza byla tedy stanovena s přispěním sonikace (primokultivace tkáně negativní).

V druhém případě (pacient číslo 20) se jednalo o TEP kolenního kloubu, pacient měl bolesti při zátěži, negativní FW a CRP (FW 5 mm/hod, CRP 1,5 mg/l), nebyly známky rychlého uvolnění TEP (pouze náznak projasnění v Ewaldově zóně 1 pod tibiální komponentou). Punkce nitrokloubní tekutiny byla kultivačně negativní. Jediným pozitivním, ale vedlejším kritériem pro podezření na IKN, byla doba od primoimplantace 2 roky. Primokultivace tkáně byla v jednom vzorku ze tří kontaminována (*St. warneri*), kultivace tkáně v bujónu byly negativní ve všech vzorcích, pozitivita byla v kultivaci tekutiny sonikátu nezávisle ve všech vzorcích (*St. epidermidis*), definitivní diagnóza byla tedy stanovena na základě sonikace (Obr. 9).



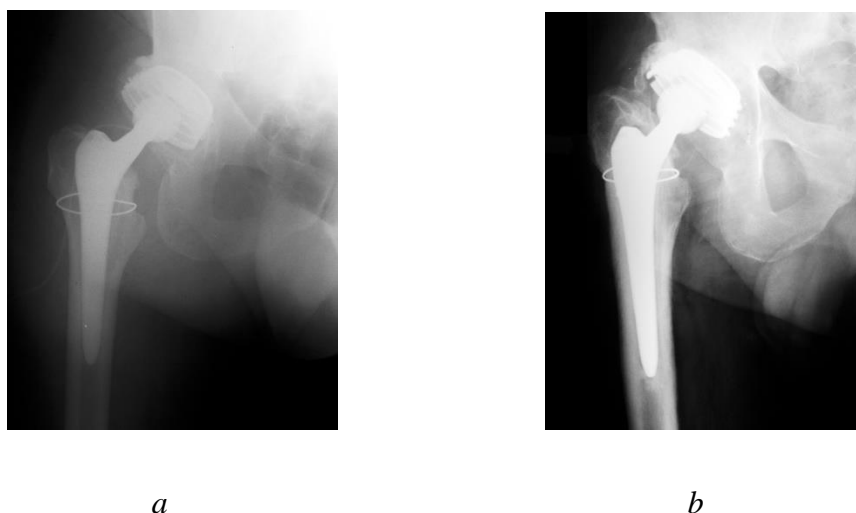
Obr. 9

RTG snímek pravého kolenního kloubu v AP a bočné projekci, náznak projasnění pod mediální částí tibiální komponenty – zóna 1 dle Ewalda, punkce negativní, FW 5/hod, CRP 1,5 mg/hod, kultura tkáň negativní, pozitivní sonikát na všech komponentách – St. epidermidis.

Ve třetím případě (pacient číslo 32) se jednalo o hybridní TEP kyčelního kloubu, pacientka měla bolesti při zátěži, negativní FW a CRP (FW 12 mm/hod, CRP 4 mg/l), nebyly známky rychlého uvolnění TEP (pouze projasnění v Gruenových zónách 2, 3, 5). Jediným pozitivním, ale vedlejším kritériem pro podezření na IKN, byla doba od primoimplantace 4,8 roků. V anamnéze byl léčený karcinom rekta a recidivující infekce močových cest léčený opakovaně kotrimoxazolem, opakovaně provedena dilatace uretry. Ze všech kultur vyšel *St. epidermidis*, k definitivní diagnóze tedy stačilo vyšetření tkáně.

V posledním případě (pacient číslo 38) se jednalo o necementovanou TEP kyčelního kloubu, pacient měl bolesti při zátěži, negativní FW a CRP (FW 10 mm/hod, CRP 4 mg/l), nebyly známky rychlého uvolnění TEP (zapadání dřívku trvalo déle než rok). Jediným

pozitivním, ale vedlejším kritériem pro podezření na IKN, byla doba od primoimplantace 2 roky. Primokultivace tkáně byla hraničně pozitivní pouze v jednom vzorku, zatímco obě sonikace byly jasně pozitivní ve všech vzorcích na *Cutibacterium acnes*, kultivace tkáně v bujónu byla kompletně negativní. Definitivní diagnóza byla tedy stanovena na základě sonikace (Obr. 10).



Obr. 10

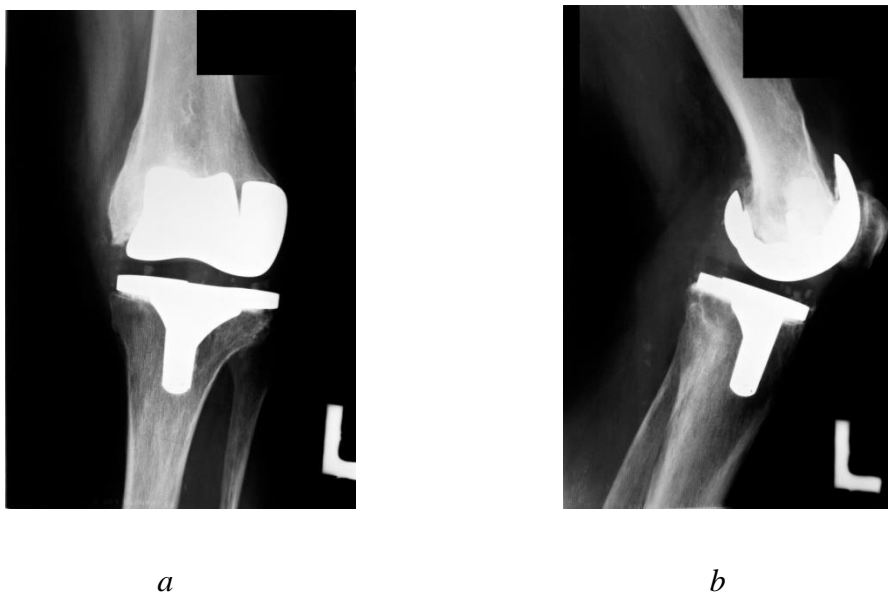
RTG snímek pravého kyčelního kloubu v AP projekci (a) 2009 primoimplantace, peroperační fissura femuru řešena cerkláží, b) 2011, FW 10/hod, CRP 4, punkce a scintigrafie skeletu negativní, na RTG zapadání dříku. Sonikát: Cutibacterium acnes (prolongovaná kultivace).

Všem těmto 4 pacientům byla 6 týdnů podávána antibiotika dle zjištěné citlivosti a recidiva IKN nebyla zaznamenána v průměru 6,1 let (rozsah 3,6 až 7,6 let).

V 8 případech byl nález hodnocen jako kontaminace (7x pozitivita jednoho vzorku, 1x pozitivita dvou neidentických patogenů). Sonikát v hemokultivační lahvičce byl kontaminován 3x, primokultivace tkáně 3x, kultivace tkáně v bujónu a primokultivace sonikátů 1x.

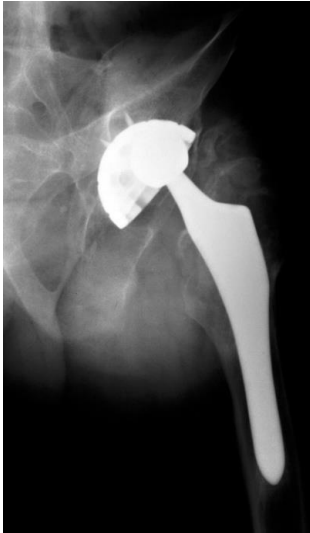
U 46 pacientů, kde bylo potvrzeno aseptické uvolnění, nedošlo k IKN během dalšího sledování v průměru 6,2 let (rozsah 4,1 až 8,0 let).

Sonikace implantátů přispěla k definitivní diagnóze při negativě kultivace tkáně a klinickém nebo radiologickém podezření na IKN (Obr. 11), kontaminaci tkáně, u pacientů s elevací zánětlivých markerů z jiného důvodu než IKN (revmatoidní artritida, tumor) (Obr. 12, 13).



Obr. 11

RTG snímek levého kolenního kloubu v AP a) a bočné projekci b), v bočné projekci patrné uvolnění femorální komponenty (zejména v Ewaldově zóně 1,2,5), punkce negativní, FW 20/hod, CRP 2,3 mg/l, kultura tkáně i sonikát negativní ve všech vzorcích, histopatologický nálezn v tkáni negativní na infekci.



Obr. 12

RTG snímek levého kyčelního kloubu v AP projekci z roku 2012. Primoimplantace 2006, pacient s M. Bechtěrev, bolesti rok, FW 43/67, CRP 15 mg/l, užívající Prednison. Peroperačně nález rozsáhlé metalózy (možnost positivity alfa-defensinu) – odpovídá kontaktu kovové hlavičky kovové části jamky. Prolongovaná kultivace tkáně a sonikátu ve všech vzorcích negativní.



a



b

Obr. 13

RTG snímek pravého kyčelního kloubu v AP projekci, a) primoimplatace v roce 2005 u pacienta s revmatoidní artritidou, b) v roce 2012 migrace jamky (uvolnění v zónách I - III dle DeLee a Charnleye), projasnění kolem dřívku (Gruenovy zóny 1,2,5,6,7), antibiotiky přeléčena burzitida olekranu, FW 30/56, CRP 9 mg/l, prolongovaná kultivace tkání i sonikace ve všech vzorcích negativní, potvrzení aseptického uvolnění.

2. skupina pacientů s jistou nebo pravděpodobnou IKN (Tab. 3)

Tab. 3. Kultivační nálezy ve skupině pacientů s jistou nebo pravděpodobnou IKN

- Pacientům byla podávána anamnesticky antibiotika
- Nález hodnocen jako kontaminace (neidentické patogeny)
- Rozdílná citlivost na atb

Číslo pacienta	Primokultivace tkáně	Kultivace tkáně v bujónu	Primokultivace sonikátů	Sonikát v hemokultivační lahvičce	Hodnocení Dg dle tkáně T Dg dle sonikátu S
1	1x negativní, 2x <i>St. aureus</i>	1x negativní, 2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	Pozitivní T
2	2x negativní	2x negativní	2x <i>Escherichia coli</i>	2x <i>Escherichia coli</i>	Pozitivní S
3	3x <i>St. aureus</i>	3x <i>St. aureus</i>	3x <i>St. aureus</i>	3x <i>St. aureus</i>	Pozitivní T
4	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	Pozitivní T
5	Negativní	Negativní	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní S
6	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	Pozitivní T
7	1x negativní 1x <i>St. warneri</i>	2x negativní	3x <i>St. warneri</i>	3x <i>St. warneri</i>	Pozitivní S
8	3x <i>Enterococcus faecalis</i>	3x <i>Enterococcus faecalis</i>	2x <i>Enterococcus faecalis</i>	2x <i>Enterococcus faecalis</i>	Pozitivní T
9	2x <i>Bacteroides vulgatus</i>	2x negativní	2x <i>Bacteroides vulgatus</i>	2x <i>Bacteroides vulgatus</i>	Pozitivní T
10	2x <i>Escherichia coli</i>	2x <i>Escherichia coli</i>	2x <i>Escherichia coli</i>	2x <i>Escherichia coli</i>	Pozitivní T
11	2x negativní	2x negativní	2x <i>Cutibacterium acnes</i>	2x <i>Cutibacterium acnes</i>	Pozitivní S
12	2x negativní, 1x <i>St. aureus</i>	2x negativní, 1x <i>St. aureus</i>	3x <i>St. aureus</i>	3x <i>St. aureus</i>	Pozitivní S
13	2x negativní	2x negativní	2x <i>St. hominis</i> + 2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	Pozitivní S
14	3x <i>Parvimonas micra</i>	3x negativní	3x <i>Parvimonas micra</i>	3x <i>Parvimonas micra</i>	Pozitivní T
15	3x negativní	3x negativní	2x negativní	2x <i>Salmonella</i> <i>Enteritidis</i>	Pozitivní S
16	2x <i>Cutibacterium acnes</i>	2x <i>Cutibacterium acnes</i>	2x <i>Cutibacterium acnes</i>	2x <i>Cutibacterium acnes</i>	Pozitivní T

Číslo pacienta	Primokultivace tkáně	Kultivace tkáně v bujónu	Primokultivace sonikátů	Sonikát v hemokultivační lahvičce	Hodnocení Dg dle tkáně T Dg dle sonikátu S
17	2x <i>St. hominis</i>	2x <i>St. hominis</i>	2x <i>St. hominis</i> + 2x <i>St. caprae</i>	2x <i>St. hominis</i> + 2x <i>St. caprae</i>	Pozitivní S
18	2x <i>St. lugdunensis</i>	2x <i>St. lugdunensis</i>	2x <i>St. lugdunensis</i>	2x <i>St. lugdunensis</i>	Pozitivní T
19	2x negativní	1x negativní, 1x <i>Cor. striatum</i>	2x <i>Cor. striatum</i>	2x <i>Cor. striatum</i>	Pozitivní S
20	3x <i>St. aureus</i>	3x <i>St. aureus</i>	3x <i>St. aureus</i>	3x <i>St. aureus</i>	Pozitivní T
21	2x <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2x <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2x <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2x <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pozitivní T
22	1x negativní, 1x <i>St. epidermidis</i>	1x negativní, 1x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní S
23	2x <i>Streptococcus anginosus</i>	2x <i>Streptococcus anginosus</i>	2x <i>Streptococcus anginosus</i>	2x <i>Streptococcus anginosus</i>	Pozitivní T
24	2x <i>Parvimonas micra</i>	2x <i>Parvimonas micra</i>	2x <i>Parvimonas micra</i>	2x <i>Parvimonas micra</i>	Pozitivní T
25	2x <i>Finegoldia magna</i>	2x <i>Finegoldia magna</i>	2x <i>Finegoldia magna</i>	2x <i>Finegoldia magna</i>	Pozitivní S senzitivita
26	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní T
27	2x negativní 1x <i>St. saccharolyticus</i>	3x negativní	3x <i>St. saccharolyticus</i>	3x <i>St. saccharolyticus</i>	Pozitivní S
28	2x negativní	1x negativní, 1x <i>Enterococcus faecium</i>	2x <i>Enterococcus faecium</i>	2x <i>Enterococcus faecium</i>	Pozitivní S
29	2x <i>Streptococcus agalactiae</i>	2x <i>Streptococcus agalactiae</i>	2x <i>Streptococcus agalactiae</i>	2x <i>Streptococcus agalactiae</i> + 2x <i>Escherichia coli</i>	Pozitivní S
30	2x <i>St. aureus</i> + 2x <i>Enterobacter cloacae</i>	2x <i>St. aureus</i> + 2x <i>Enterobacter cloacae</i>	2x <i>St. aureus</i> + 2x <i>Enterobacter cloacae</i>	2x <i>St. aureus</i> + 2x <i>Enterobacter cloacae</i>	Pozitivní T
31	2x <i>St. aureus</i> + 2x <i>Enterobacter sp.</i> + 2x <i>Escherichia coli</i>	2x <i>St. aureus</i> + 2x <i>Enterobacter sp.</i> + 2x <i>Escherichia coli</i>	2x <i>St. aureus</i> + 2x <i>Enterobacter sp.</i> + 2x <i>Escherichia coli</i>	2x <i>St. aureus</i> + 2x <i>Enterobacter sp.</i> + 2x <i>Escherichia coli</i>	Pozitivní T

Číslo pacienta	Primokultivace tkáně	Kultivace tkáně v bujónu	Primokultivace sonikátů	Sonikát v hemokultivační lahvičce	Hodnocení Dg dle tkáně T Dg dle sonikátu S
32	1x negativní, 2x <i>St. epidermidis</i>	1x negativní, 2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní T
33	2x negativní, 1x <i>St. epidermidis</i>	2x negativní, 1x <i>St. epidermidis</i>	2x negativní	2x <i>St. haemolyticus</i> + <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní S senzitivita
34	2x negativní	1x negativní, 1x <i>Enterococcus faecalis</i>	2x <i>Enterococcus faecalis</i>	2x <i>Enterococcus faecalis</i>	Pozitivní S
35	3x <i>St. epidermidis</i>	3x <i>St. epidermidis</i>	3x <i>St. epidermidis</i>	3x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní T
36	1x negativní, 1x <i>St. warneri</i>	2x negativní	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní S (kontaminace)
37	3x <i>Streptococcus agalactiae</i>	3x <i>Streptococcus agalactiae</i>	3x <i>Streptococcus agalactiae</i>	3x <i>Streptococcus agalactiae</i>	Pozitivní S senzitivita
38	3x <i>St. epidermidis</i>	3x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní T
39	2x <i>Cutibacterium acnes</i>	2x <i>Cutibacterium acnes</i>	2x <i>Cutibacterium acnes</i>	2x <i>Cutibacterium acnes</i>	Pozitivní T
40	Negativní	Negativní	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	Pozitivní S
41	3x <i>St. epidermidis</i>	3x <i>St. epidermidis</i>	3x <i>St. epidermidis</i>	3x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní T
42	1x negativní, 1x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní T
43	2x negativní	2x negativní	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní S
44	3x <i>St. hominis</i>	3x <i>St. hominis</i>	3x <i>St. hominis</i>	3x <i>St. hominis</i>	Pozitivní T
45	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	Pozitivní T
46	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	Pozitivní T
47	2x <i>St. haemolyticus</i>	2x <i>St. haemolyticus</i>	2x <i>St. haemolyticus</i>	2x <i>St. haemolyticus</i> + 2x <i>St. aureus</i>	Pozitivní S
48	3x <i>St. aureus</i>	3x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	2x <i>St. aureus</i>	Pozitivní T
49	2x <i>St. hominis</i>	1x negativní, 1x <i>St. hominis</i>	2x <i>St. hominis</i>	2x <i>St. hominis</i>	Pozitivní T
50	2x negativní	2x negativní	2x <i>St. epidermidis</i>	2x <i>St. epidermidis</i>	Pozitivní S

U všech 50 pacientů s předoperační diagnózou jisté nebo pravděpodobné IKN byla na základě výsledků kultivací peroperačně získaných vzorků potvrzena IKN a získán kauzální patogen.

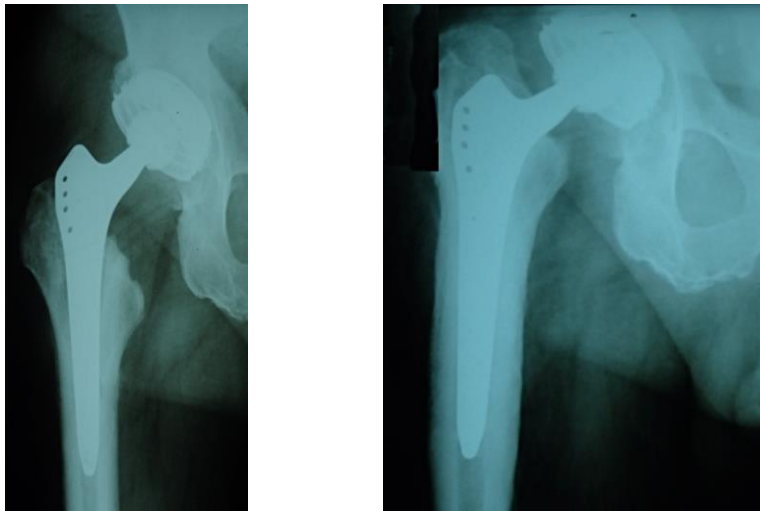
Pouze jednou byl nález ve vzorku tkáně hodnocen jako kontaminace.

U 27 pacientů postačila k diagnostice **kultivace** vzorků **tkáně** – **54 %** (zároveň byl pozitivní nález i ze sonikátu), u 23 pacientů byla diagnostika založena pouze na výsledku **sonikace extrahovaných komponent** – **46 %** (16x negativní tkáň - pozitivní sonikát, 4x nález další bakterie v sonikátech, 3x různá citlivost patogenů na antibiotika v porovnání tkáň – sonikát). Pacientů, kterým byla v anamnéze podávána antibiotika, bylo 6 z 28 v případě diagnostiky z tkáně a 18 z 22 v případě diagnostiky pouze ze sonikátu (Obr. 14, 15).



Obr. 14

*RTG snímek pravého kyčelního kloubu v AP projekci z roku 2012, primoimplantace 1995. Pacientka byla léčena na interním oddělení pro septický stav nejasné etiologie antibiotiky, v LDN náhle vznik píštěle v oblasti pravého kyčelního kloubu, FW 101/135, CRP 45, na RTG kompletní uvolnění TEP (všechny zóny dle DeLee a Charnleye a dle Gruena), vzorky tkáně kultivačně negativní, v sonikátu *St. aureus*.*



a

b

Obr. 15

*RTG snímek pravého kyčelního kloubu v AP projekci, a) 2010, b) 2012. Anamnesticky asi rok bolesti, antibiotika pro zarudnutí v oblasti pravého kyčelního kloubu, FW 38/80, CRP 13, punkce negativní, na RTG zapadání dřívku, apozice diafýzy femuru (maximálně v Gruenových zónách 2,3,5,6), kultura tkáň negativní, sonikát ve všech vzorcích *St. epidermidis**

Celkem u 3 pacientů (v tabulce v kolonce hodnocení označeno červeným polem - senzitivita) byla zjištěna rozdílná citlivost na antibiotika při stejném patogenu ve tkáni a v sonikátu: 2x byl sonikát polyetylenové komponenty rezistentní na gentamicin, 1x všechny komponenty TEP kyčelního kloubu rezistentní na gentamicin, ciprofloxacin, ampicilin/sulbaktam, kotrimoxazol (Obr. 16). U 4 pacientů byl zjištěn signifikantně ze sonikátu ve srovnání s tkání další patogen (*St. aureus*, *Escherichia coli*, *St. haemolyticus*, *St. caprae*).



a

b

Obr. 16

*RTG snímek pravého kyčelního kloubu v AP projekci po TEP, anamnesticky opakované revizní operace, včetně ATB terapie, diff dg alergie na kovy a chronická IKN, FW 82/126, CRP 53 mg/l, a) 4. revizní operace, b) po 4 letech migrace jamky (uvolnění v zónách I – III dle DeLee a Charnleye), kultivačně *St. epidermidis*, v sonikátu ale rezistentní na gentamicin, kotrimoxazol, ampicilin/sulbaktam a ciprofloxacin.*

4.3.1.3. Statistické hodnocení skupin pacientů s definitivní diagnózou aseptického a septického uvolnění endoprotézy

Přeřazením 4 pozitivních pacientů na IKN byly získány 2 nové skupiny: skupina o 46 pacientech s aseptickým uvolněním endoprotézy a skupina o 54 pacientech s IKN.

Kvantitativní parametry

1. skupina aseptického uvolnění endoprotézy

Počet

46 pacientů

Věk (roky)

Průměr 67,3, standardní odchylka 8,5, standardní chyba 1,2, minimum 41, maximum 82,

1. kvartil 62, 3. kvartil 73,3

Charlson comorbidity index (%)

Průměr 61,5, standardní odchylka 32,5, standardní chyba 4,8, minimum 2, maximum 96,

1. kvartil 21, 3. kvartil 90

Doba od implantace (roky)

Průměr 10,3, standardní odchylka 5,7, standardní chyba 0,8, minimum 0,1, maximum 21,

1. kvartil 5,8, 3. kvartil 15

Doba obtíží (měsíce)

Průměr 22,3, standardní odchylka 20,7, standardní chyba 3,0, minimum 1, maximum 84,

1. kvartil 9,8, 3. kvartil 36,0

FW (mm/hod)

Průměr 13,6, standardní odchylka 11,2, standardní chyba 1,6, minimum 1, maximum 43,

1. kvartil 5,0, 3. kvartil 20,3

CRP (mg/l)

Průměr 3,9, standardní odchylka 3,4, standardní chyba 0,5, minimum 0, maximum 16,

1. kvartil 1, 3. kvartil 6

2. skupina IKN**Počet**

54 pacientů

Věk (roky)

Průměr 69,7, standardní odchylka 10,8, standardní chyba 1,5, minimum 49, maximum 89,

1. kvartil 61,8, 3. kvartil 80,3

Charlson comorbidity index (%)

Průměr 30,9, standardní odchylka 33,6, standardní chyba 4,6, minimum 0, maximum 96,

1. kvartil 0, 3. kvartil 53

Doba od implantace (roky)

Průměr 4,0, standardní odchylka 4,5, standardní chyba 0,6, minimum 0,5, maximum 17,

1. kvartil 1,0, 3. kvartil 4,8

Doba obtíží (měsíce)

Průměr 11,4, standardní odchylka 9,5, standardní chyba 1,3, minimum 1, maximum 48,

1. kvartil 5, 3. kvartil 15

FW (mm/hod)

Průměr 60,4, standardní odchylka 29,7, standardní chyba 4,0, minimum 5, maximum 120,

1. kvartil 37,8, 3. kvartil 83,3

CRP (mg/l)

Průměr 41,1, standardní odchylka 30,6, standardní chyba 4,2, minimum 1,5, maximum 117,

1. kvartil 13,8, 3. kvartil 66,8

T-test

Obě skupiny se odlišovaly ve všech uvedených parametrech na stanovené hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Kvalitativní parametry

Na stanovené hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byly na konečném výsledku (aseptické/septické)

nezávislé parametry:

1. pohlaví,

2. typ endoprotézy,

závislé parametry:

1. doba od implantace do 5 nebo nad 5 let (u IKN 79,6 % do 5 let, u aseptického uvolnění 15,2 % do 5 let),
2. typ bolesti (u IKN 85,2 % bolest v klidu, u aseptického uvolnění 78,3 % bolest vázaná na zátěž),
3. rychlá RTG progrese uvolnění endoprotézy (u IKN ve 44,4 %, u aseptického uvolnění v 15,2 %).

4.3.1.4. Stanovení nejvýznamnějších předoperačních diagnostických parametrů pro odlišení chronické IKN a aseptického uvolnění endoprotézy

Pořadí parametrů odlišujících obě skupiny (logistická regrese)

Koeficient determinace R 0,94 – 0,99

1. **CRP** (hranice 10 mg/l), 95% limit intervalu spolehlivosti 6470.
2. **Doba od implantace** (hranice 5 let), 95% limit intervalu spolehlivosti 3063.
3. **Bolest klidová vs ostatní**, 95% limit intervalu spolehlivosti 622.
4. **FW** (hranice 30 mm/hod), 95% limit intervalu spolehlivosti 305.
5. **RTG progrese uvolnění** (během 1 roku), 95% limit intervalu spolehlivosti 1,4.

4.3.1.5. Porovnání přínosnosti kultivačních metod pro rozlišení chronické IKN a aseptického uvolnění endoprotézy

Přínosnost jednotlivých metod kultivace dle koeficientu kappa

1. sonikát v hemokultivační lahvičce	procento shody	0,94197
2. primokultivace sonikátu	procento shody	0,92296
3. primokultivace tkáně	procento shody	0,66680
4. kultivace tkáně v bujónu	procento shody	0,65279

4.3.1.6. Význam prolongované kultivace

Tab. 4. Ukončení nálezů kultivace mikrobiologem u jednotlivých druhů patogenů

Patogen	Interval odběr – ukončení nálezů (dny)			
	Průměr	Min	Max	Medián
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,3	1	2	1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,7	1	2	2,0
<i>Escherichia coli</i>	2,3	2	3	2,0
<i>Enterobacter species</i>	2,3	2	3	2,0
<i>St. aureus</i>	2,4	1	5	2,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,4	2	3	2,0
koagulázanegativní stafylokoky - jiné	2,7	2	3	3,0
<i>St. lugdunensis</i>	3,0	3	3	3,0
<i>St. capitis</i>	3,7	3	6	3,0
<i>St. epidermidis</i>	4,1	2	12	3,0
<i>Bacteroides vulgatus</i>	5,0	5	5	5,0
<i>St. hominis</i>	5,4	1	12	6,0
<i>Parvimonas micra</i>	5,5	4	8	6,0
<i>St. haemolyticus</i>	5,8	3	8	5,0
<i>Salmonella Enteritidis</i>	6,0	6	6	6,0
<i>Fingoldia magna</i>	6,0	3	9	6,0
<i>St. warneri</i>	7,0	7	7	7,0
<i>St. saccharolyticus</i>	7,1	6	8	7,0
<i>Cutibacterium acnes</i>	8,9	5	13	8,0
<i>Cor. species</i>	12,7	12	14	12,0

Výsledky jsou ovlivněny předchozí léčbou, zejména operačními výkony a antibiotiky.

Ukončení nálezů kultivace mikrobiologem po více dnech, než je obvyklé u klasické kultivace 48 hodin odpovídá prolongované kultivaci. Její význam je patrný pro anaerobní bakterie (*Bacteroides vulgatus*, *Parvimonas micra*, *Finegoldia magna* a *Cutibacterium acnes*) (Obr. 17), *Cor.* sp. a některé kmeny koagulázanegativních stafylokoků. V případě *Salmonella* Enteritidis se jednalo o ojedinělý případ, kdy pacientka byla opakovaně operována na jiném pracovišti, včetně extrakce části TEP kyčelního kloubu a léčena antibiotiky, proto byl výsledek kultivace na našem pracovišti zjištěn až prolongovaně po odstranění všech komponent.



Obr. 17

RTG snímek pravého kyčelního kloubu v AP projekci 2 roky po primoimplantaci, paraartikulární ossifikace, projasnění pod jamkou v zónách I–III dle DeLee a Charnleye, zapadání dřívku, opakované revize s negativním výsledkem konvenční kultivace, prolongovaná kultivace tkáně a sonikátu – Cutibacterium acnes.

4.3.2. II. část

4.3.2.1. Analýza spektra patogenů chronické infekce kloubní náhrady a jejich citlivosti k antibiotikům

Ve sledovaném období 2009 – 2014 bylo izolováno bylo celkem 137 kmenů patogenních agens u 93 pacientů (každý bakteriální druh byl u 1 pacienta započítán 1x). U 48 pacientů byl přítomen 1 patogen, u 43 to byly 2 patogeny, u 1 pacienta 3 patogeny. U žádného pacienta nebyly izolovány kvasinky.

Výsledky mikrobiologického vyšetření jsou shrnuty v tabulkách Tab. 5 a Tab. 6.

Tab. 5. Spektrum patogenů chronické IKN a jejich četnost

Izolované patogeny (n=137)		Četnost
aerobní grampozitivní	koagulázanegativní stafylokoky <i>St. epidermidis</i> – 40x <i>St. hominis</i> – 8x <i>St. lugdunensis</i> – 6x <i>St. haemolyticus</i> – 4x <i>St. capitis</i> – 4x <i>St. caprae</i> – 1x <i>St. sciuri</i> – 1x <i>St. warneri</i> – 1x <i>St. saccharolyticus</i> – 1x	66 (48,2%)
	<i>St. aureus</i>	27 (19,7%)
	streptokoky	4 (2,9%)
	enterokoky	4 (2,9%)
	<i>Cor. sp.</i>	5 (3,6%)
aerobní gramnegativní	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Escherichia coli</i> – 5x <i>Klebsiella pneumoniae</i> – 2x <i>Enterobacter sp.</i> – 2x <i>Proteus mirabilis</i> – 1x <i>Salmonella Enteritidis</i> – 1x	11 (8%)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (0,7%)
Anaerobní	<i>Finegoldia sp.</i>	4 (2,9%)
	<i>Parvimonas sp.</i>	6 (4,4%)
	<i>Cutibacterium acnes</i>	7 (5,1%)
	<i>Bacteroides sp.</i>	2 (1,6%)

Tab. 6. Citlivost patogenů chronické IKN na antibiotika

Vyšetřované patogeny	Celkový počet	Antibiotika (počet citlivých kmenů)						
		VAN	GEN	CXT	CLI	CIP	CRX	CTX
Stafylokoky	93	93	74	50	61	57	50	N
Ostatní aerobní grampozitivní	13	13	5	N	4	N	N	N
Gramnegativní bakterie	12	N	9	N	N	7	5	8
Anaeroby	19	17	N	N	16	N	N	N
Součet	137	123	88	50	77	64	55	8

N - netestováno

Nejčastějšími patogeny byly koagulázanegativní stafylokoky (48,2 %), následované *St. aureus* (19,7 %), dalšími grampozitivními bakteriemi (streptokoky, enterokoky, *Cor. sp.* - 9,4 %), anaerobními bakteriemi (14 %) a nakonec až gramnegativními bakteriemi (8,7 %).

Porovnání citlivosti na vankomycin, gentamicin, klindamycin:

Vankomycin byl účinný proti 123 kmenům ze 137 (89,8 %), gentamicin byl účinný proti 88 kmenům ze 137 (64,2 %) a klindamycin proti 77 kmenům ze 137 (56,2 %) – Obr. 18.



Obr. 18

RTG snímek pravého kyčelního kloubu v AP projekci, 1,5 roku po primoimplantaci, varizace dříku, heterotopické ossifikace, projasnění kolem dříku v zónách 2 – 7 dle Gruena s jeho varizací, kolem jamky I – III dle DeLee a Charnleye, FW 116/hod, CRP 55 mg/l, punkce negativní, kultivace tkáně a sonikace ve všech vzorcích anaerobní Parvimonas micra, přirozeně rezistentní ke gentamicinu.

Nejúčinnější kombinací antibiotik byla kombinace vankomycinu a gentamicinu - účinnost na 132 kmenů ze 137 (96,4 %). Rezistence byla zaznamenána pouze na 2 kmeny *Bacteroides* sp. a 3 kmeny ze skupiny enterobakterií.

4.4. Diskuse

První část studie se týkala předoperační diagnostiky a možností rozlišení aseptického uvolnění od IKN.

Pohlaví pacientů ani typ implantátu se statisticky nelišily v obou skupinách. V tomto případě se jedná o malé skupiny pacientů. Na velké skupině – 30 491 TEP kyčelních kloubů s výskytem IKN 0,51 % (pouze 155 pacientů) deklarovali Namba a kol. jako rizikové faktory pro IKN ženské pohlaví, obezitu a ASA skóre ≥ 3 (Namba et al., 2012). Naopak Parvizi a Gehrke uvádějí jako rizikovější mužské pohlaví (Parvizi et Gehrke, 2014). U typu implantátu se ve sledovaných souborech rovněž jedná o malé počty implantátů tak, abychom byli schopni určit rizikové typy pro selhání, a navíc tyto případné endoprotézy lze odečíst z registrů kloubních náhrad (například v České republice Národní registr kloubních náhrad). V této studii byl nalezen vyšší počet TEP kolenního kloubu s IKN než s aseptickým uvolněním, což odpovídá klinickým zkušenostem. Názory na to, zda je věk rizikový faktor pro IKN, se liší (Triantafyllopoulos et al., 2015). Ve studii byl věk pacientů s IKN mírně, ale statisticky signifikantně vyšší.

Charlson comorbidity index (Charlson et al, 1987) není také vodítkem k rozlišení aseptického uvolnění a IKN, ale signifikantní rozdíl výsledků v obou skupinách dokládá vyšší rizikovost pacientů s nižším procentuálním výsledkem k IKN a pro samotnou léčbu. Tyto výsledky odpovídají i práci Onga a kol. (Ong et al., 2009) a kladou vyšší nároky na volbu terapie a peroperační péči.

K předoperačnímu rozlišení aseptického uvolnění a IKN bylo identifikováno 5 parametrů, dle pořadí významnosti pro IKN: CRP > 10 mg/l, uvolnění endoprotézy do 5 let od implantace, klidová bolest, FW > 30 mm/hod, rychlá progresse uvolnění endoprotézy na RTG.

Saleh a kol. provedli analýzu odborné literatury na téma CRP, FW a IKN se závěrem, že ačkoliv tyto markery nelze k diagnostice užít samostatně, jsou nejčastěji používanými markery v první linii vyšetření (Saleh et al., 2018). Hodnota CRP může být vyšší rovněž u systémových zánětlivých onemocnění (například revmatoidní artritida), po traumatu, operaci a poškození tkání, naopak snížena u užívání kortikoidů (Ansar et al., 2013). Na základě této studie lze doplnit příčinu vyššího CRP i infekci v jiné lokalitě u aseptického uvolnění, naopak nízké CRP u IKN po užívání antibiotik. Nízké CRP bylo i u 4 pacientů s IKN, kde bylo předoperačně diagnostikováno aseptické uvolnění endoprotézy. Mc Arthur a kol. uvádějí ze svého souboru kolem 4 % pacientů s IKN a normálními hodnotami FW a CRP (Mc Arthur et. al., 2015). Vzhledem k existenci těchto sporných případů je možné snižovat hraniční hodnotu CRP, upravit tuto hodnotu zvlášť pro TEP kyčelního a pro TEP kolenního kloubu, měřit hodnotu CRP v synoviální tekutině, pokud ji získáme, nebo použít jiný marker. Při těchto opatřeních ale také nedosáhneme 100% senzitivity a specificity, v případě infekce nezískáme patogena s jeho citlivostí na antibiotika. Z tohoto důvodu volíme pro upřesnění diagnózy kultivační metody.

Druhým významným parametrem pro předoperační zařazení pacienta do skupiny pravděpodobné IKN byla doba uvolnění endoprotézy do 5 let od implantace. Zjištění odpovídá práci Parvizi a Gehrke (Parvizi et Gehrke, 2014). Ve skupině původně aseptického uvolnění v této studii byly dle výsledků kultivací nalezeny 4 IKN a jediným vodítkem pro zvážení možnosti IKN při zpětném hodnocení byl u všech pacientů právě tento parametr.

Třetím významným parametrem byl údaj klidové bolesti v oblasti endoprotézy. Tomuto parametru není v odborné literatuře věnováno příliš prostoru na rozdíl od markerů a genetických metod vyšetření. Nicméně dle této studie údaj o bolesti od vzniku obtíží v klidu v oblasti endoprotézy až 622x zvyšuje pravděpodobnost, že se jedná o IKN. Údaj

o bolesti od implantace, jako příznaku infekce, není možno touto studií potvrdit. Pacienti nebyli schopni rozlišit bolest intra a extraartikulární, nejčastěji vertebrogenní, a dále bolest patřící ještě do pooperačního průběhu. Navíc ani intraartikulární bolest nemusí jednoznačně souviset s infektem – viz iliopsoas impingement u závitorezné jamky.

Dalším parametrem byla zvýšená FW, pro kterou platí prakticky stejná tvrzení jako u zvýšeného CRP. Rovněž tato studie potvrzuje falešně pozitivní hodnoty u revmatoidní artritidy nebo tumoru a falešně negativní hodnoty u 4 pacientů původně zařazených do skupiny nepravděpodobné infekce s následnými pozitivními kultivacemi a u 2 pacientů s jistou IKN s píštělí. Pro potvrzení nebo vyloučení infekce a její léčbu jsou tedy důležité spolehlivé kultivační techniky. Zvláštním případem, přítomným i v této studii, jsou infekce způsobené *Cutibacterium acnes*. U těchto infekcí může být vytvořena píštěl, ale jsou negativní zánětlivé markery a pro potvrzení infekce je nutná prolongovaná kultivace 10 – 14 dní (Portillo et al., 2013).

Posledním parametrem, který ale zvyšoval pravděpodobnost IKN jen 1,4x, byla rychlá progresse uvolnění endoprotézy na RTG. Nicméně obecně lze říci, že tento parametr je nespolehlivý, závisí na subjektivním hodnocení a zhotovení rtg ve stejných standardních projekcích. Navíc pro srovnání rtg snímků v čase musí být dostupná rtg dokumentace zhotovená od implantace, což může být problém u pacientů, kterým byla endoprotéza implantovaná na jiném pracovišti.

Soubor pacientů ve skupině jisté nebo pravděpodobné infekce s významným podílem píštělí zasahujících k endoprotéze, užíváním antibiotik v anamnéze a opakovanými operacemi byl dán skutečností, že tito pacienti byli překládáni z jiných pracovišť na naše klinické septické oddělení. U významné části pacientů tak nebyla hlavním problémem diagnostika infektu, jako spíše určení kauzálního patogena.

Druhá část hodnotila výsledky jednotlivých kultivačních metod a porovnávala předoperační diagnostiku s peroperační.

Z hlediska kultivačních metod byla jednoznačně nejvyšší shoda s celkovým výsledkem u obou metod hodnocení sonikátu.

Hodnocení sonikátu mělo relativně menší využití ve skupině s nepravděpodobnou IKN. Tam, kde byly předoperačně vyšší hodnoty FW a CRP (revmatoidní artritida, tumor, infikovaný bazocelulární karcinom), aseptické uvolnění endoprotézy bylo potvrzeno již prolongovanou kultivací vzorků tkáně. Nicméně význam sonikace se uplatnil při potvrzení diagnózy u kontaminace tkáně a zejména při diagnostice okultní infekce u původně nepravděpodobné IKN (v této studii 8 %). Kempthorne a kol. udávají až 15 % takovýchto okultních infektů (Kempthorne et al., 2015). Ze 4 pacientů s okultní IKN byl jeden pacient s TEP kolenního kloubu a 3 pacienti s TEP kyčelního kloubu, 2x byla diagnóza stanovena na základě vyšetření sonikátu, 1x byla pozitivita vyšetření v bujónu a sonikátu při negativní tkáni a 1x byla pozitivní tkáň i sonikát. U TEP kolenního kloubu byly přítomny synoviální výpotky, které ale byly kultivačně negativní. U 3 TEP kyčelního kloubu nebyla ani peroperačně zjištěna tekutina v oblasti kloubu, případná předoperační punkce by tak byla neúspěšná. Ačkoliv je tato punkce doporučovaná v případě bolestivé endoprotézy pro vyšetření synoviálních markerů k vyloučení infektu (Osmon et al., 2013), nemusí být získáno dostatečné množství punktátu (případně žádný) a je nutné využít pro diagnostiku kultivačních metod tkáně a sonikátu. Okultní IKN byla tak časně diagnostikována, pacienti po revizní operaci byli přeléčeni antibiotiky a v dostatečném časovém odstupu nebyla u nich prokázána IKN. Tyto neplánované „jednodobé reimplantace“ byly tedy úspěšné. Na druhé straně jsou z klinické praxe známé případy rozvoje IKN vzniklé po časně reimplantaci endoprotézy pro předpokládané aseptické uvolnění, které bylo ve skutečnosti nediodagnostikovanou infekcí, se všemi důsledky pro pacienta a ekonomické náklady léčby.

Rovněž u 46 pacientů s verifikovaným aseptickým uvolněním endoprotézy neprokázání IKN v časovém odstupu potvrdilo správnost diagnostiky. Argumenty zvýšeného rizika kontaminace a falešně pozitivních výsledků sonikace se v této studii nepotvrdily, srovnatelně v minimálním množství byly kontaminovány i vzorky tkáně. Důležité je tedy nezávislé kultivační vyšetření více vzorků a porovnání výsledků.

Diagnostika na podkladě prolongované kultivace tkání a sonikátů ve skupině s jistou nebo pravděpodobnou IKN potvrdila nejen septické uvolnění endoprotéz ve všech případech, ale zároveň byl zjištěn i kauzální patogen. V recentní studii potvrzuje význam kombinace kultivace tkáně i sonikátů Erivan a kol. (Erivan et al., 2018). Význam sonikace byl patrný zejména u pacientů s anamnézou předchozí antibiotické terapie. Stejný závěr udává i Scorzolini a kol. ve své studii (Scorzolini et al., 2014). Samotná sonikace v této studii přispěla k získání patogena ve 44 %. Kromě vlivu předchozí operační a antibiotické léčby byly nalezeny v sonikátu signifikantně i další patogeny, které nebyly detekovány ve tkáni. Dále ve 3 případech byla zaznamenána rezistence na gentamicin u izolátu vykultivovaného ze sonikátu z povrchu polyetylenu při dobré citlivosti na toto antibiotikum u izolátu stejného druhu vykultivovaného z tkáně. Význam bakteriální adherence na různé povrchy endoprotéz je v odborné literatuře diskutována zatím s nejednoznačným výsledkem. Pro TEP kolenního kloubu (Holinka et al., 2012) a TEP kyčelního kloubu (Lass et al., 2014) byla ve studiích prokázána větší bakteriální adherence k polyetylenu, menší na kov. Je tím zdůvodněna i výměna mobilních komponent při akutním infektu. Na druhé straně Gómez-Barrena a kol. uvádějí, že bakteriální adherence závisí na typu patogena a imunitní odpovědi konkrétního pacienta, než na druhu materiálu nebo typu komponenty (Gómez-Barrena et al., 2012).

Podle vyhodnocení procenta shody jednotlivých kultivačních metod, lze konstatovat, že má význam vyšetřovat sonikační tekutinu v hemokultivační lahvičce. Podobné výsledky

uvádí ve své studii i Portillo a kol., kdy vyšetřování sonikační tekutiny v hemokultivační lahvičce přineslo zlepšení diagnostiky a zrychlení získání výsledků (Portillo et al., 2015). Naopak kultivace v tekutém bujónu neměla lepší výsledky než kultivace na pevných půdách.

Z hlediska doby prolongované kultivace se jistě prodloužená doba vyšetření uplatnila pro identifikaci anaerobních bakterií (např. *Cutibacterium acnes*), koagulázanegativních stafylokoků a koryneformních aerobních tyčinek (*Cor. sp.*) a v případech již antibiotiky a operačně léčených pacientů. Nicméně podle recentních studií je pro TEP kyčelního a kolenního kloubu dostatečná doba kultivace 7 dní, delší doba by byla s výhodou u TEP ramenního a loketního kloubu, kde lze předpokládat větší výskyt *Cutibacterium acnes*. Jako riziko dlouhodobější kultivace je uváděna možnost kontaminace vzorků (Esteban et al., 2013). Dřívější studie, jak bylo prezentováno v úvodu, preferovaly dobu 14 dní rovněž u TEP kyčelního a kolenního kloubu (Schäfer et al., 2008), tato strategie se osvědčila i v naší praxi.

Znalost spektra patogenů chronické IKN a citlivosti k antibiotikům je nutná pro nastavení cílené terapie, zejména v době narůstající antimikrobiální rezistence. Koagulázanegativní stafylokoky tvořily 48,2 % patogenů, což odpovídá údajům v odborné literatuře (Tande et Patel, 2014). Z hlediska strategie léčby je důležité, že většina těchto stafylokoků je schopna tvořit biofilm. V době provádění studie byly k dispozici lokální nosiče s gentamicinem, méně s klindamycinem a vankomycinem. Z výsledků je zřejmé, že gentamicin v monoterapii by byl nedostatečný (citlivost u 64,2 % patogenů). Nejvíce patogenů bylo citlivých ke kombinaci vankomycinu a gentamicinu (96,4 %). Kombinaci glykopeptidů a aminoglykosidů ve své práci doporučuje rovněž Winkler (Winkler, 2000) a její použití je i předmětem navazující experimentální studie v této habilitační práci.

4.5. Závěr

V klinické studii byli pacienti s IKN ve srovnání s pacienty s aseptickým uvolněním starší a s více komorbiditami.

Podle původních kritérií jisté (píštěl k endoprotéze) a pravděpodobné (klidová bolest, elevace CRP, FW a rychlá progresse uvolnění TEP na RTG) IKN byli pacienti rozděleni na dvě skupiny – s nepravděpodobnou IKN (potvrzeno u 46 z 50 kultivačními metodami, u 4 pacientů byla diagnostikována okultní infekce) a s jistou nebo pravděpodobnou IKN (potvrzeno kultivačními metodami u 50 z 50 pacientů).

Pacienti byli tak nově rozděleni do skupiny 46 pacientů s aseptickým uvolněním a do skupiny 54 pacientů s chronickou IKN.

Z hlediska předoperační diagnostiky do skupin aseptického uvolnění nebo do chronické IKN pak byly seřazeny podle 95% limitu intervalu spolehlivosti tyto diagnostické faktory:

- 1. CRP** (hranice 10 mg/l pro aseptické/septické uvolnění), 95% limit intervalu spolehlivosti 6470.
- 2. Doba od implantace** (hranice 5 let pro septické/aseptické uvolnění), 95% limit intervalu spolehlivosti 3063.
- 3. Počáteční bolest klidová** (septické uvolnění) **vs vázaná na zátěž** (aseptické uvolnění), 95% limit intervalu spolehlivosti 622.
- 4. FW** (hranice 30 mm/hod pro aseptické/septické uvolnění), 95% limit intervalu spolehlivosti 305.

Kritérium **RTG progresse uvolnění** (během 1 roku), 95% limit intervalu spolehlivosti 1,4 byl pro předoperační diagnostiku IKN vyloučen pro zatížení subjektivním hodnocením

lékaře. Dále nebyla hodnocena jako diagnosticky přínosná **bolest v oblasti endoprotézy od implantace**, opět pro zatížení subjektivním hodnocením pacientů.

Z hlediska kultivačních metod byla jejich přínosnost pro diagnostiku hodnocena takto:

1. sonikát v hemokultivační lahvičce	procento shody	0,94197
2. primokultivace sonikátu	procento shody	0,92296
3. primokultivace tkáně	procento shody	0,66680
4. kultivace tkáně v bujónu	procento shody	0,65279

Procento shody je tak významně vyšší u obou metod vyšetření sonikátu než u kultivace tkání, ať už na pevných nebo tekutých půdách.

Na základě této klinické studie lze metodu kultivace sonikátu doporučit v případě předpokládaného aseptického uvolnění endoprotézy u vyšších hodnot CRP a FW (elevace markerů zdůvodnitelné jinou příčinou – tumor, revmatické onemocnění) a u klinických a rentgenových známek uvolnění endoprotézy do 5 let od primoimplantace, kdy je nutné vyloučit okultní infekci.

V případě předpokládané IKN je sonikace vhodná pro určení kauzálního patogena, zejména při předchozí antibiotické léčbě, v této studii postačila k diagnostice kultivace vzorků tkáně pouze v 54 %, v 46 % byla diagnostika založena pouze na výsledku sonikace.

Prolongovaná kultivace je pro diagnostiku infekce zcela nezbytná, v této studii se osvědčila v době trvání 14 dní, kdy byl patrný její význam pro detekci anaerobních patogenů (*Cutibacterium acnes*), *Cor.* sp. a některé kmeny koagulázanegativních stafylokoků. Vliv na tuto skutečnost měl jistě značný podíl pacientů s anamnézou předchozí antibiotické léčby, případně operačních výkonů. V klinické studii byla zaznamenána doba do ukončení kultivačního nálezu mikrobiologem. Nespornou výhodou našeho pracoviště je přítomnost Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice a

Lékařské fakulty v Hradci Králové, a tedy možnost každý den konzultovat s mikrobiologem vývoj kultivačních nálezů.

Za období 2009 – 2014 bylo izolováno 137 bakteriálních kmenů u 93 pacientů s chronickou IKN. Největší podíl tvořily grampozitivní aerobní bakterie (maximum koagulázanegativní stafylokoky 48,2 %), dále anaerobní a nejméně gramnegativní aerobní bakterie.

96,4 % kmenů bylo citlivých na kombinaci vankomycinu a gentamicinu.

5. Experimentální studie

5.1. Cíle experimentální studie

V klinické studii bylo zjištěno, že 96,4 % kmenů zodpovědných za chronické IKN léčené na našem pracovišti je citlivých na kombinaci antibiotik vankomycinu a gentamicinu. Celkové podávání glykopeptidů a aminoglykosidů je v klinické praxi velmi nebezpečné kvůli vysokému riziku nefrotoxicity a ototoxicity i přes pečlivý monitoring hladin antibiotik v séru. Nabízí se tak možnost jejich použití lokálně s vazbou na nosič, kdy jsou celkové nežádoucí účinky eliminovány a vysoká koncentrace uvolněných antibiotik působí přímo v místě infekce. Pro volbu glykopeptidů a aminoglykosidů v lokálních nosičích svědčí jejich dobré farmakokinetické vlastnosti založené na pomalém uvolňování z kosti a vstřebávání do cévního systému a citlivost k patogenům (Anagnostakos et Kelm, 2009, Winkler, 2000). Přestože řada studií zkoumala uvolňování jen jednoho antibiotika z nosiče, byl rovněž popsán synergický účinek glykopeptidů a aminoglykosidů uvolněných z kostního cementu, tedy použití obou antibiotik zároveň tak, jak by to bylo výhodné pro naši klinickou praxi (Anagnostakos et Schröder, 2012).

Zatímco pravidla pro celkové podání antibiotik jsou zpracovaná v doporučeních pro antibiotickou terapii a profylaxi ortopedických pracovišť, tak ohledně použití lokálních nosičů antibiotik nejsou stanoveny jednotné postupy, zejména v impregnaci kostních štěpů a očekává se určitý konsensus odborníků v této oblasti (Frommelt, 2018).

Také hodnoty uvolněných koncentrací antibiotik z nosičů v čase jsou velmi významné. Tyto hodnoty musí dosahovat nad úroveň minimální baktericidní koncentrace k účinné léčbě a zabránění indukce bakteriální rezistence, zároveň maxima těchto koncentrací nesmí negativně ovlivnit kostní hojení. Pokud by nedošlo k negativnímu ovlivnění kostního

hojení, byla by výhodná i koncentrace antibiotik dosahující minimální eradikační koncentrace pro biofilm (MBEC).

V experimentální studii byla zohledněna obě hlediska, jak uvolňování dostatečných koncentrací antibiotik, tak vliv na mezenchymální kmenové buňky zodpovědné za tkáňovou reparaci.

Shrnutí cílů experimentální studie:

1. Porovnání eluční kinetiky vankomycinu a gentamicinu z vybraných nosičů (impregnovaných peroperačně ortopedem nebo komerčně dostupných).

2. Zjištění vlivu těchto nosičů a uvolňovaných antibiotik na proliferaci mezenchymálních kmenových buněk.

3. Zjištění vlivu iniciační vyšší koncentrace uvolněných antibiotik z nosičů na proliferaci mezenchymálních kmenových buněk.

4. Zjištění citlivosti různých koncentrací vankomycinu a gentamicinu u planktonických bakterií a bakterií ve formě biofilmu u vybraných patogenů chronické IKN.

5.2. Metodika

5.2.1. Porovnání eluční kinetiky vankomycinu a gentamicinu z vybraných nosičů

Výběr nosičů

Pro impregnaci antibiotiky byly vybrány čtyři nosiče, které mohou podporovat kostní regeneraci a dále byly vybrány tři komerčně dostupné nosiče, které již obsahují antibiotika jako kontrolní skupina.

Kontrolní skupina:

1/ VancogenX (Tecres S.p.a., Itálie)

– polymethylmethakrylátový neresorbovatelný kostní cement, který obsahuje gentamicin sulfát a vankomycin hydrochlorid (40 g cementu obsahuje 1g gentamicinu a 1g vankomycinu). Pro experiment byl smíchán prášek a tekutina ze 40g balení a vytvořena krychle o objemu 1 ml (1 x 1 x 1 cm).

2/ Septocoll® E (Biomet, Německo)

- resorbovatelný polštářek z koňského kolagenu 5 x 4 x 0,3 cm, který obsahuje 80 mg kolagenu, 29 mg gentamicin sulfátu (ekvivalentní 17,5 mg gentamicinu) a 87 mg gentamicin krobefátu (ekvivalentní 17,5 mg gentamicinu). Celý tento nosič byl morselizován na malé kousky.

3/ Herafill® beads G (Heraeus, Německo)

- resorbovatelné korálky (4 korálky mají objem 1 ml), které obsahují kalcium sulfát dihydrát, kalcium karbonát, hydratované triglyceridy a gentamicin sulfát (2,5 mg gentamicinu v jednom korálku).

Skupina nosičů pro impregnaci:

1/ Alogenní spongiózní kost z proximální tibie

- získaná z Tkáňové ústředny FN Hradec Králové. Před impregnací byla morselizována na malé kousky. Kostní tkáň byla zvolena jako nejčastější a nejdostupnější nosič.

2/ Alogenní spongiózní kost z proximální tibie smíchaná s fibrinovým lepidlem

- 10 ml morselizovaného předchozího nosiče bylo smícháno se 4 ml fibrinového lepidla (Tissucol, Baxter, Nizozemí). Účelem vybrání fibrinového lepidla byla snaha zvýšit kapacitu nosiče pro antibiotika, případně prodloužit dobu eluce.

3/ Lyofilizovaná alogenní kost v prášku

- získaná z Národního centra tkání, Brno. Lyofilizovaná kostní tkáň byla zvolena z důvodu deklarovaných dobrých výsledků při impregnaci antibiotiky Winklerem (Winkler, 2000).

4/ Trikalcium fosfát s 90% porozitou

- (Vitoss, Orthovita, USA). Před impregnací byl morselizován na malé kousky. Nosič byl vybrán jako nejčastěji používaná náhrada kostních štěpů v naší klinické praxi, navíc s vysokou porozitou, kdy se očekává impregnace antibiotiky prakticky v celém objemu materiálu. Tedy obdobně jako je uváděno u OSTEOMycinuTM V/T®.

Impregnace

Za sterilních podmínek bylo manuálně smícháno 10 ml nosiče s roztokem s antibiotiky. Roztok obsahoval 500 mg vankomycinu – vankomycin hydrochlorid (Edicin 0,5 g/10ml sol., Lek Pharmaceuticals d.d., Slovinsko) a 80 mg gentamicinu – gentamicin sulfát (Gentamicin 80 mg/2 mL sol., Lek Pharmaceuticals d.d., Slovinsko). Doba impregnace

byla 30 min. Tato doba byla zvolena jako akceptabilní čas impregnace během operačního výkonu.

Po impregnaci byly z každého nosiče odebrány 3 vzorky o objemu 1 ml (celkem tedy ze 7 nosičů 21 vzorků po 1 ml). Každý vzorek o 1 ml byl doplněn do 10 ml fosfátovým pufrem (Gibco, Velká Británie), umístěn do termostatu a inkubován při 37 °C v atmosféře s 5% CO₂.

Původní dávka antibiotik pro impregnaci byla zvolena tak, aby výsledná koncentrace v naimpregnovaném 1 ml byla srovnatelná s koncentrací antibiotik v kontrolní skupině. Při předpokladu rovnoměrné koncentrace 1 ml impregnovaného nosiče obsahoval 8 mg gentamicinu a 50 mg vankomycinu, 1 ml Septocoll® E – 5.8 mg gentamicinu, 1 ml Herafill® beads G – 10 mg gentamicinu a 1 ml VancogenX – 41 mg vankomycinu a 41 mg gentamicinu.

Měření koncentrací antibiotik

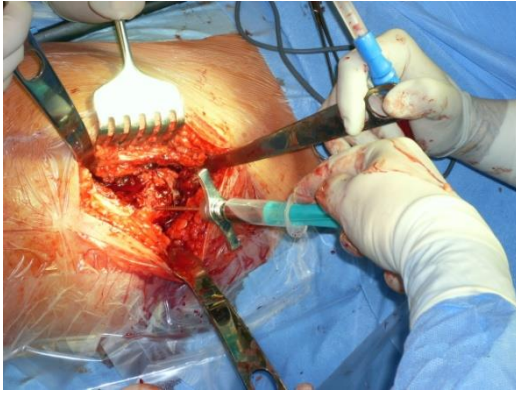
Každý den bylo měněno celé množství fosfátového pufru. Měření koncentrací antibiotik probíhalo bezprostředně po odběru pufru 1., 2., 3., 4., 7., 10., 14., 17., 21. a 25. den po impregnaci. Kvantitativní analýza antibiotik ve vzorcích z experimentů byla provedena na analyzátoru Integra 400 Plus (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo) metodou fluorescenční polarizační analýzy. Měření se uskutečnila dle pokynů výrobce reagensů. Vnitřní kontrola kvality byla zajištěna analýzou kontrolních vzorků, jejichž koncentrační hodnoty dosahovaly požadované rozmezí. Preciznost mezi sériemi u metody vyjádřená variačním koeficientem při analýze gentamicinu byla v rozmezí 4,84% až 7,18% a při analýze vankomycinu v rozmezí od 3,53% do 5,98%. Preciznost metody v sérii byla změřena u gentamicinu v rozmezí od 1,17% do 2,13% a u vankomycinu od 1,11% do 1,16%.

5.2.2. Vliv nosičů s antibiotiky na proliferaci mezenchymálních kmenových buněk

Získání mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřevě (BM MSC) a ze zubní pulpy (DPSC)

Kostní dřevě byla získaná od 2 dárců bez jakýchkoliv komorbidit podstupujících totální náhradu kyčelního kloubu z trochanterického masívu femuru.

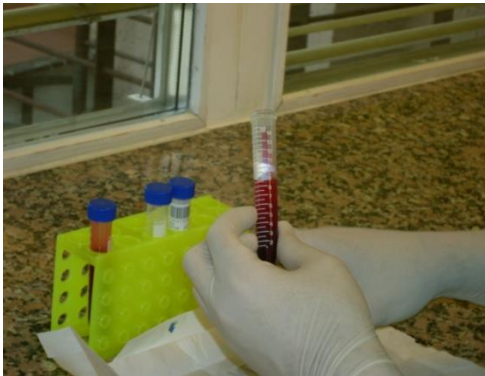
Implantace totální endoprotézy kyčelního kloubu probíhala standardním postupem. Všechny pacientky byly operovány ve spinální anestézii. Zvolen byl anterolaterální přístup. Po incizi kůže, podkoží a fascia lata byl částečně uvolněn úpon gluteálního svalstva z velkého trochanteru a založena Hohmannova elevatoria – za horní a dolní okraj krčku femuru a za přední okraj acetabula. Dále následovala excize kloubního pouzdra a ozřejnění trochanterické oblasti. Před provedením osteotomie krčku stehenní kosti byla standardním způsobem pomocí Jamshidiho jehly (Jamshidi Monoject, 13G x 3 ½, Kendall, USA) aspirována z trochanterické oblasti femuru kostní dřevě v množství 2 x 10 ml do předem heparinizovaných stříkaček (10 ml). Roztok heparinu (Heparin Forte, Léčiva, Česká republika) byl po protažení stříkačkou ponechán v jejím kónusu (Obr. 19).



Obr. 19

Odběr kostní dřeně pomocí Jamshidiho jehly z trochanterické oblasti femuru během implantace totální endoprotézy kyčelního kloubu. Odběr před provedením osteotomie krčku femuru.

Buněčná suspenze byla přidána k vychlazenému (4°C) PBS pufru (Invitrogen, USA) ředěného s aqua pro inj. v poměru 1:10. Poměr kostní dřeně a PBS pufru byl 1:1 (Obr. 20).



Obr. 20

Smíchaná kostní dřeň s PBS pufrem připravená k transportu

Takto připravená kostní dřeň byla transportována do laboratoře tkáňových kultur Ústavu histologie a embryologie. Zde byla část dřeně oddělena, z části byl získán

mononukleární koncentrát a izolovány mezenchymální kmenové buňky. Mononukleární buňky byly separovány centrifugací 30 minut při 2800 ot/min. na základě Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Švédsko) vztlakového gradientu a byla využita jejich adherence k plastům v případě nasazení plné kostní dřeně a k hodnocení schopnosti tvořit kolonie (CFU).

DPSC byly izolovány z třetích molárů získaných od zdravých dárců podstupujících zubní extrakci z ortodontické indikace.

Izolaci zubní pulpy předcházela odběr intaktního vitálního zubu a jeho transport do laboratoře. Odběrem byla rozuměna extrakce zubu prováděná v lokální anestezii v aseptických podmínkách (Obr. 21).



Obr. 21

Extrahovaný zub.

Poté následovalo ošetření extrahovaného zubu sterilní gázou napuštěnou dezinfekčním roztokem (Gutar) pro odstranění zubního mikrobiálního povlaku. Při transportu byl zub uložen v uzavřené nádobě, zcela ponořen do transportního média HBSS (pufr – Hankův balancovaný solný roztok) s antibiotiky při teplotě 4 °C. Izolace zubní pulpy byla prováděna za přísně sterilních podmínek v laminárním boxu. U zubů s nedokončeným

vývojem kořene bylo proniknuto do dřevné dutiny pomocí pinzety přes široce otevřené *foramen apicale*.

Pro izolaci DPSC ze zubní pulpy byla použita směs enzymů kolagenázy (Sevapharma, ČR) a dispázy (Invitrogen, USA) s fosfátovým pufrčním roztokem (Invitrogen, USA) a Hankovým balancovaným solným roztokem (Invitrogen, USA). K enzymatické izolaci byl použit tento postup – rozstříhání zubní pulpy na části o objemu cca 1 mm³, enzymatické štěpení zubní pulpy působením roztoku enzymů po dobu 50 minut při teplotě 37,0 °C.

Pacienti nebo jejich zákonní zástupci podepsali informovaný souhlas s dárcovstvím dle schválení Etické komise Fakultní nemocnice. Oba typy izolovaných plně charakterizovaných mezenchymálních kmenových buněk byly ošetřovány dle standardního protokolu používaného na Lékařské fakultě v Hradci Králové (Kleplová et al., 2007, Procházka et al., 2009, Suchánek et al., 2009).

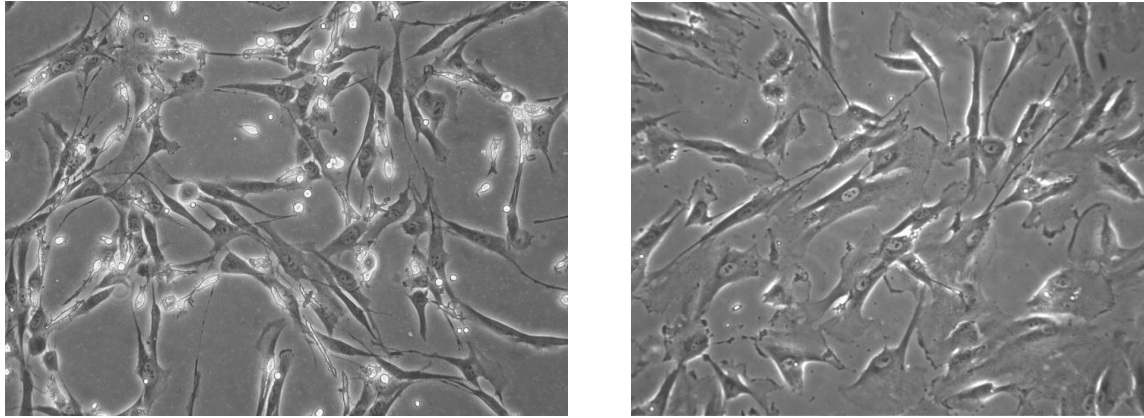
Způsob kultivace buněk

Buňky byly kultivovány na neupraveném plastu (TPP Petriho misky a TPP Multi-Well Plates) při 37 °C za aerobních podmínek (5% CO₂) s 2% fetálním telecím sérem obsahujícím α -MEM expanzní medium. Optimalizované expanzní medium s mezenchymálními kmenovými buňkami (Reyes et al., 2001) se skládalo ze standardního kultivačního media obsahujícího α -MEM, 2% fetální telecí serum, 10 ng/ml endoteliálního růstového faktoru (PeproTech, London, Velká Británie), 10 ng/ml destičkového růstového faktoru (PeproTech, London, Velká Británie), 1% L-askorbová kyselina (Sigma), 2% glutamin (Invitrogen), 0,5% penicilin/streptomycin (Invitrogen, USA), 0,5% gentamicin (Invitrogen, USA), 8% dexamethason (Sigma, USA) a bylo doplněno inzulin-transferrin-natrium-selenovým suplementem (Sigma, USA) o koncentraci 10 μ l/ml. V okamžiku, kdy adhezující buňky dosáhly více jak 70% splývavosti, byly uvolněny 0,25% trypsinem-EDTA (Invitrogen, USA), počítány (Z2 counter, Beckman Coulter, USA) a znovu

kultivovány v ředění 1 : 3 za stejných podmínek. Pro experiment byly použity buňky z třetí pasáže a umístěny do 12 kultivačních destiček (Corning, USA), každá destička obsahovala 50 000 buněk. Následovala 24-hodinová kultivace. Do každé destičky byl vložen speciální inzert (Corning, USA) – 24 mm v průměru, s velikostí pórů 0,4 μm a polyesterovou membránou. Systém byl doplněn 2 ml čerstvého kultivačního media na celkový objem 4 ml. Následně byly do systému přidány nosiče bez přímého kontaktu s mezenchymálními kmenovými buňkami (1. Alogenní spongiózní kost bez antibiotik, 2. Alogenní spongiózní kost s antibiotiky, 3. Alogenní spongiózní kost smíchaná s fibrinovým lepidlem bez antibiotik, 4. Alogenní spongiózní kost smíchaná s fibrinovým lepidlem s antibiotiky, 5. Trikalciium fosfát bez antibiotik, 6. Trikalciium fosfát s antibiotiky, 7. Lyofilizovaná alogenní kost bez antibiotik, 8. Lyofilizovaná alogenní kost s antibiotiky, 9. Herafill® beads G (Heraeus, Německo), 10. Septocoll® E (Biomet, Německo, 11. kostní cement VancogenX (Tecres S.p.a., Itálie), 12. Kontrolní skupina – mezenchymální kmenové buňky bez nosiče).

Buňky byly kultivovány 14 dní. Kultivační medium bylo měněno denně a dvakrát denně mícháno v kultivačním systému. Analýza proliferace buněk byla provedena Z2 counterem (Beckman Coulter, USA).

Obrázek 22 dokumentuje získané BM-MSC a DPSC. Morfologie obou typů buněk je obdobná, u DPSC je zvýrazněný cytoskelet.



a

b

Obr. 22

Typický vřetenovitý tvar kultivovaných BM-MSC (a) a DPSC (b), mikroskopie s fázovým kontrastem

5.2.3. Vliv iniciální vyšší koncentrace antibiotik na proliferaci mezenchymálních kmenových buněk

Do 7 destiček bylo nasazeno 80 000 mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřene. První destička byla ponechána bez přidání antibiotik jako kontrola, do dalších destiček byl druhý den po nasazení buněk přidán roztok antibiotik v různých koncentracích: 1. vankomycin 40 mg/l, 2. vankomycin 2000 mg/l, 3. gentamicin 60 mg/l, 4. gentamicin 400 mg/l, 5. vankomycin 40 mg/l + gentamicin 60 mg/l, 6. vankomycin 2000 mg/l + gentamicin 400 mg/l. Buňky byly počítány pomocí přístroje Z2 Counter (Beckman Coulter, USA). Viabilita byla analyzována přístrojem Vi-Cell XR (Beckman Coulter, USA), který ji stanovuje pomocí barvení trypanovou modří, která barví cytoplazmu, ale neprochází přes intaktní buněčnou membránu - barví se tedy pouze mrtvé buňky. Analýza byla prováděna 2., 6., 10. a 15. den po nasazení.

5.2.4. Citlivosti různých koncentrací vankomycinu a gentamicinu k planktonickým formám a na biofilm u vybraných patogenů chronické infekce kloubních náhrad

Hodnocení antibakteriálního efektu vankomycinu a gentamicinu na planktonické formy vybraných bakteriálních agens

Testované kmeny bakterií:

St. aureus, MRSA (*St. aureus* - methicilin rezistentní), *St. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*

Testované koncentrace antibiotik:

Vankomycin: 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 128 mg/l

Gentamicin: 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 128 mg/l

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla stanovena bujónovou diluční metodou v mikrotitrační destičce. Minimální baktericidní koncentrace (MBC) byla zjištěna vyočkováním suspenze z jamek s inhibicí testovaného kmene.

Hodnocení antibakteriálního efektu vankomycinu a gentamicinu na bakteriální kultury ve formě biofilmu

Testované kmeny bakterií ve formě biofilmu pro zjištění efektu vankomycinu:

St. aureus, MRSA, *St. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*

Testované kmeny bakterií ve formě biofilmu pro zjištění efektu gentamicinu:

St. aureus, MRSA, *St. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Enteritidis, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*

Metodika byla použita z prací Christensena et al. a Stepanovice et al. (Christensen et al., 1985, Stepanovic et al., 2000). Biofilm byl připravován v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Jamky byly inokulovány suspenzí 200 μ l tryptózosojového bujónu a 20 μ l 24-hodinové kultury testovaných kmenů. Destičky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C. Za 24 hodin po promytí destičky fosfátovým pufrem byl k testovaným kulturám přidán vankomycin ve třech koncentracích (30 mg/l, 500 mg/l, 1500 mg/l) nebo gentamicin ve dvou koncentracích (1000 mg/l, 10 000 mg/l). Antibiotika působila 24 hodin. Poté byly jamky promyty fosfátovým pufrem, vysušeny, obarveny krystalovou violetí a opět promyty fosfátovým pufrem. Následně bylo navázané barvivo uvolněno do 90% alkoholu a změřena jeho optická denzita při vlnové délce 595 nm (čím větší optická denzita, tím větší vrstva biofilmu).

Negativní kontrola znamenala přítomnost pouze tryptózosojového bujónu, pozitivní kontrola znamenala jamky s bujónem a testovanými kmeny bez antibiotik.

5.2.5. Statistická analýza

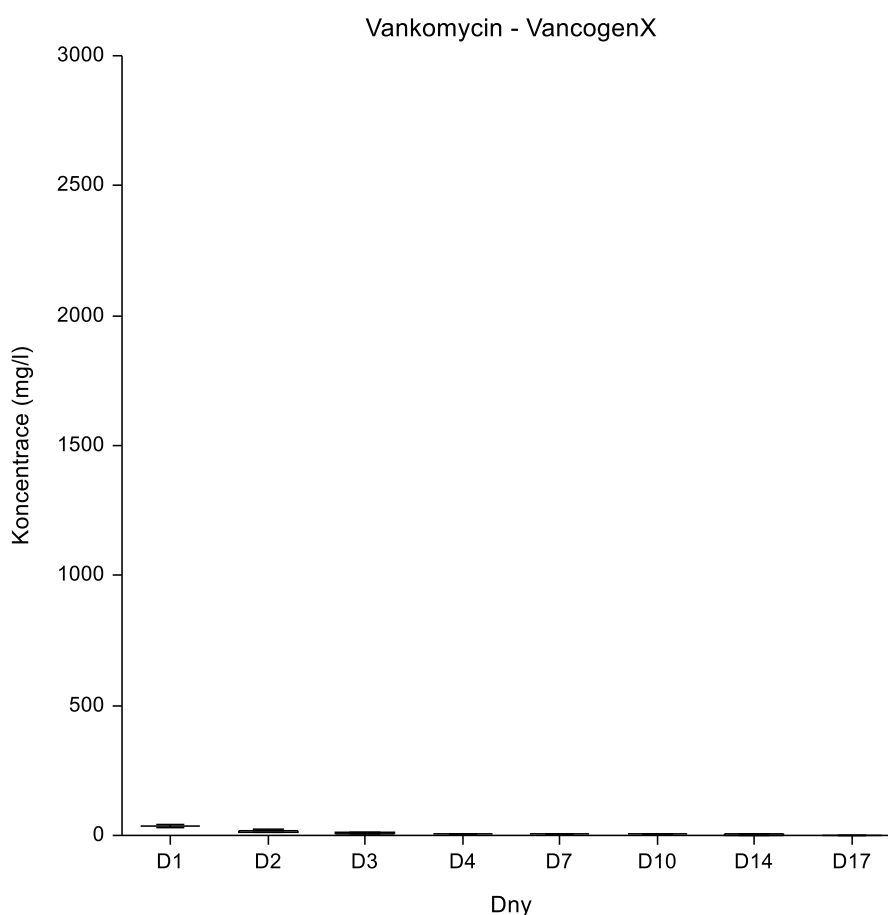
Všechny experimenty byly provedeny dvakrát. Pro statistickou analýzu byl použit program NCSS 9, Statistica 12. Byla využita deskriptivní statistika (průměr, standardní odchylka, standardní chyba, minimum, maximum, rozsah, kvartily), dále krabičkové grafy (box plots), dvoufaktorová analýza rozptylu s opakováním s následným mnohonásobným porovnáním Fisherovým LSD testem a Kruskal – Wallisova neparametrická analýza rozptylu s mnohonásobným porovnáním Dunnovým testem. Hladina významnosti byla $\alpha = 0,05$.

5.3. Výsledky

5.3.1. Porovnání eluční kinetiky vankomycinu a gentamicinu z vybraných nosičů

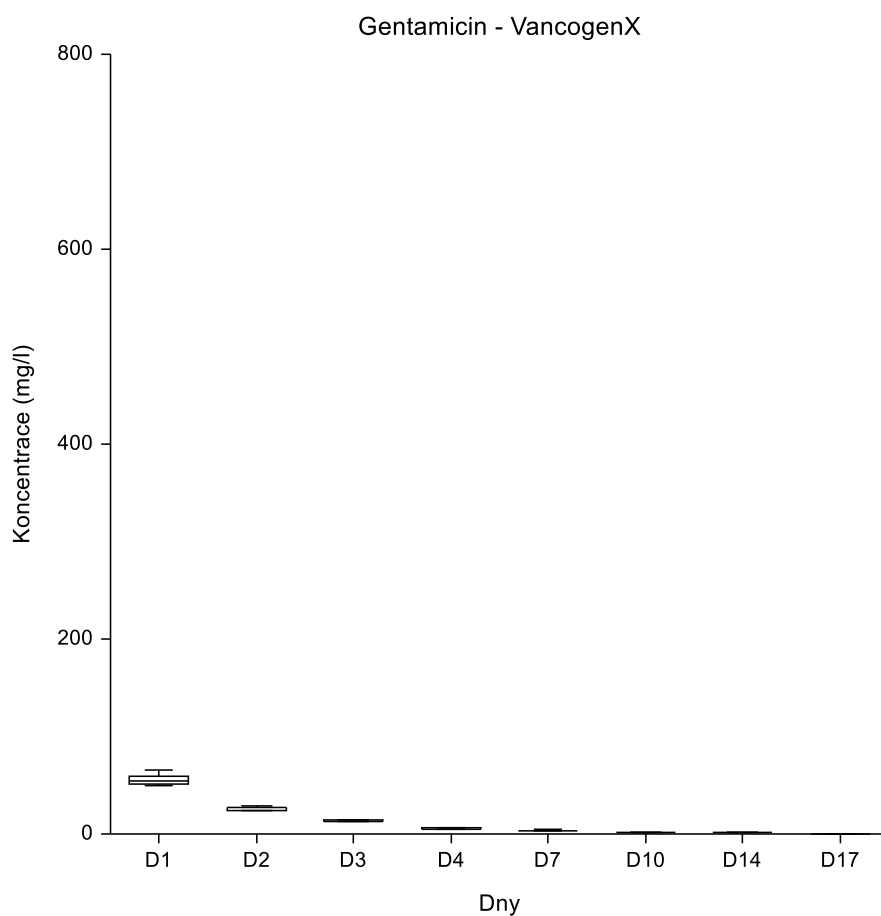
1/ Kostní cement s vankomycinem a gentamicinem (VancogenX)

Kostní cement uvolnil nejnižší koncentrace obou antibiotik. Poslední koncentrace antibiotik byla měřitelná 17. den po impregnaci. Experiment nepotvrdil dlouhodobé vylučování antibiotik (Graf 1, 2).



Graf 1

Uvolňované koncentrace vankomycinu z VancogenuX v měřené dny.

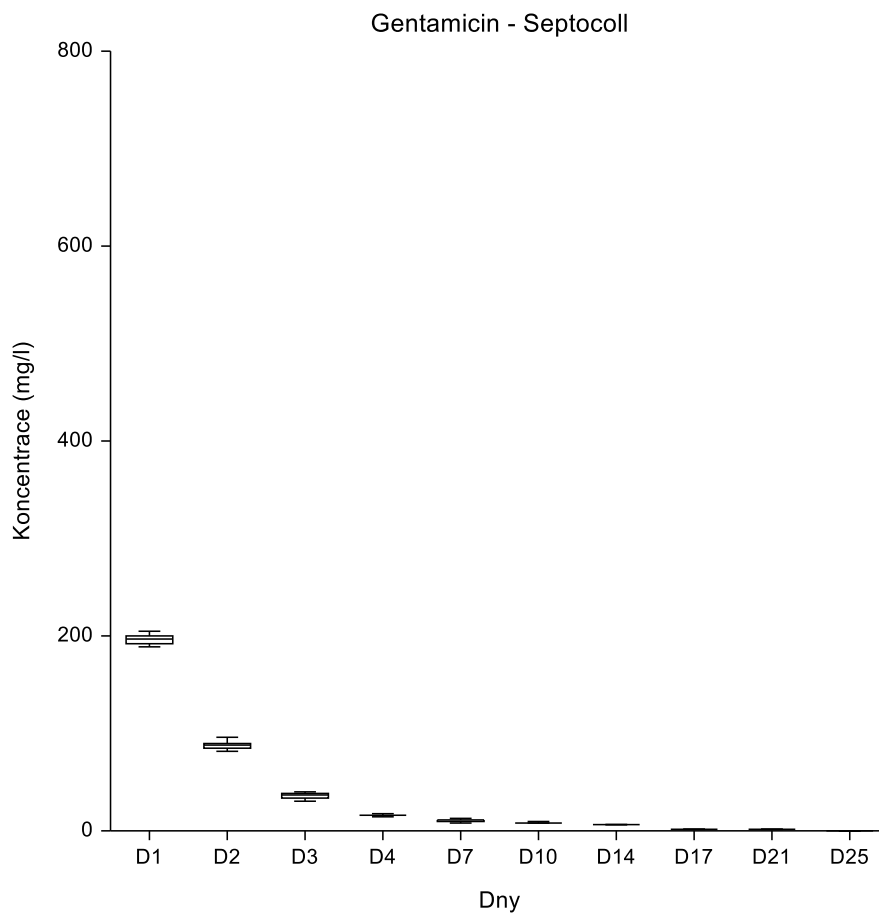


Graf 2

Uvolňované koncentrace gentamicinu z VancogenuX v měřené dny.

2/ Kolagenní nosič s gentamicinem (Septocoll® E)

Ve srovnání s kostním cementem byly naměřeny vyšší koncentrace gentamicinu a byly detekovatelné delší dobu - až 25. den (Graf 3).

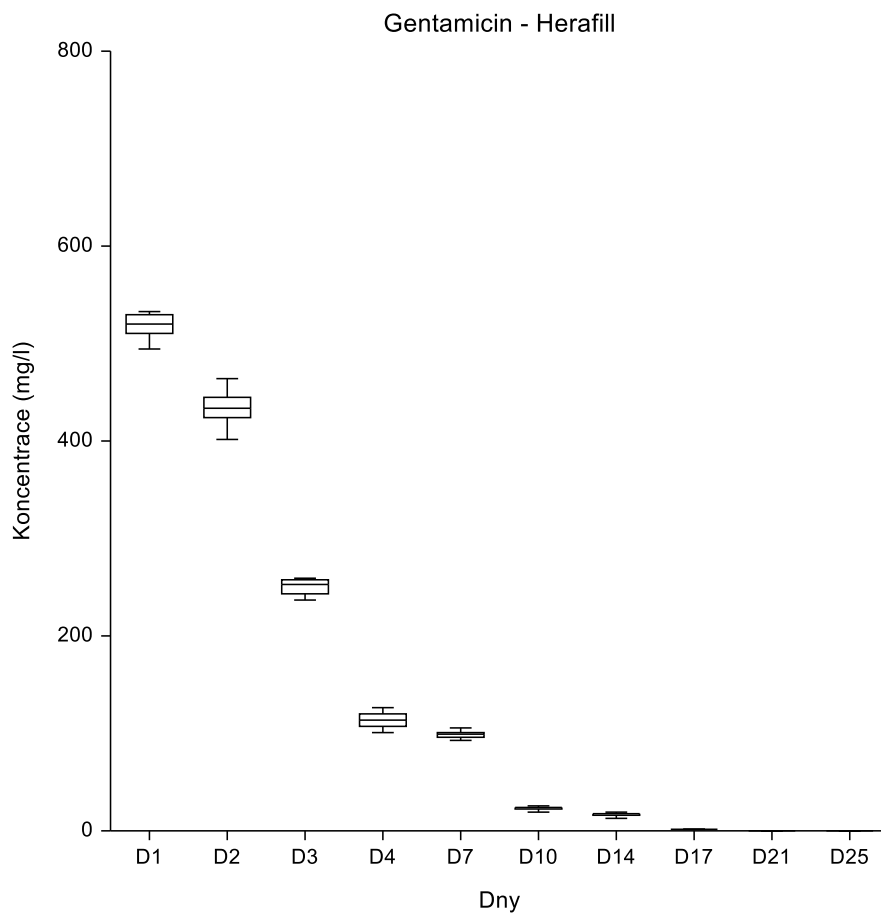


Graf 3

Uvolňované koncentrace gentamicinu ze Septocollu® E v měřené dny.

3/ Herafill® beads G

Tento resorbovatelný gentamicinový nosič vykazoval do 7. dne signifikantně jinou kinetiku než kostní cement ($\alpha < 0.05$). Eluční kinetika se spíše blížila impregnovaným nosičům (Graf 4).

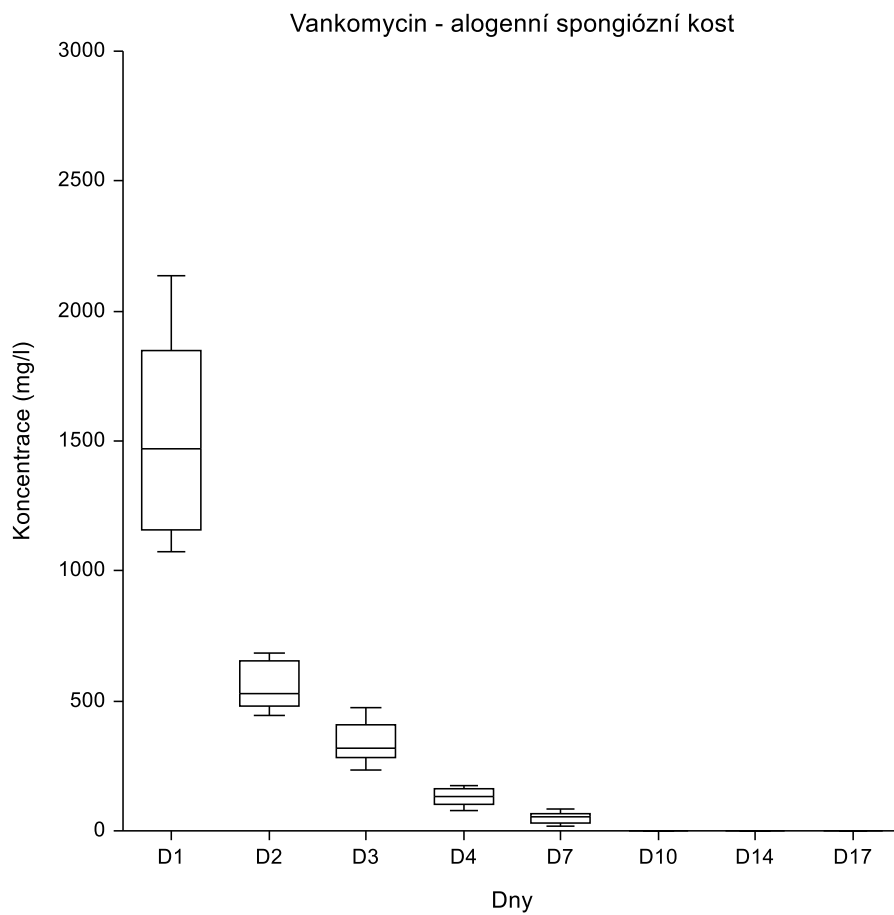


Graf 4

Uvolňované koncentrace gentamicinu z Herafillu® beads G v měřené dny.

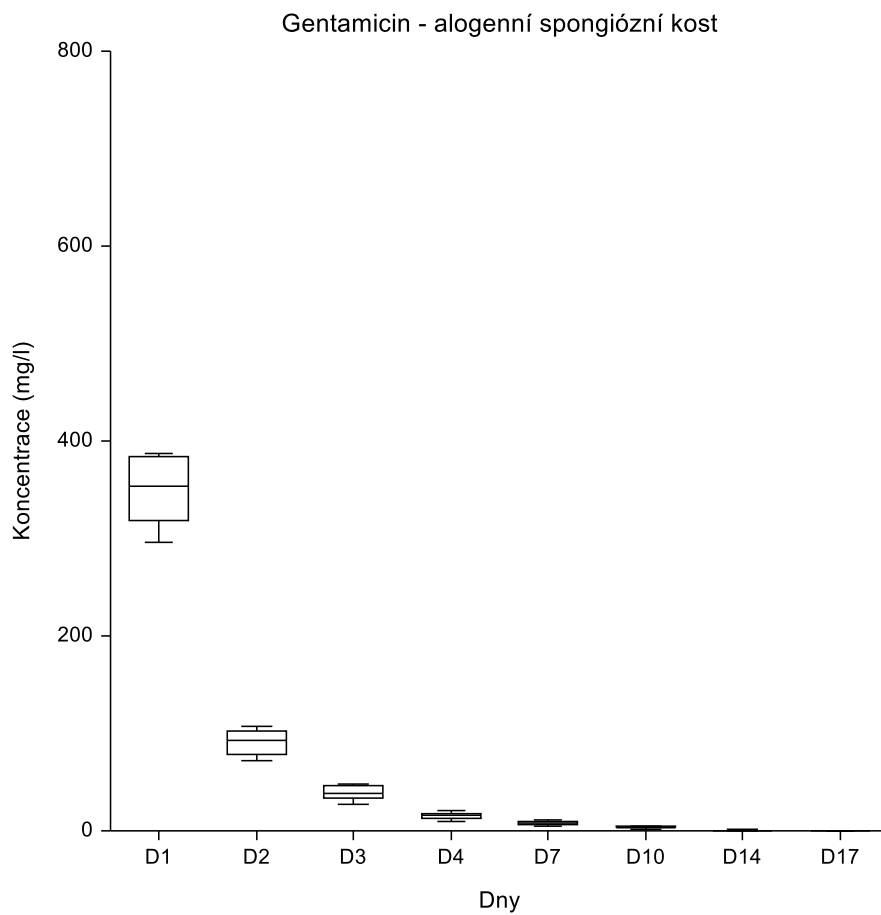
4/ Alogenní spongiózní kost impregnovaná současně vankomycinem a gentamicinem

Impregnovaný nosič vykazoval podstatně vyšší koncentrace antibiotik se signifikantními rozdíly v eluční kinetice ve srovnání s kostním cementem jen první 3 dny ($\alpha < 0.05$). Vankomycin se vylučoval kratší dobu, zatímco gentamicin stejnou dobu jako z cementu (Graf 5,6).



Graf 5

Uvolňované koncentrace vankomycinu z alogenní spongiózní kosti v měřené dny.

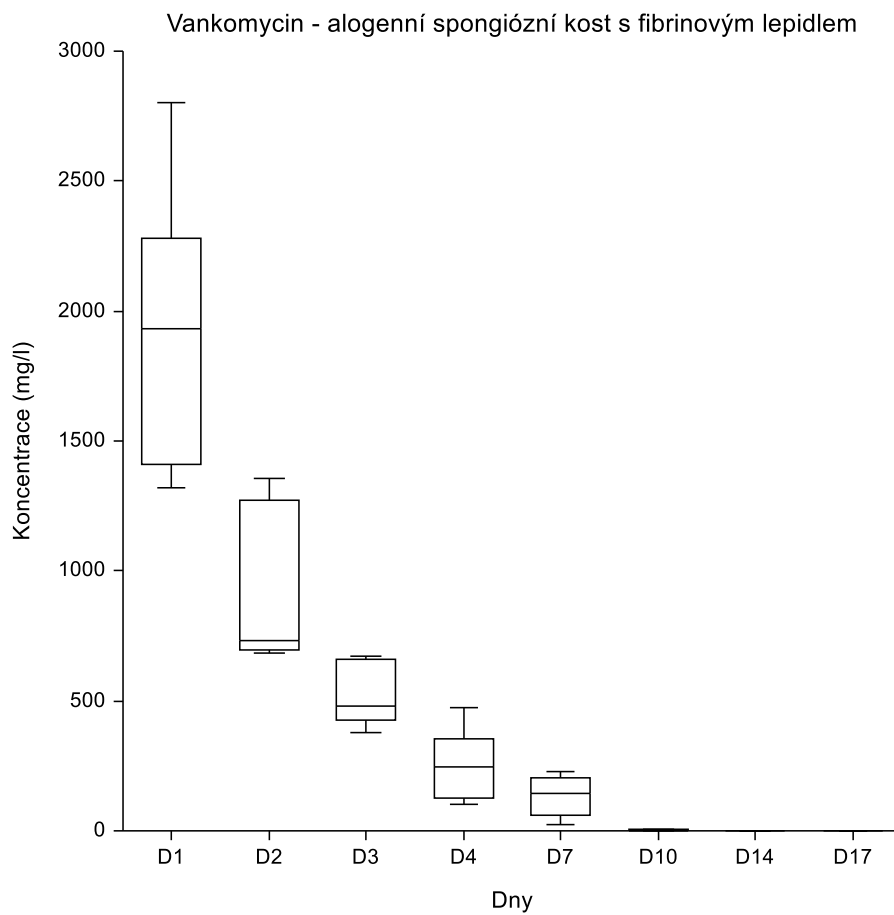


Graf 6

Uvolňované koncentrace gentamicinu z alogenní spongiózní kosti v měřené dny.

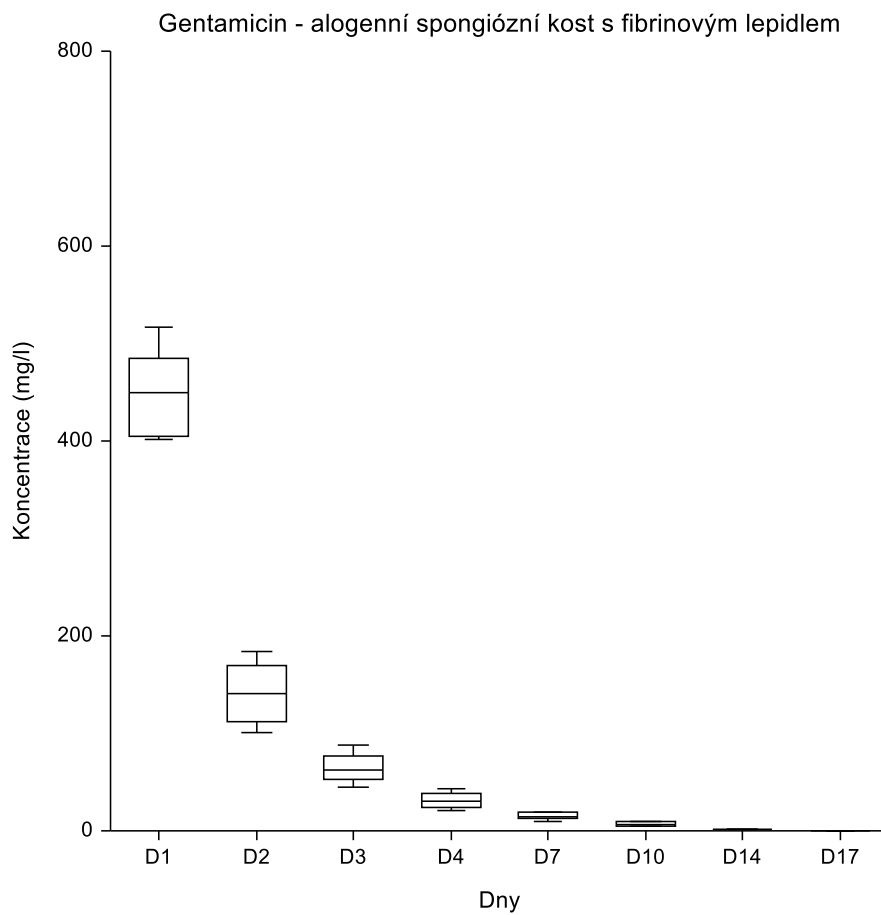
5/ Alogenní spongiózní kost smíchaná s fibrinovým lepidlem impregnovaná současně vankomycinem a gentamicinem

Přidání fibrinového lepidla znamenalo vyšší koncentrace vyloučených antibiotik při stejné kinetice jako u předešlého nosiče bez lepidla, ale nepřineslo to delší dobu eluce (Graf 7,8).



Graf 7

Uvolňované koncentrace vankomycinu z alogenní spongiózní kosti s fibrinovým lepidlem v měřené dny.

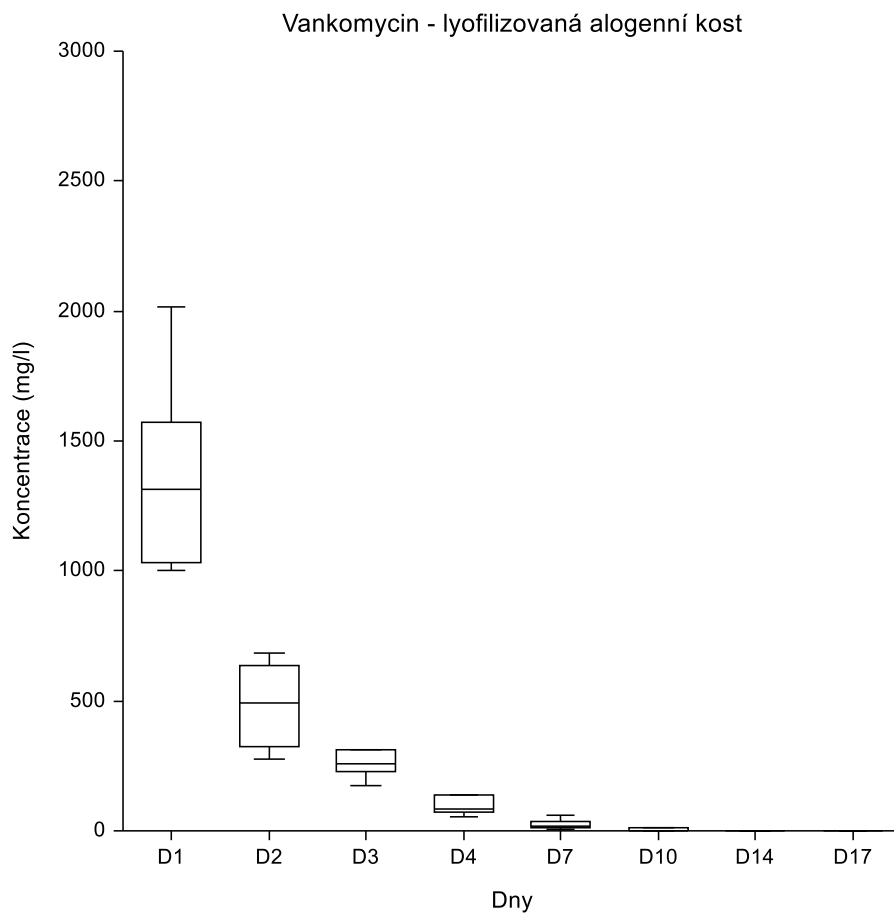


Graf 8

Uvolňované koncentrace gentamicinu z alogenní spongiózní kosti s fibrinovým lepidlem v měřené dny.

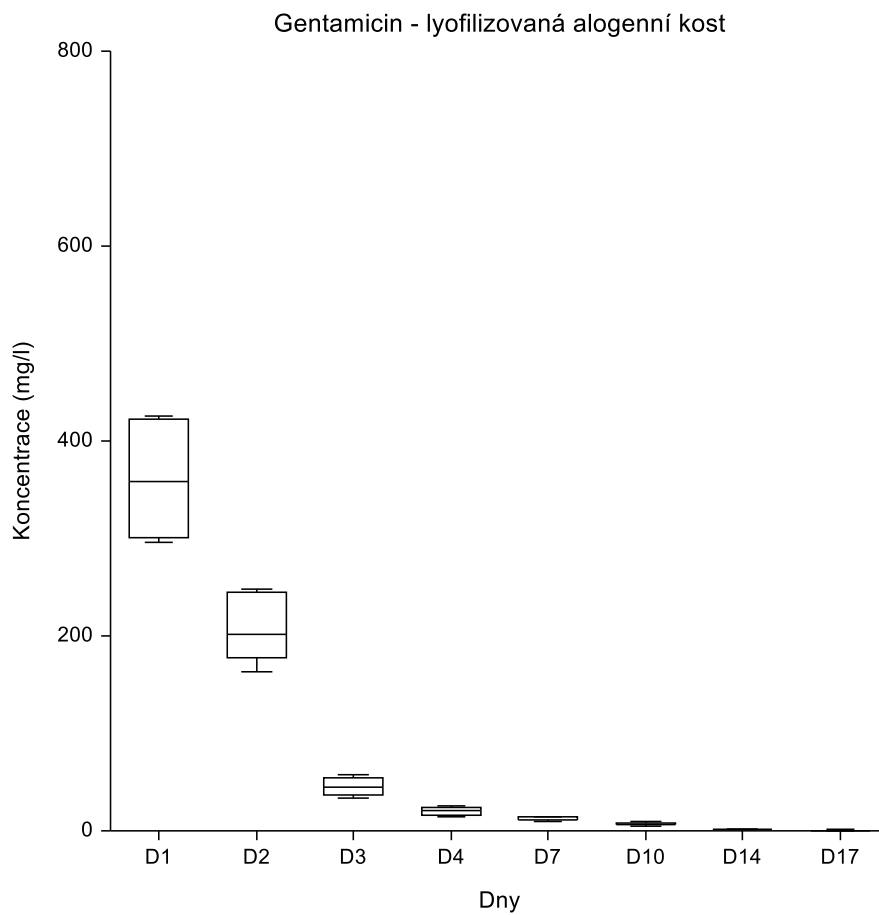
6/ Lyofilizovaná alogenní kost impregnovaná současně vankomycinem a gentamicinem

Nosič vykazoval eluční kinetiku a vztah ke kostnímu cementu jako alogenní spongiózní kost bez signifikantních rozdílů ($\alpha > 0.05$). Nepotvrdila se hypotéza, že nosič v prášku absorbuje větší množství antibiotik během rehydratace (Graf 9,10).



Graf 9

Uvolňované koncentrace vankomycinu z lyofilizované alogenní spongiózní kosti v měřené dny.

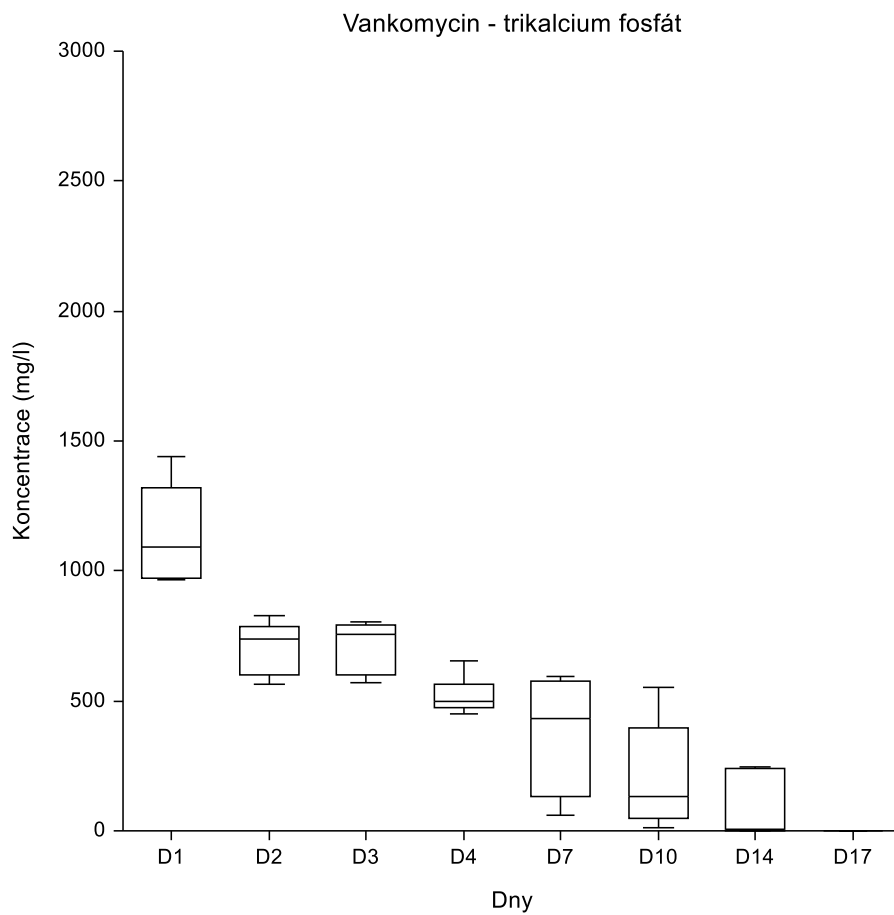


Graf 10

Uvolňované koncentrace gentamicinu z lyofilizované alogenní spongiózní kosti v měřené dny.

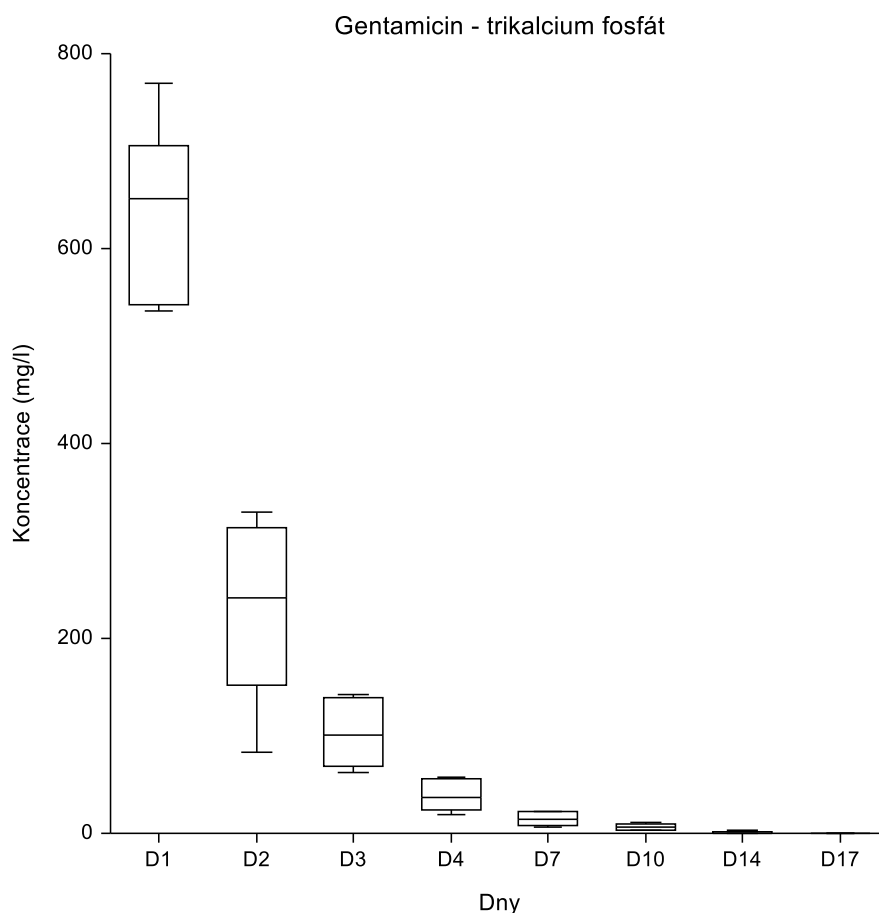
7/ Trikalcium fosfát impregnovaný současně vankomycinem a gentamicinem

U vankomycinu byl zjištěn signifikantní rozdíl proti všem předchozím nosičům, včetně cementu s pozvolným poklesem koncentrací do 14. dne od impregnace ($\alpha < 0.05$). Eluce gentamicinu byla nejvyšší 1. den, jinak eluční kinetika byla obdobná jako u předchozích nosičů (Graf 11,12).



Graf 11

Uvolňované koncentrace vankomycinu z trikalciium fosfátui v měřené dny.



Graf 12

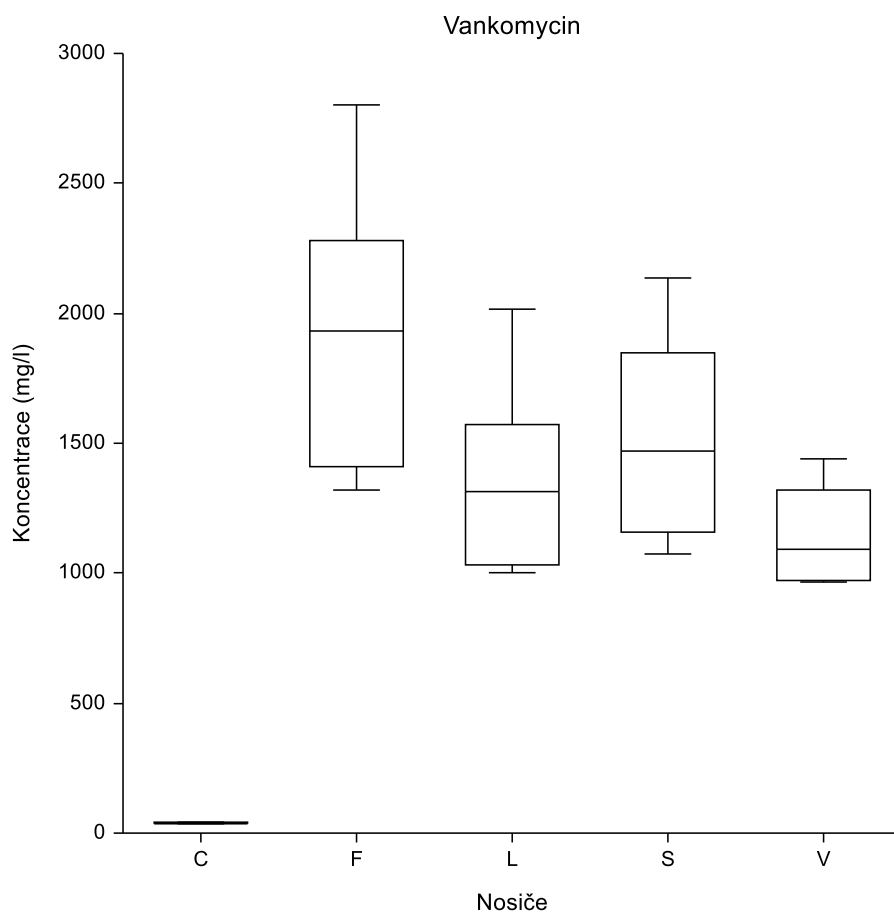
Uvolňované koncentrace gentamicinu z trikalcium fosfátu v měřené dny.

Celkové množství naměřených koncentrací antibiotik z jednotlivých nosičů

Celkové množství vyloučeného vankomycinu bylo nejnižší z kostního cementu (C), statisticky srovnatelné hodnoty byly z alogenní spongiózní kosti (S), lyofilizované kosti (L) a trikalcium fosfátu (V) a nejvyšší z alogenní spongiózní kosti s fibrinovým lepidlem (F) (Graf 13).

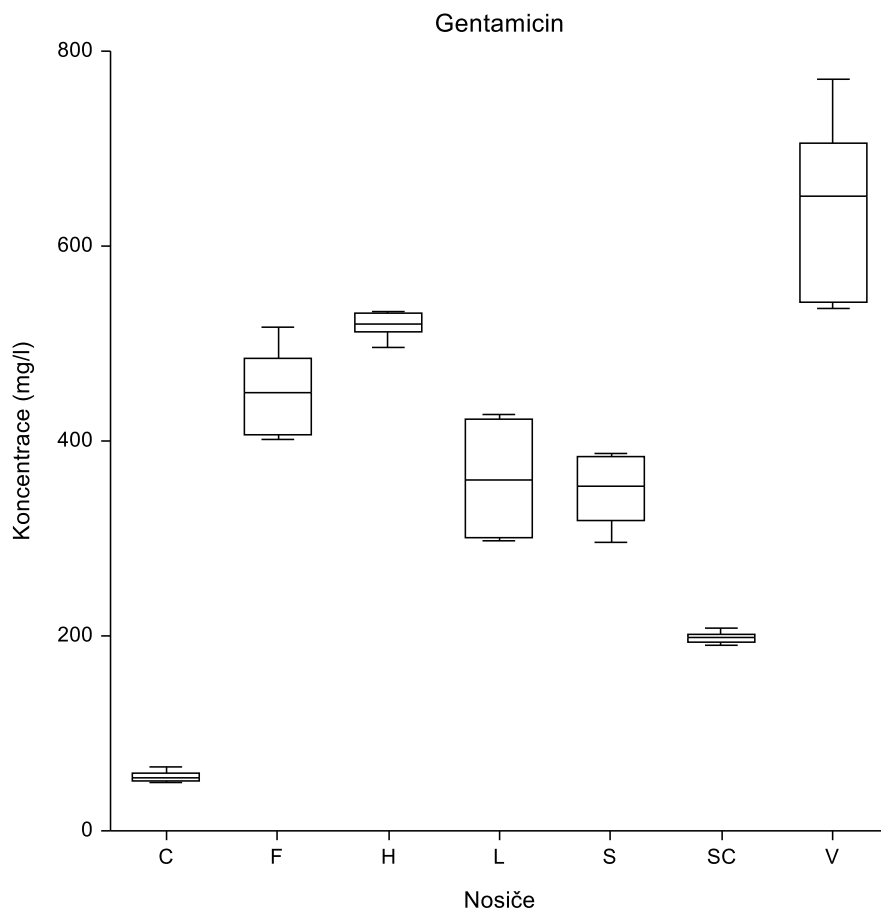
Celkové množství vyloučeného gentamicinu se v jednotlivých nosičích výrazně lišilo od předchozí skupiny. Nejnižší bylo opět z cementu (C), následované Septocollem® (SC), dále srovnatelné množství z alogenní spongiózní kosti (S) a lyofilizované kosti (L),

srovnatelné množství z alogenní spongiózní kosti s fibrinovým lepidlem (F) a z Herafill® beads G (H), největší množství pak z trikalcium fosfátu (V) (Graf 14).



Graf 13

Celkové množství naměřených koncentrací vankomycinu z jednotlivých nosičů.



Graf 14

Celkové množství naměřených koncentrací gentamicinu z jednotlivých nosičů.

5.3.2. Vliv nosičů s antibiotiky na proliferaci mezenchymálních kmenových buněk

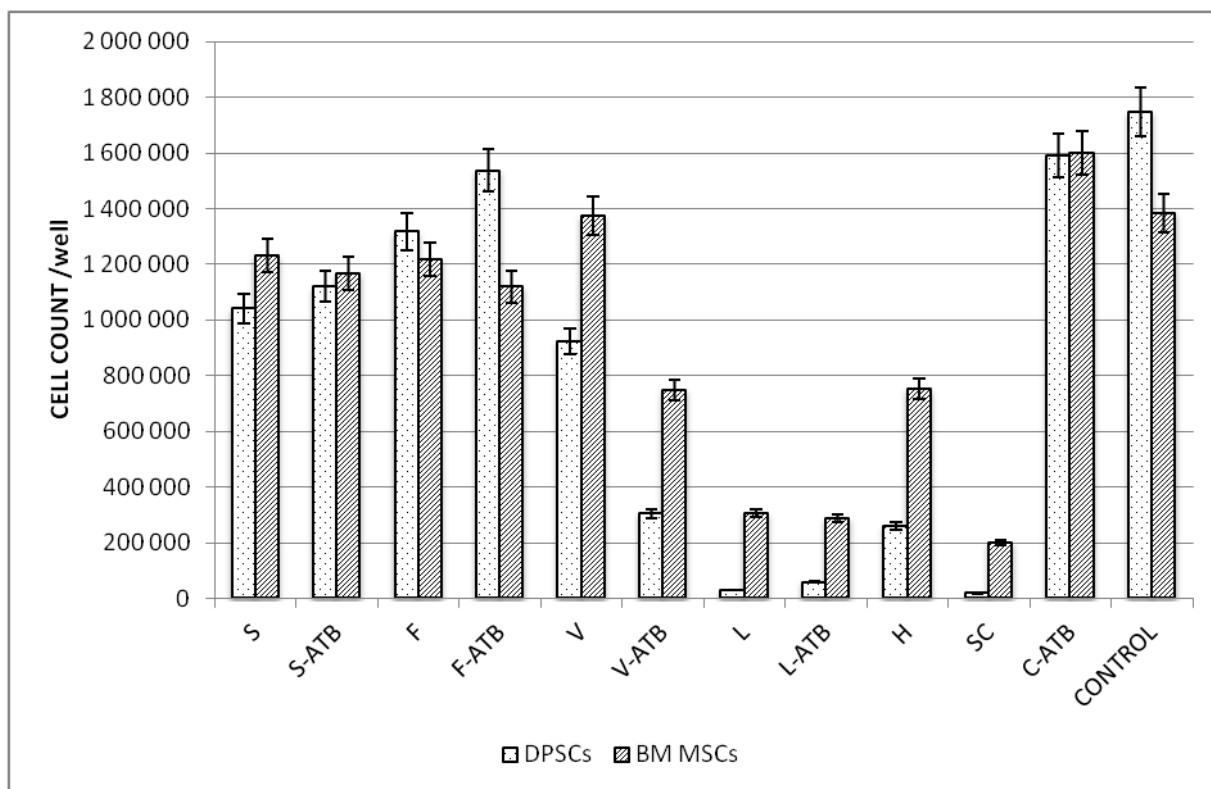
Proliferační aktivita buněk byla srovnatelná s kontrolní skupinou (CONTROL) u kostního cementu (C), u alogenní spongiózní kosti včetně stejného nosiče s fibrinovým lepidlem, v obou případech s i bez antibiotik (S, S-ATB, F, F-ATB). Ani iniciální vysoká koncentrace antibiotik u spongiózní kosti, ani jejich nízká koncentrace u cementu neovlivnila dobrou proliferaci mezenchymálních kmenových buněk.

Signifikantní rozdíl byl zjištěn u trikalciem fosfátu. Zatímco dobrá proliferační aktivita byla pozorována v přítomnosti nosiče bez antibiotik (V), v případě impregnace antibiotiky (V-ATB) byla tato aktivita významně nižší, což odpovídalo dalšímu gentamicinovému nosiči - Herafill® beads G (H).

Lyofilizovaná kost (L, L-ATB) a Septocoll® E (SC), který obsahuje koňský kolagen měly největší negativní efekt na proliferaci kmenových buněk.

Byly rovněž zjištěny rozdíly v proliferační aktivitě mezi mezenchymálními kmenovými buňkami z kostní dřene - BM MSC a ze zubní pulpy – DPSC: snížená proliferace BM MSC v nosičích s antibiotiky ve srovnání s nosiči bez antibiotik, a naopak zvýšená proliferace DPSC v impregnovaných nosičích spongiózní kosti, spongiózní kosti s fibrinovým lepidlem a lyofilizované kosti (S-ATB, F-ATB a L-ATB). Dále byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi počty BM MSC a DPSC mimo kostní cement a spongiózní kost s antibiotiky ($\alpha < 0,05$).

Výsledky jsou shrnuty v Grafu 15.

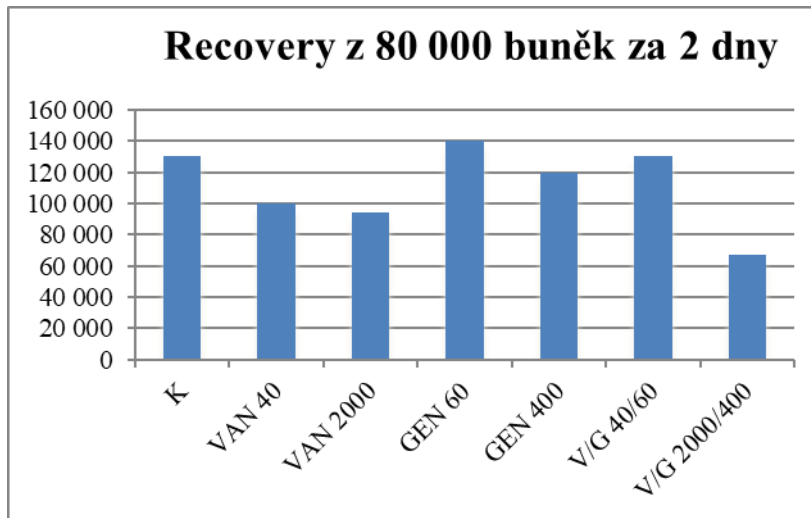


Graf 15

Proliferace DPSC a BM MSC v přítomnosti jednotlivých nosičů

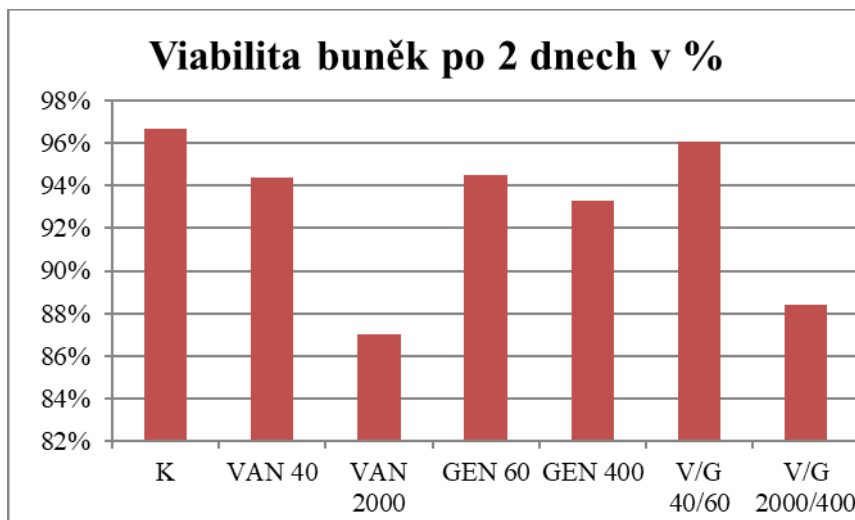
5.3.3. Vliv iniciální vyšší koncentrace antibiotik na proliferaci mezenchymálních kmenových buněk

Výsledky demonstrují následující Grafy 16-19.



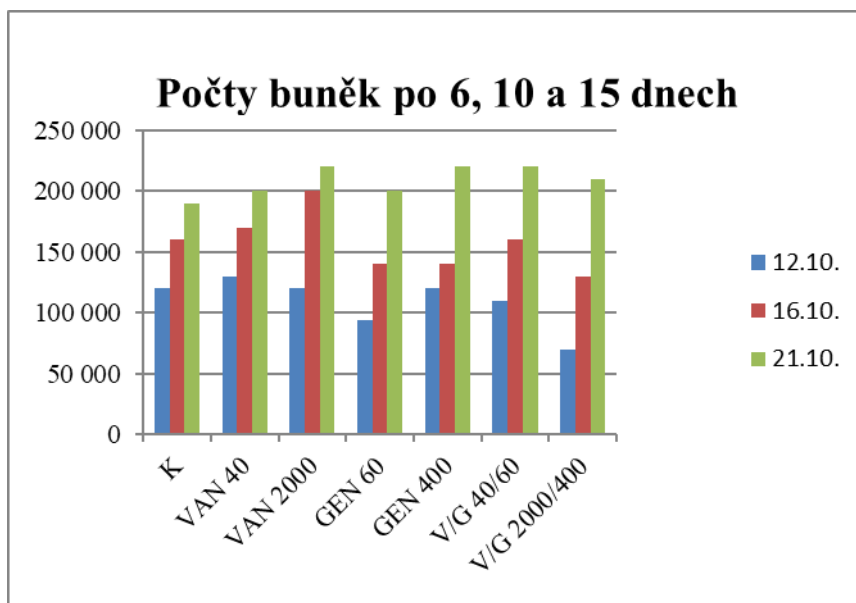
Graf 16

Vliv různých koncentrací antibiotik na proliferaci BM MSC po 2 dnech.



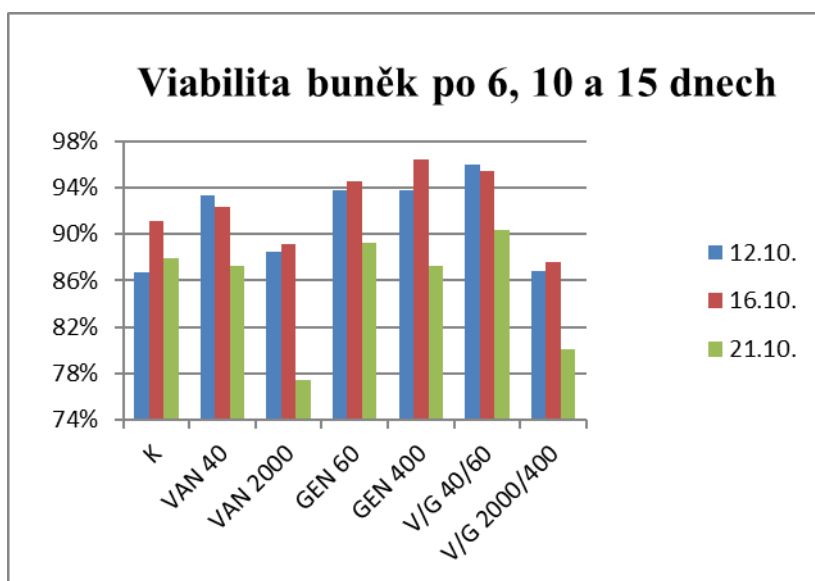
Graf 17

Vliv různých koncentrací antibiotik na viabilitu BM MSC po 2 dnech.



Graf 18

Vliv různých koncentrací antibiotik na proliferaci BM MSC po 6, 10 a 15 dnech.



Graf 19

Vliv různých koncentrací antibiotik na viabilitu BM MSC po 6, 10 a 15 dnech.

Druhý den došlo k poklesu počtu buněk u kombinace obou antibiotik ve vysokých koncentracích. V ostatních případech byl počet buněk vyšší než počáteční, u nižší koncentrace gentamicinu dokonce vyšší než u kontroly. V dalších dnech se počet buněk zvyšoval, dokonce i v případě kombinace obou antibiotik ve vysokých koncentracích, kdy počet buněk byl srovnatelný s ostatními skupinami.

Z hlediska viability buněk, ve všech skupinách s antibiotiky byl zjištěn pokles viability oproti kontrolní skupině, nejvíce ve 2 skupinách s vysokou koncentrací vankomycinu. V dalších dnech se navyšoval počet buněk, ale klesal relativní podíl viabilních buněk, opět zejména ve skupinách s vysokou koncentrací vankomycinu.

5.3.4. Citlivosti různých koncentrací vankomycinu a gentamicinu k planktonickým formám a na biofilm u vybraných patogenů chronické infekce kloubních náhrad

Hodnocení antibakteriálního efektu vankomycinu a gentamicinu na planktonické formy vybraných bakteriálních agens

Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 7.

Testované kmeny	Testovaná antibiotika			
	gentamicin		vankomycin	
	MIC (mg/l)	MBC (mg/l)	MIC (mg/l)	MBC (mg/l)
Grampozitivní				
<i>St. aureus</i>	0,25;0,25;0,5	0,25;0,5;0,5	<0,5;<0,5	1;1
MRSA	1;1	1;2	1	2
<i>St. epidermidis</i> I.	>8;>8	>8;>8	1;1;<0,5;1;1	2;1;<0,5;1;2
<i>St. epidermidis</i> II.	<0,125	0,125		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	8	8	<0,25	0,25
<i>Enterococcus faecalis</i>	32	64	2	8
<i>Enterococcus faecium</i>	8	8	0,5;1	2;8
Gramnegativní				
<i>Escherichia coli</i>	1;0,5;0,5;1	1;0,5;0,5;1		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1;<0,5, <0,5	1;0,5;0,5		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2;32;64;2	8;32;128;4		
<i>Proteus mirabilis</i>	0,5	0,5		

Tab. 7

MIC a MBC vankomycinu a gentamicinu na jednotlivé druhy planktonických bakterií

IKN.

Ve všech případech zkoumaných antibiotických nosičů by uvolněné koncentrace antibiotik byly účinné na planktonické formy bakteriálních agens (změřené koncentrace antibiotik z nosičů výrazně převyšují MIC a MBC).

Hodnocení antibakteriálního efektu vankomycinu a gentamicinu na bakteriální kultury ve formě biofilmu

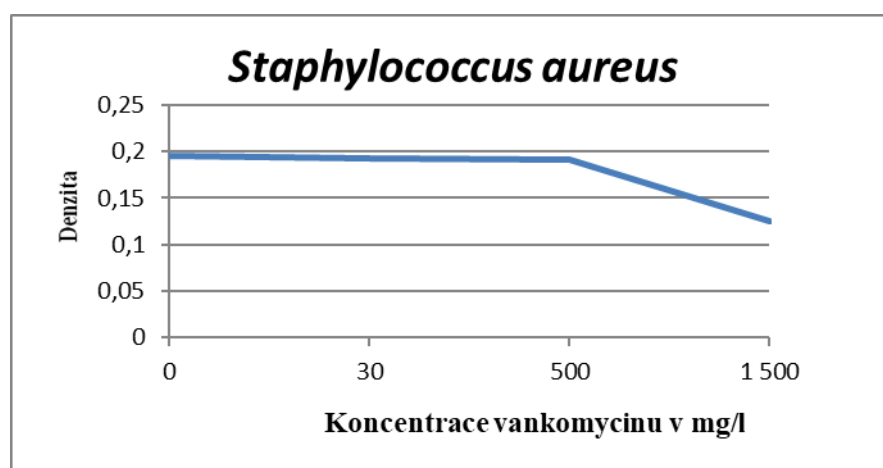
Výsledky jsou dokumentovány v Tabulkách 8, 9 a Grafech 20 a - d.

Vankomycin

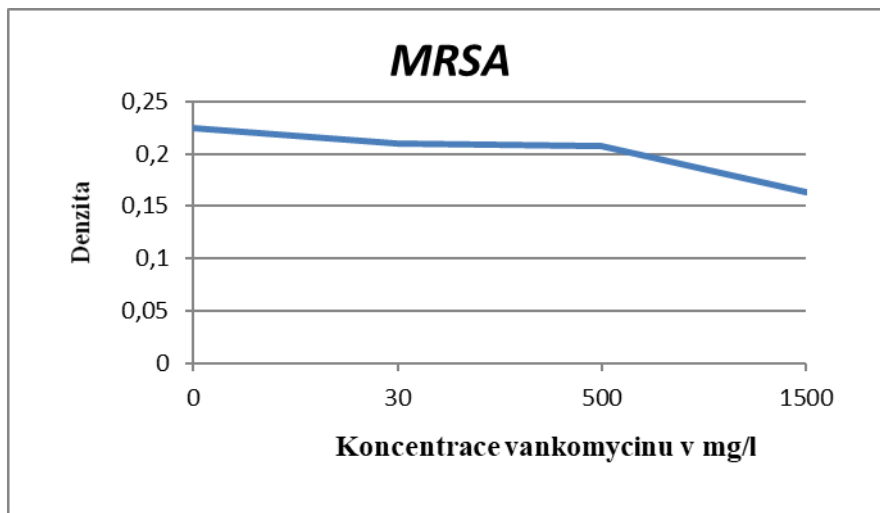
Testovaný kmen	Negativní kontrola (bez bakterií, denzita „pozadí“)	Pozitivní kontrola (bez atb, jen bakterie)	VAN 30 mg/l	VAN 500 mg/l	VAN 1500mg/l
<i>St. aureus</i>	0,057	0,195	0,193	0,191	0,125
MRSA	0,055	0,224	0,210	0,208	0,163
<i>St. epidermidis</i>	0,056	0,275	0,269	0,253	0,218
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,058	0,428	0,423	0,421	0,341

Tab. 8.

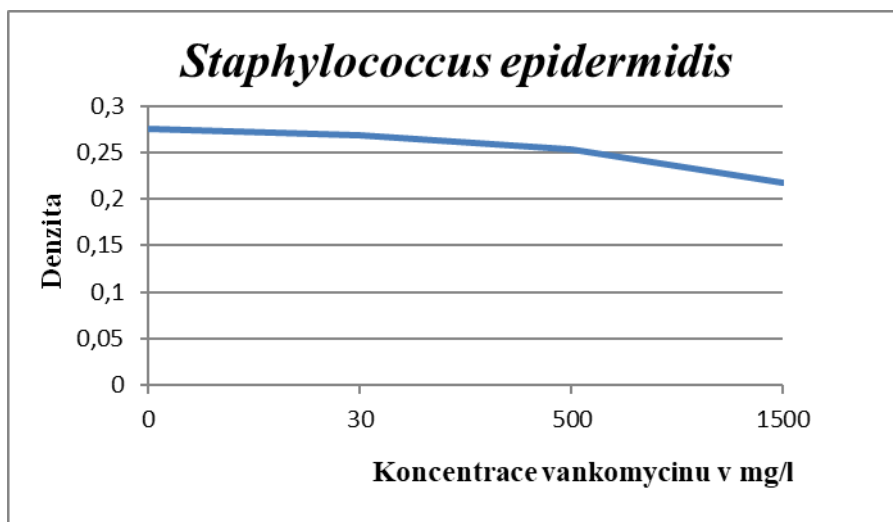
Změřená denzita odpovídající množství bakteriální kultury u sledovaných bakteriálních kmenů v biofilmu při různých koncentracích vankomycinu. Graficky vyjádřeno v Grafech 20 a – d.



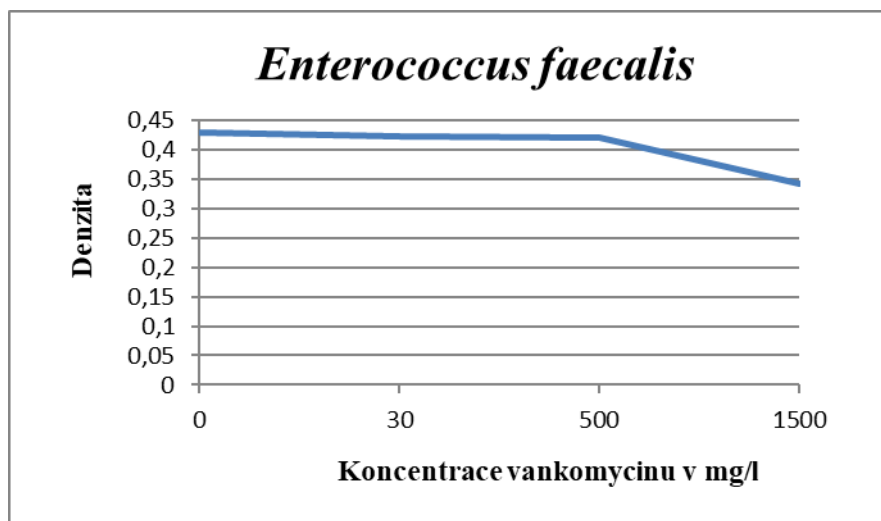
Graf 20a. *St. aureus*



Graf 20b. *MRSA*.



Graf 20c. *St. epidermidis*.



Graf 20d. *Enterococcus faecalis*.

Ubývající denzita a tím i ubývající počet bakteriální kultury ve formě biofilmu je patrná v koncentracích vankomycinu od 500 mg/l, nejvíce při koncentraci 1500 mg/l, což odpovídá koncentracím dosaženým uvolněním vankomycinu z impregnovaných kostních štěpů. Nejmarkantnější je tento výsledek u kmene *St. aureus*.

Gentamicin

Tab. 9. Změřená denzita odpovídající množství bakteriální kultury u sledovaných bakteriálních kmenů v biofilmu při různých koncentracích gentamicinu.

Testovaný kmen	Negativní kontrola (bez bakterií, denzita „pozadí“)	Pozitivní kontrola (bez ATB, jen bakterie)	GEN 1000 mg/l	GEN 10 000 mg/l
<i>St. aureus</i>	0,049	0,416	0,307	0,360
MRSA	0,048	0,227	0,196	0,181
<i>St. epidermidis</i>	0,051	0,324	0,245	0,158
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,052	0,408	0,425	0,475
<i>Salmonella Enteritidis</i>	0,048	0,132	0,109	0,073
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,051	0,148	0,098	0,088
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,049	0,140	0,075	0,057

Z dosažených výsledků vyplývá, že koncentrace gentamicinu uvolněné z testovaných nosičů antibiotik by neměly podstatný vliv na bakteriální kultury ve formě biofilmu. K úbytku denzity, a tedy i bakteriálních kultur ve formě biofilmu docházelo až při vysokých koncentracích gentamicinu nad 1000 mg/l.

5.4. Diskuse

V první části experimentální studie byla hodnocena eluční kinetika vankomycinu a gentamicinu z vybraných nosičů. Přestože jsou preferovány nosiče antibiotik podporující kostní regeneraci, byl do studie zařazen také kostní cement obsahující antibiotika vzhledem k jeho dlouhodobému používání na ortopedických pracovištích. Pro klinické použití nosičů s antibiotiky je důležitá nejen eluční kinetika antibiotik, ale i vliv těchto nosičů na proliferaci mezenchymálních kmenových buněk, proto jsou současně diskutovány obě vlastnosti.

Anagnostakos et al. na podkladě studií deklarují vylučování antibiotik z cementu po dobu 6 – 8 týdnů (Anagnostakos et Kelm, 2009). V jiné studii Anagnostakos a kol. měřili v drénech koncentraci vankomycinu a gentamicinu uvolněných z cementových spacerů nebo cementových kuliček. Poslední měřitelná koncentrace z kuliček byla zjištěna 13. den, ze spaceru 7. den (Anagnostakos et al., 2009). V předkládané studii byla poslední měřitelná koncentrace antibiotika z cementu prokázána 17. den po impregnaci, zároveň byla naměřena nejmenší koncentrace antibiotik ve srovnání s ostatními nosiči. Tento výsledek podporuje druhou uváděnou (klinickou) Anagnostakosovu práci. Zároveň i podporuje teorii, že antibiotika jsou z cementu uvolňována zejména z jeho povrchu a jejich největší množství je uzavřeno uvnitř cementu (Lewis et Janna, 2004). Antibiotika uvnitř cementu mohou být uvolněna i za několik let od implantace endoprotézy při zlomeninách cementového pláště. Subinhibiční koncentrace antibiotik pak významně zvyšují riziko indukce bakteriální rezistence (Powles et al., 1998). Množství uvolněného antibiotika může záviset také na způsobu přípravy cementu. Vakuové míchání, díky kterému je redukován výskyt pórů uvnitř cementu, by znamenalo uvolňování menšího množství antibiotik. Meyer a kol. ve své práci porovnávají vyloučené množství antibiotika

ze 6 komerčně dostupných cementů při vakuovém a klasickém míchání. Vakuové míchání znamenalo u 3 cementů snížení vyloučeného množství antibiotik, u 3 cementů zvýšené (Meyer et al., 2011). Kuehn a kol. srovnávali vylučování gentamicinu z 12 druhů cementů *in vitro* po dobu 7 dní a zjistili signifikantní rozdíly mezi jednotlivými cementy (Kuehn et al., 2005). Nosič neinhiboval proliferaci mezenchymálních kmenových buněk, v případě BM MSC byl jejich počet dokonce vyšší než v kontrolní skupině. Podíl na dobré proliferaci buněk mohla mít nejen nízká koncentrace vylučovaných antibiotik, ale i proběhnutí exotermické reakce cementu před vlastním experimentem mimo vliv na buňky. Limitací experimentální studie bylo tedy použití pouze jednoho cementu - VancogenX (Tecres S.p.a., Italy). Tento cement byl v době realizace studie jediným na trhu, který obsahoval vankomycin s gentamicinem, což odpovídalo zjištěním z předchozí klinické studie pro výběr antibiotik.

Publikované nevýhody kolagenních nosičů zahrnují delší degradaci nosiče, krátkodobé vylučování antibiotik, potencionální riziko kolagenu jako substrátu pro adhezi bakterií, biologická reakce na nosič, včetně cirkulace protilátek proti xenogennímu kolagenu (Friess, 1998). V předkládané studii byly koncentrace gentamicinu měřitelné až do 25. dne, vyšší než u kostního cementu. Septocoll vykázal největší inhibici proliferace mezenchymálních kmenových buněk ze všech nosičů. Je předpoklad, že Septocoll složený z koňského kolagenu tvoří strukturu podobnou membráně, pokrývá kultivační misku, což vede k nízké perfuzi kyslíku, hypoxii, a nakonec ke smrti kultivovaných buněk. Nepříznivé výsledky z této studie mají paralelu také v klinických zkušenostech našeho pracoviště, kdy po použití Septocollu byly pozorovány sekrece z operačních ran.

Charakter eluční kinetiky gentamicinu z Herafillu připomínal eluční kinetiku impregnovaných štěpů s dostatečnými koncentracemi antibiotika. Nicméně tento nosič inhiboval proliferaci mezenchymálních kmenových buněk, více DPSC. Vzhledem

k příznivé eluční kinetice gentamicinu je v klinické praxi doporučováno posílit biokompatibilitu Herafillu jeho smícháním s kostními štěpy (Coraca-Huber et al., 2014). Tento postup využíváme na našem pracovišti s dobrými výsledky.

Společnou nevýhodou jak Septocollu, tak Herafilu bylo, že obsahovaly pouze gentamicin, což by ovlivnilo pouze 64,2 % patogenů chronické periprotetické infekce dle předchozí klinické studie.

Vitoss (trikalcium fosfát) prokázal velmi dobrou eluční kinetiku obou antibiotik, což může mít souvislost s jeho vysokou porozitou (90 %) a tedy impregnaci nosiče prakticky v celém objemu, obdobně jako u předoperačně připravených nosičů. Některé studie sice dokumentují povzbudivou eluční kinetiku antibiotik z různých kalciumfosfátových nosičů (Stallmann et al., 2006), nicméně byl zaznamenán velký rozdíl mezi nosičem s a bez antibiotik. S antibiotiky byla patrná inhibice proliferace BM MSC i DPSC obdobně jako u Herafillu. Navíc některé studie dokumentují sníženou aktivitu aminoglykosidů při nízkém pH, hypoxémii, v přítomnosti kalcia, magnesia a hyperosmolaritě (Baudoux et al., 2007).

Winkler používal lyofilizovanou kost, štěpy byly inkubovány s roztokem vankomycinu a tobramycinu 24 hodin, koncentrace antibiotik z kosti byla nejméně 13 dní nad úrovní minimální inhibiční koncentrace. Médium bylo měněno každých 24 hodin po dobu 10 dní, dále 13., 15., 20. a 22. den (Winkler, 2000). Winkler a kol. publikovali použití štěpů impregnovaných vankomycinem a tobramycinem během jednodobé revize pro periprotetickou infekci s povzbudivými výsledky (Winkler et al., 2008). V experimentální studii byly impregnovány štěpy po dobu 30 minut a bylo dosaženo srovnatelného elučního času, navíc při takto simulované peroperační přípravě je možné připravit libovolné množství nosiče s antibiotiky pro konkrétní situaci a tato příprava je

významně levnější. Lyofilizovaná kost také vykazovala značnou inhibici proliferace BM MSC i DPSC bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost antibiotik.

Cornu a kol. jako potencionální příčinu tohoto jevu udávají lyofilizaci a ozáření kosti, které vedou k destrukci organické matrix (Cornu et al., 2000).

Alogenní spongiózní kost samotná nebo smíchaná s fibrinovým lepidlem vykazala srovnatelnou eluční dobu jako kostní cement (stejnou v případě gentamicinu, kratší u vankomycinu) při dosažených výrazně vyšších koncentracích. Zároveň byla zaznamenána i dobrá proliferační aktivita BM MSC a DPSC. Přidání fibrinového lepidla neprodloužilo eluční dobu, ale zvýšilo měřené koncentrace antibiotik. Witso a kol. zjistili, že profil eluce antibiotik z kostních štěpů se liší podle typu antibiotika, vankomycin se vylučoval 7 dní (Witso et al., 2000). Ve studiích se uvádí rychlá eluce antibiotik během prvních dvou dní s jejich vysokou koncentrací, která může být toxická pro okolní tkáň (Lewis et al., 2011). Vysoká koncentrace vyloučených antibiotik během prvních dvou dnů byla zaznamenána rovněž v této studii, proto byl dále zkoumán její vliv na bakteriální kultury a mezenchymální kmenové buňky.

Byly také zaznamenány významné rozdíly v chování BM MSC a DPSC vůči antibiotickým nosičům. Zatímco u BM MSC byla nalezena dle předpokladu snížená proliferace buněk v přítomnosti antibiotik, DPSC reagovali zvýšenou proliferací v případě antibiotiky impregnované spongiózní kosti, spongiózní kosti s fibrinovým lepidlem a lyofilizované kosti. Důvod tohoto není zřejmý. Volba DPSC ukázala rozdíly mezi určitými typy mezenchymálních kmenových buněk a pro svůj klinický význam (v případě antibiotických nosičů a DPSC léčba infektů ve stomatologii) je jistě podnětem k další vědecké práci.

V další části je diskutován vliv různých koncentrací vankomycinu a gentamicinu na proliferaci a viabilitu mezenchymálních kmenových buněk. Vankomycin je udáván

ve studiích jako relativně bezpečný pro osteogenní buňky (Edin et al., 1996). Rathbone a kol. zkoumali vliv antibiotik na osteogenní aktivitu buněk, vankomycin v koncentracích do 2000 mg/l působil méně než 25% pokles aktivity alkalické fosfatázy a obsahu DNA v osteoblastech (Rathbone et al., 2011). Naproti tomu je popisován negativní vliv gentamicinu na osteogenezi (Isefuku et al., 2003, Ince et al., 2007). Gentamicin v koncentracích mezi 10 a 200 mg/l působil 25 – 50% pokles aktivity alkalické fosfatázy a obsahu DNA v osteoblastech (Rathbone et al., 2011). V experimentální studii byla koncentrace obou antibiotik nejvyšší první dva dny u všech nosičů, nejmenší u cementu, nejvyšší koncentrace vankomycinu u alogenní kosti s fibrinovým lepidlem a gentamicinu u trikalciem fosfátu. V rozporu s citovanými studiemi docházelo k poklesu počtu mezenchymálních kmenových buněk a jejich viability během prvních dvou dní u vysokých koncentrací vankomycinu. Po 15 dnech se počty buněk ve všech skupinách prakticky vyrovnaly, pokles viability byl relativní vzhledem k tomuto navýšenému počtu. BM MSC se tedy dokázaly zotavit z původního insultu vysokými koncentracemi antibiotik. Navíc po 15 dnech předpokládáme již minimální hodnoty koncentrací antibiotik z nosičů a BM MSC by neměly být antibiotiky dále ovlivňovány. Z hlediska porovnávání studií je nutné uvést, že tato studie sledovala proliferaci a viabilitu mezenchymálních kmenových buněk, zatímco Rathbone a kol. sledovali osteogenní aktivitu - aktivitu alkalické fosfatázy a obsah DNA v osteoblastech (Rathbone et al., 2011).

V poslední části experimentální studie byl zjišťován vliv antibiotik na planktonické bakteriální kultury a kultury ve formě biofilmu. V případě planktonických forem by byly účinné všechny koncentrace antibiotik ze sledovaných nosičů. Nicméně problém s účinností může nastat u některých kombinací bakteriálních kultur a antibiotických nosičů, zejména tam, kde je přítomen pouze gentamicin. Dále u cementů, opět pokud bychom použili pouze gentamicinový cementový spacer, nemusela by uvolněná koncentrace

gentamicinu dosáhnout minimální baktericidní koncentrace u *Enterococcus faecalis* nebo u některých kultur *Pseudomonas aeruginosa*. Špatné výsledky léčby periprotetických infekcí způsobené enterokoky byly publikovány Kheirem a kol. (Kheir et al., 2017). Cunningham a kol. uvádějí ve stejné souvislosti infekty vyvolané *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* a MRSA (Cunningham et al., 2017). V případě bakteriálních kultur ve formě biofilmu výsledky dokumentují citlivost některých bakteriálních kultur na vysoké hladiny vankomycinu (1500 mg/l), které byly přítomny v prvním dnu u impregnované alogenní kosti s i bez fibrinového lepidla, lyofilizované kosti a také u impregnovaného trikalcium fosfátu. Zatímco uvolněné koncentrace gentamicinu by byly na bakteriální kultury ve formě biofilmu prakticky neúčinné (eluze v desítkách až stovkách mg/l, určitá citlivost na patogeny v tisících až desetitisících mg/l). Výše uvedená zjištění se mohou podílet na publikovaných horších výsledcích léčby periprotetických infekcí způsobených gramnegativními patogeny (Zmistowski et al., 2011). Přítomnost bakterií v biofilmu způsobuje významné snížení citlivosti k antibiotické léčbě. Spíše než snížená penetrace antibiotik do biofilmu se za snížení citlivosti k antibiotické léčbě považuje redukovaný růst bakteriálních kultur (Esposito et al., 2008, Patel, 2005). Subpopulace bakterií se mohou rovněž diferencovat do rezistentních kmenů s expresí specifických genů rezistence (Costerton, 2005).

Limitací této části studie je modelace pouze časného biofilmu, který lze vytvořit podle popsané metodiky v podmínkách *in vitro*. Zralý biofilm lze do jisté míry vytvořit na zvířecím modelu, což dokumentuje například studie Heima a kol. (Heim et al., 2015).

Z hlediska limitací celé experimentální studie lze uvést obecný problém všech *in vitro* studií, tedy korelace jejich výsledků v humánní medicíně. Výsledky farmakokinetiky jsou ovlivněny designem studie, zejména frekvencí měření koncentrací a množstvím média, které je vyměňováno. Například Bormann a kol. míchali vankomycin, gentamicin

a tobramycin s demineralizovanou kostní matrix nebo hyaluronátem ve speciálně připraveném míchacím zařízení. V případě výměn celého média (jako v této studii) se gentamicin a tobramycin kompletně uvolnily po 3 dnech a vankomycin po 14 dnech. V případě výměn jen 50 % média zaznamenali inhibici růstu bakteriální kultury *St. aureus* po dobu 56 dní (Bormann et al., 2014). Kritickými faktory pro výslednou lokální koncentraci antibiotik, které ve studii *in vitro* obtížně predikujeme, jsou *in vivo* stabilita antibiotik a jejich clearance, tedy poměr mezi uvolněním z nosiče a jejich eliminací. V humánní medicíně je možnost měřit koncentraci antibiotik z drénu, ten však nelze ponechat dlouhodobě pro riziko ascendentní infekce (Proček et al., 2014).

5.5. Závěr

Při syntéze výsledků jednotlivých experimentů studie lze i přes výše uvedené limitace konstatovat, že nejlepší výsledky vykazovala **impregnovaná alogenní spongiózní kost**:

- impregnační metoda oběma antibiotiky je přenositelná do klinické praxe peroperační přípravy antibiotických nosičů v množství dle aktuální potřeby,
- zaznamenané eluční koncentrace antibiotik byly dostatečně vysoké, aby byly účinné na planktonické bakterie a částečně v případě vankomycinu na bakteriální kultury ve formě biofilmu, neúplná účinnost na všechny tyto kultury tak klade důraz na odstranění implantátu s biofilmem a pečlivý chirurgický debridement při chronické periprotetické infekci,
- přes vysoké iniciační koncentrace antibiotik se mezenchymální kmenové buňky zotavily a po 15 dnech jejich počet byl srovnatelný s kontrolní skupinou, navíc v této době již byla eluce antibiotik z nosiče dokončena a antibiotika tak dále tyto buňky neovlivňovala,
- rovněž celý nosič impregnovaný antibiotiky neměl negativní vliv na proliferaci BM MSC a DPSC,
- doba eluce byla v případě gentamicinu shodná s kostním cementem, v případě vankomycinu kratší, nicméně nebylo zaznamenáno dlouhodobé vylučování subinhibičních malých koncentrací antibiotik a rovněž nebyla zaznamenána rychlá eluce antibiotik.

Ostatní nosiče ve srovnání s impregnovanou alogenní spongiózní kostí

Alogenní spongiózní kost s fibrinovým lepidlem:

- přidání fibrinového lepidla neprodlouží eluci antibiotik, zvýší hodnotu vyloučené koncentrace antibiotik, ale ne na takovou výši, aby byla více účinnější na bakteriální kultury ve formě biofilmu.

Lyofilizovaná alogenní kost:

- neimpregnovaný i impregnovaný nosič s antibiotiky významně omezovaly proliferaci mezenchymálních kmenových buněk.

Trikalcium fostát s 90% porozitou:

- přes velmi dobrou eluční kinetiku obou antibiotik impregnovaný nosič s antibiotiky významně omezoval proliferaci mezenchymálních kmenových buněk.

Kostní cement VancogenX (Tecres S.p.a., Itálie):

- nevýhodou je nevstřebatelnost nosiče, nízké koncentrace vyloučených antibiotik, v některých případech na hranici účinnosti na bakteriální planktonické kultury, poměrně velký podíl z původního množství antibiotik zůstává nevyločen v cementu.

Septocoll® E (Biomet, Německo)

- v případě tohoto nosiče byla zaznamenána největší inhibice proliferace mezenchymálních kmenových buněk vzhledem k ostatním nosičům, nevýhodou je i přítomnost pouze gentamicinu.

Herafill® beads G (Heraeus, Německo)

- přes dobrou eluční kinetiku antibiotik byla také zaznamenána inhibice proliferace mezenchymálních kmenových buněk, další nevýhodou je rovněž zúžené spektrum účinnosti pro obsah pouze gentamicinu.

Dalšími nálezy ve studii, které nelze jednoznačně vysvětlit jsou odlišné chování mezenchymálních kmenových buněk, zejména vystupňovaná proliferační aktivita DPSC u některých nosičů s antibiotiky, a zotavení mezenchymálních kmenových buněk po inhibici proliferace iniciálními vysokými koncentracemi antibiotik.

6. Závěrečné shrnutí

Z úvodní části je patrné, že diagnostika IKN a její odlišení od aseptického uvolnění endoprotézy je stále obtížné a není založeno jen na jednom testu, ale na složené mozaice z více vyšetření. IKN je chápána jako komplexní proces začínající bakteriální adhezí na implantát a tvorbou biofilmu, následovaný různou formou interakce mezi hostitelem, implantátem, mikroorganismy a jejich produkty, což činí diagnostiku obtížnou, zejména v případě low-grade infekcí. Do diagnostického procesu jsou zapojována vyšetření markerů, jak z periferní krve, tak ze synovie, rozvíjejí se vyšetřovací metody pro identifikaci patogena, jeho citlivosti k antibiotikům. Mimo mikrobiologických metod, včetně těch, které umožní zjistit výsledek v kratším čase, jsou do budoucna významné také genetické metody. Přesná a rychlá diagnostika umožní cílenou léčbu včetně antibiotické terapie.

V klinické studii byla základní diferenciální diagnostika mezi aseptickým uvolněním a IKN obohacena o prodlouženou kultivaci více vzorků tkání a vyšetření sonikátu. Bylo dosaženo získání spektra patogenů chronické IKN a jejich citlivosti k antibiotikům. I přes dobré výsledky je třeba dále pracovat na optimalizaci diagnostického procesu, zejména v případech low-grade IKN s větším zapojením výše uvedených moderních diagnostických metod.

Zjištění, že 96,4 % patogenů chronické IKN bylo citlivých ke kombinaci vankomycinu a gentamicinu, do určité míry zvyšuje důvod zabývání se lokálními nosiči antibiotik pro možnost více indikovat jednodobou reimplantaci u TEP na téměř nutnost. Neboť jak již bylo uvedeno, celkové podávání glykopeptidů a aminoglykosidů je v klinické praxi velmi nebezpečné kvůli vysokému riziku nefrotoxicity a ototoxicity i přes pečlivý monitoring hladin antibiotik v séru. I přes řadu vědeckých prací na toto téma *International Consensus Meeting on Musculoskeletal Infection 2018* deklaruje, že není dostatek dat

o lokální antibiotické léčbě. Zjištění experimentální studie, že nejlepší výsledky ohledně farmakokinetiky a vlivu na mezenchymální kmenové buňky byly vyhodnoceny u alogenní spongiózní kosti impregnované těmito antibiotiky, je sice slibné, ale stále se jedná o studii *in vitro* a je třeba ve výzkumu pokračovat.

7. Použitá literatura

1. AGGARWAL, VK., TISCHLER, E., GHANEM, E. et al. Leukocyte esterase from synovial fluid aspirate: a technical note. *J Arthroplasty*, 2013, vol. 28, p. 193–195.
2. ALI, F., WILKINSON, JM., COOPER, JR. et al. Accuracy of joint aspiration for the preoperative diagnosis of infection in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*, 2006, vol. 21, p. 221–226.
3. ALIJANIPOUR, P., BAKHSHI, H., PARVIZI, J. Diagnosis of periprosthetic joint infection: the threshold for serological markers. *Clin Orthop Relat Res*, 2013, vol. 471, p. 3186–3195.
4. ANAGNOSTAKOS, K., KELM, J. Enhancement of antibiotic elution from acrylic bone cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009, vol. 90-B, p.467–475.
5. ANAGNOSTAKOS, K., SCHRÖDER, K. Antibiotic-impregnated bone grafts in orthopaedic and trauma surgery: a systematic review of the literature. *Int J Biomater*, 2012, p. 1–9.
6. ANAGNOSTAKOS, K., WILMES, P., SCHMITT, E. et al. Elution of gentamicin and vancomycin from polymethylmethacrylate beads and hip spacers in vivo. *Acta Orthopaedica*, 2009, vol. 80, p. 193-197.
7. ANSAR, W., GHOSH, S. C-reactive protein and the biology of disease. *Immunol Res*, 2013, vol. 56, p. 131-142.
8. ATKINS, BL., ATHANASOU, N., DEEKS, JJ. et al. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol*, 1998, vol. 36, p. 2932-2939.
9. BAUDOUX, P., BLES, N., LEMAIRE, S., et al. Combined effect of pH and concentration on the activities of gentamicin and oxacillin against *Staphylococcus aureus* in pharmacodynamic models of extracellular and intracellular infections. *J Antimicrob Chemother*, 2007, vol. 59, p. 246-253.

10. BAUER, TW., PARVIZI, J., KOBAYASHI, N. et al. Diagnosis of periprosthetic infection. *J Bone Joint Surg Am*, 2006, vol. 88, p. 869-882.
11. BERBARI, E., MABRY, T., TSARAS, G. et al. Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection. *J Bone Joint Surg Am*, 2010, vol. 92, p. 2102–2109.
12. BESSER, J., CARLETON, HA., GERNER-SMIDT, P. et al. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect*, 2018, vol. 24(4), p. 335–341.
13. BEVERIDGE, TJ., MAKIN, SA., KADURUGAMUWA, JL. et al. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, vol. 20, p. 291-303.
14. BONANZINGA, T., ZAHAR, A., DÜTSCH, M. et al. How reliable is the alpha-defensin immunoassay test for diagnosing periprosthetic joint infection? A prospective study. *Clin Orthop Relat Res*, 2016, vol. 475, p. 408-415.
15. BOO, G-JA., GRIJPMAN, DW., MORIARTY, TF., et al. Antimicrobial delivery systems for local infection prophylaxis in orthopedic- and trauma surgery. *Biomaterials*, 2015, vol. 52, p. 113–125.
16. BORMANN, N., SCHWABE, P., SMITH, MD., et al. Analysis of parameters influencing the release of antibiotics mixed with bone grafting material using a reliable mixing procedure. *Bone*, 2014, vol. 59, p. 162–172.
17. BOTTLNER, F., WEGNER, A., WINKELMANN, W. et al. Interleukin-6, procalcitonin and TNF-alpha: markers of peri-prosthetic infection following total joint replacement. *J Bone Joint Surg Br*, 2007, vol. 89, p. 94–99.
18. BROWN, MR., GILBERT, P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol*, 1993, vol. 74 Suppl, p. 87S-97S.
19. CHARLESON, ME., POMPEI, P., ALES, KL. et al. A new method of classification of prognostic comorbidity for longitudinal studies: development and validation. *J Chron Dis*, 1987, vol. 40, p. 373-383.
20. CHRISTENSEN, GD., SIMPSON, WA., YOUNGER, JJ. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative

- model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*, 1985, vol. 22, p. 996–1006.
21. CÖR, A. Histological analysis of periprosthetic tissue dor detecting prosthetic joint infection. In *Infected total joint arthroplasty*, TREBŠE, R. (Ed.), 1st ed., Springer-Verlag London, 2012, p. 159-164.
 22. CORACA-HUBER, D., HAUSDORFER, J., FILLE, M. et al. Calcium carbonate powder containing gentamicin for mixing with bone grafts. *Orthopedics*, 2014, vol. 37, p. e669–e672.
 23. CORNU, O., BANSE, X., DOCQUIER, PL. et al. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on the mechanical properties of human cancellous bone. *J Orthop Res*, 2000, vol. 18, p. 426–431.
 24. COSTERTON, JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res*, 2005, vol. 437, p. 7-11.
 25. COVENTRY, MB. Treatment of infections occuring in total hip surgery. *Orthop Clin North Am*, 1975, vol. 6, p. 991-1003.
 26. CUNNINGHAM, DJ., KAVOLUS, JJ., BOLOGNESI, MP. Specific infectious organisms associated with poor outcomes in treatment for hip periprosthetic infection. *J Arthroplasty*, 2017, vol. 32, p. 1984-1990.
 27. DELLA VALLE, C., PARVIZI, J., BAUER, TW. et al. Diagnosis of periprosthetic joint infections of the hip and knee. *J Am Acad Orthop Surg*, 2010, vol. 18, p. 760–770.
 28. De LEE, JG., CHARNLEY, J. Radiological demarcation of cemented sockets in total hip replacement. *Clin Orthop Rel Res*, 1976, vol. 121, p. 20-32.
 29. DEIRMENGIAN, CA., CITRANO, PA., GULATI, S. et al. The C-reactive protein may not detect infections caused by less-virulent organisms. *J Arthroplast.*, 2016, vol. 31(Suppl), p. 152-155.
 30. De VECCHI, E., VILLA, F., BORTOLIN, M. et al. Leucocyte esterase, glucose and C-reactive protein in the diagnosis of prosthetic joint infections: a prospective study. *Clin Microbiol Infect*, 2016, vol. 22, p. 555–560.

31. DEIRMENGIAN, CA., CITRANO, PA., GULATI, S. et al. The C-reactive protein may not detect infections caused by less-virulent organisms. *J Arthroplast.*, 2016, vol. 31(Suppl), p. 152-155.
32. Di CESARE, PE., CHANG, E., PRESTON, CF. et al. Serum interleukin-6 as a marker of periprosthetic infection following total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*, 2005, vol. 87, p. 1921–1927.
33. DONLAN, RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 2002, vol. 8, p. 881–890.
34. DRAGO, L., De VECCHI, E. Microbiological diagnosis of implant related infections. In: *A modern approach to biofilm related orthopaedic implant infections*. DRAGO, L. (Ed.), Springer. 2017, p. 51–68.
35. EDIN, ML., MICLAU, T., LESTER, GE., et al. Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro. *Clin Orthop Relat Res*, 1996, vol. 333, p. 245-251.
36. ENGESAETER, L., LIE, SA., ESPEHAUG, B., et al. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty Effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian arthroplasty register. *Acta Orthop*, 2003, vol. 74, p. 644–651.
37. ERIVAN, R., VILLATTE, G., EYMOND, G., et al. Usefulness of sonication for diagnosing infection in explanted orthopaedic implants. *Orthop Traum Surg Res*, 2018, vol. 104, p. 433-438.
38. ESTEBAN, J., ALVAREZ-ALVAREZ, B., BLANCO, A., et al. Prolonged incubation time does not increase sensitivity for the diagnosis of implant-related infection using samples prepared by sonication of the implants. *Bone Joint J*, 2013, vol. 95-B, p. 1001–6.
39. ESPOSITO, S., LEONE, S. Prosthetic joint infections: microbiology, diagnosis, management and prevention. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, vol. 32, p. 287-293.
40. ETTINGER, M., CALLIESS, T., KIELSTEIN, JT. et al. Circulating biomarkers for discrimination between aseptic joint failure, low-grade

- infection, and high-grade septic failure. *Clin Infect Dis*, 2015, vol. 61, p. 332–341.
41. EWALD, FC. The Knee Society total knee arthroplasty roentgenographic evaluation and scoring system. *Clin Orthop Relat Res*, 1989, vol. 248, p. 9–12.
 42. FERNÁNDEZ-SAMPEDRO, M., FARIÑAS-ALVAREZ, C., GARCES-ZARZALEJO, C., et al. Accuracy of different diagnostic tests for early, delayed and late prosthetic joint infection. *BMC Infect Dis*, 2017, vol. 17, p. 592.
 43. FILLEROVA, R., GALLO, J., RADVANSKY, M. et al. Excellent diagnostic characteristics for ultrafast gene profiling of DEFA1-IL1B-LTF in detection of prosthetic joint infections. *J Clin Microbiol*, 2017, vol. 55, p. 2686–2697.
 44. FITZGERALD, RH Jr., NOLAN, DR., ILSTRUP, DM. et al. Deep wound sepsis following total hip arthroplasty. *J Bone Jt Surg Am*, 1977, vol. 59, p. 847-855.
 45. FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998, vol. 45, p. 113–136.
 46. FROMMELT, L. Use of antibiotics in bones: Prophylaxis and current treatment standards. *Orthopade*, 2018, vol. 47, p. 24-29.
 47. GALLO, J., KOLAR, M., DENDIS, M. et al. Culture and PCR analysis of joint fluid in the diagnosis of prosthetic joint infection. *New Microbiol*, 2008, vol. 31, p. 97–104.
 48. GEHRKE, T., LAUSMANN, C., CITAK, M. et al. The accuracy of the alpha defensin lateral flow device for diagnosis of periprosthetic joint infection: comparison with a gold standard. *J Bone Joint Surg Am*, 2018, vol. 100, p.42–48.
 49. GOMEZ-BARRENA, E., ESTEBAN, J., MEDEL, F., et al. Bacterial adherence to separated modular components in joint prosthesis: a clinical study. *J Orthop Res*, 2012, vol. 30, p. 1634–1639.
 50. GRUEN, TA., McNEICE, GM., AMSTUTZ, HC. “Modes of Failure” of cemented stem-type femoral components. A radiographic analysis of loosening. *Clin Orthop Relat Res*, 1979, vol. 141, p. 17–27.

51. HARRIS, LG., EL-BOURI, K., JOHNSTON, S. et al. Rapid identification of staphylococci from prosthetic joint infections using MALDI-TOF mass-spectrometry. *Int J Artif Organs*, 2010, vol. 33(9), p. 568-574.
52. HEIM, CE., VIDLAK, D., SCHERR, TD., et al. IL-12 promotes myeloid-derived suppressor cell recruitment and bacterial persistence during Staphylococcus aureus orthopedic implant infection. *J Immunol*, 2015, vol. 194, p. 3861-3872.
53. HOLINKA, J., BAUER, L., HIRSCHL, AM. et al. Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection. *J Orthop Res*, 2011, vol. 29, p. 617–622.
54. HOLINKA, J., PILZ, M., HIRSCHL, AM., et al. Differential bacterial load on components of total knee prosthesis in patients with prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs*, 2012, vol. 35, p. 735–741.
55. HUERFANO, E., BAUTISTA, M., HUERFANO, M. et al. Screening for infection before revision hip arthroplasty: a meta-analysis of likelihood ratios of erythrocyte sedimentation rate and serum c-reactive protein levels. *J Am Acad Orthop Surg*, 2017, vol. 25, p. 809–817.
56. HYŠPLER, R., TICHÁ, A., SVOBODOVÁ, I. et al. Spektrofotometrická metoda stanovení D-laktátu v krevní plazmě a moči. *Klin. Biochem. Metab.*, 2015, vol. 23 (44), p. 193–197.
57. INCE, A., SCHUTZE, N., KARL, N., et al. Gentamicin negatively influenced osteogenic function in vitro. *Int Orthop*, 2007, vol. 31, p. 223-228.
58. ISEFUKU, S., JOYNER, CJ., SIMPSON, AH. Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis. *J Orthop Trauma*, 2003, vol. 17, p. 212-216.
59. JAMAR, F., BUSCOMBE, J., CHITI, A. et al. EANM/SNMMI guideline for 18F-FDG use in inflammation and infection. *J Nucl Med*, 2013, vol. 54, p. 647–658.
60. KAPADIA, BH., BERG, RA., DALEY, JA. Periprosthetic joint infection. *Lancet*, 2016, vol. 387, p. 386–394.

61. KARBYSHEVA, S., YERMAK, K., GRIGORICHEVA, L. et al. Synovial fluid D-lactate for the diagnosis of periprosthetic joint infection and evaluation of treatment success. *Orthopaedic Proceedings*, 2017, vol. 99-B (SUPP 22), p. 100.
62. KELBICH, P., HEJČL, A., STANĚK, I. et al. Principles of the cytological-energy analysis of the extravascular body fluids. *Biochem Mol Biol J*, 2017, vol. 3(1), p. 6.
63. KEMPTHORNE, JT., AILABOUNI, R., RANIGA, S. et al. Occult infection in aseptic joint loosening and the diagnostic role of implant sonication. *BioMed Research International*, 2015, 946215.
Dostupné z <http://doi.org/10.1155/2015/946215> 29.8.2018.
64. KETONIS, C., BARR, S., ADAMS, CS., et al. Vancomycin bonded to boe grafts prevents bacterial colonization. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, vol. 55, p. 487-494.
65. KLEPLOVÁ, T., SOUKUP, T., ŘEHÁČEK, V. et al. Human dental pulp stem cells isolation and long term cultivation. *Acta Med Austriaca*, 2007, vol. 50, p. 195–201.
66. KHEIR, MM., TAN, TL., HIGUERA, C., et al. Periprosthetic joint infections caused by enterococci have poor outcomes. *J Arthroplasty*, 2017, vol. 32, p. 933-947.
67. KUEHN, KD., EGE, W., GOPP, U. Acrylic bone cements: composition and properties. *Orthop Clin North Am*, 2005, vol. 36, p. 17–28.
68. KUEHN, KD., RENZ, N., TRAMPUZ, A. Local antibiotic therapy. *Unfallchirurg*, 2017, vol. 120, p. 561-572.
69. KWEE, RM., BROOS, WA., BRANS, B. et al. Added value of 18F-FDG PET/CT in diagnosing infected hip prosthesis. *Acta Radiol Stockh Swed*, 2018, vol. 59, p. 569–576.
70. LANDOR, I., VAVŘÍK, P., GALLO, J. et al. Revizní operace totálních náhrad kyčelního kloubu. *Maxdorf*. Praha, 2012.

71. LASS, R., GIUREA, A., KUBISTA, B. et al. Bacterial adherence to different components of total hip prosthesis in patients with prosthetic joint infection. *Int Orthop*, 2014, vol. 38, p. 1597–1602.
72. LE, KY, DASTGHEYB, S., HO, TV. et al. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014, vol. 4, p. 167.
73. LEOPOLD, SS., BATTISTA, V., OLIVERIO, JA. Safety and efficacy of intraarticular hip injection using anatomic landmarks. *Clin Orthop Relat Res*, 2001, vol. 391, p. 192–197.
74. LEWIS, G., JANNA, S. The *in vitro* elution of gentamicin sulfate from a commercially available gentamicin-loaded acrylic bone cement, versabond (TM) AB. *J Biomed Mater Res*, 2004, vol. 71-B, p. 77–83.
75. LEWIS, CS., SUPRONOWICZ, PR., ZHUKAUSKAS, RM., et al. Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix. *Cell Tissue Bank*, 2011, vol. 13, p. 119–127.
76. LIU, H., ZHANG, Y., LI, L. et al. The application of sonication in diagnosis of periprosthetic joint infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017, vol. 36, p. 1-9.
77. MALANDAIN, D., BEMER, P., LEROY, AG., et al. Assessment of the automated multiplex-PCR Unyvero i60 ITI® cartridge system to diagnose prosthetic joint infection: a multicentre study. *Clin Microbiol Infect*, 2018, vol 24, p. 83.e1 – 83.e6.
78. McARTHUR, BA., ABDEL, MP., TAUNTON, MJ. et al. Seronegative infections in hip and knee arthroplasty: periprosthetic infections with normal erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein level. *Bone Joint J*, 2015, vol. 97-B, p. 939-944.
79. McPHERSON, EJ., WOODSON, C., HOLTOM, P. et al. Periprosthetic total hip infection: outcomes using a staging system. *Clin Orthop Relat Res*, 2002, vol. 403, p. 8-15.

80. MELICHERČÍK, P., JAHODA, D., BARTÁK, V., et al. Monitoring vankomycinu uvolňovaného z kostních štěpů v pokuse *in vitro*. *Acta Chir Orthop Traum Čech*, 2010, vol. 77, p. 411-415.
81. MEYER, J., PILLER, G., SPIEGEL, CA. et al. Vacuum-mixing significantly changes antibiotic elution characteristics of commercially available antibiotic-impregnated bone cements. *J Bone Joint Surg*, 2011, vol. 93-A, p. 2049–2056.
82. MILLER, TT. Imaging of hip arthroplasty. *Seminars in musculoskeletal radiology*, 2006, vol. 10, p. 30-46.
83. MONSEN, T., LÖVGREN, E., WIDESTRÖM, M., et al. In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. *J Clin Microb*, 2009, vol. 47, p. 2496–2501.
84. MORAWIETZ, L., CLASSEN, RA., SCHRODER, JH. et al. Proposal of histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol*, 2006, vol. 59, p. 591-597.
85. MÜHLHOFER, HML., POHLING, F., KANZ, KG. et al. Prosthetic joint infection development of an evidence-based diagnostic algorithm. *Eur J Med Res*, 2017, vol. 22, p. 8.
86. NAMBA, R S., INACIO, M C S., PAXTON, EW. Risk factors associated with surgical site infection in 30 491 primary total hip replacements. *J Bone Jt Surg Br*, 2012, vol. 94, p. 1330–1338.
87. NEUT, D. Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimicrob Chemother*, 2001, vol. 47, p. 885–891.
88. ONG, KL., KURTZ, SM., LAU, E. et al. Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the medicare population. *J Arthroplasty*, 2009, vol. 24 (supplement 6), p. 105–109.
89. OSMON, DR, BERBARI, EF, BERENDT, AR., et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 2013, vol. 56, p. e1-e25.

90. OUYANG, Z., LI, H., LIU, X. et al. Prosthesis infection: diagnosis after total joint arthroplasty with three-phase bone scintigraphy. *Ann Nucl Med*, 2014, vol. 28, p. 994–1003.
91. PARTRIDGE, DG., WINNARD, C., TOWNSEND, R. et al. Joint aspiration, including culture of reaspirated saline after a 'dry tap', is sensitive and specific for the diagnosis of hip and knee prosthetic joint infection. *Bone Joint J*, 2018, vol. 100-B, p. 749-754.
92. PARVIZI, J., GEHRKE, T. International consensus on periprosthetic joint infection: let cumulative wisdom be a guide. *J Bone Joint Surg*, 2014, vol. 96, p. 441.
93. PARVIZI, J., GEHRKE, T., CHEN, AF. Proceedings of the International consensus on periprosthetic joint infection. *Bone Joint J*, 2013, vol. 95-B, p. 450-1452.
94. PARVIZI, J., MCKENZIE, JC., CASHMAN, JP. Diagnosis of periprosthetic joint infection using synovial C-reactive protein. *J Arthroplasty*, 2012, vol. 27(Suppl), p. 12–16.
95. PARVIZI, J., TAN, TL., GOSWAMI, K. et al. The 2018 definition of periprosthetic hip and knee infection: an evidence-based and validated criteria. *J Arthroplasty*. 2018, vol. 33, p. 1309-1314.
96. PARVIZI, J., ZMISTOWSKI, B., BERBARI, EF., et al. New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the musculoskeletal infection society. *Clin Orthop*, 2011, vol. 469, p. 2992-2994.
97. PATEL, R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res*, 2005, vol. 437, p. 41-47.
98. PATEL, R., ALIJANIPOUR, P., PARVIZI, J. Advancements in diagnosing periprosthetic joint infections after total hip and knee arthroplasty. *Open Orthop J*, 2016, vol. 10, (Suppl-2, M8), p. 654-661.
99. PILNÁČEK, J., BÉBROVÁ, E. Problémy v přístupu k infikované TEP a mikrobiologická diagnostika infikované TEP – sonikace. *Ortopedie*, 2011, č. 4, s. 162-168.

100. PORTILLO, ME., CORVEC, S., BORENS, O. et al. *Propionibacterium acnes*: An underestimated pathogen in implant-associated infections. *BioMed Research International*, 2013, 804391.
Dostupné z <http://doi.org/10.1155/2013/804391> 28.7.2018.
101. PORTILLO, ME., SALVADÓ, M., ALIER, A. et al. Advantages of sonication fluid culture for the diagnosis of prosthetic joint infection. *J Infect*, 2014, vol. 69, p. 35–41.
102. PORTILLO, ME, SALVADÓ, M., TRAMPUZ, A. et al. Improved diagnosis of orthopedic implant-associated infection by inoculation of sonication fluid into blood culture bottles. *J Clin Microb*, 2015, vol. 53, p. 1622-1627.
103. POWLES, JW., SPENCER, RF., LOVERING, AM. Gentamicin release from old cement during revision hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg*, 1998, vol. 80-A, p. 607–610.
104. PROCHÁZKA, E., SOUKUP, T., HROCH, M. et al. Methotrexate released in vitro from bone cement inhibits human stem cell proliferation in S/G2 phase. *Int Orthop*, 2009, vol. 4, p. 137–42.
105. PROČEK, T., RYŠKOVÁ, L., KUČERA, T. et al. Evaluation of the importance of a ready-made, gentamicin-impregnated spacer in relation to bacteriological findings in patients with periprosthetic joint infections. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.*, 2014, vol. 63, p. 142-8.
106. PUIG-VERDIÉ, L., ALENTORN-GELI, E, GONZÁLES-CUEVAS, A. et al. Implant sonication increases the diagnostic accuracy of infection in patients with delayed, but not early, orthopaedic implant failure. *Bone Joint J*, 2013, vol. 95-B, p. 244-2409.
107. RAK, M., KAVC IC, M., TREBSE, R. et al. Detection of bacteria with molecular methods in prosthetic joint infection: sonication fluid better than periprosthetic tissue. *Acta Orthopaedica*, 2016, vol. 87, p. 339–345.
108. RATHBONE, CR., CROSS, JD., BROWN, KV. et al. Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity. *J Orthop Res*, 2011, vol. 29, p. 1070–1074.

109. RENZ, N., FEIHL, S., CABRIC, S. et al. Performance of automated multiplex PCR using sonication fluid for diagnosis of periprosthetic joint infection: a prospective cohort. *Infection*, 2017, vol. 45, p. 877–884.
110. REYES, M., LUND, T., LENVIK, T. et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 2001, vol. 98, p. 2615–25.
111. SALEH, A., GEORGE, J., FAOUR, M. et al. Serum biomarkers in periprosthetic joint infections. *Bone and Joint Research*, 2018, vol. 7, p. 85–93.
112. SALEH, K., OLSON, M., RESIG, S. et al. Predictors of wound infection in hip and knee joint replacement: results from a 20 year surveillance program. *J Orthop Res*, 2002, vol. 20, p. 506–515.
113. SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, vol. 74(12), p. 5463–7.
114. SCHÄFER, P., FINK, B., SANDOW, D. et al. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis*, 2008, vol. 47, p. 1403–9.
115. SCHMALZRIED, TP., AMSTUTZ, HC, AU, MK. et al. Etiology of deep sepsis in total hip arthroplasty. The significance of hematogenous and recurrent infections. *Clin Orthop Relat Res*, 1992, vol. 280, p. 200–207.
116. SCORZOLINI, L., LICHTNER, M., IANNETTA, M. et al., Sonication technique improves microbiological diagnosis in patients treated with antibiotics before surgery for prosthetic joint infections. *New Microb*, 2014, vol. 37, p. 321–328.
117. SHAHI, A., KHEIR, MM., TARABICHI, M. et al. Serum d–dimer test is promising for the diagnosis of periprosthetic joint infection and timing of reimplantation. *J Bone Joint Surg Am*, 2017, vol. 99, p. 1419–1427.
118. SPANGEHL, MJ., MASRI, BA., O’CONNEL, JX. et al. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection

- at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am*, 1999, vol. 81, p. 672-683.
119. STALLMANN, HP., FABER, C., BRONCKERS, ALJJ. et al. *In vitro* gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile. *BMC Musculoskelet Disord*, 2006, vol. 7, p. 18.
 120. STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC I. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 2000, vol. 40, p. 175-179.
 121. STUMPE, KDM., NÖTZLI, HP., ZANETTI, M. et al. FDG PET for differentiation of infection and aseptic loosening in total hip replacements: comparison with conventional radiography and three-phase bone scintigraphy. *Radiology*, 2004, vol. 231, p. 333-341.
 122. SUCHÁNEK, J., SOUKUP, T., VÍŠEK, B. et al. Dental pulp stem cells and their characterization. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2009, vol. 153, p. 31-35.
 123. SUEN, K., KEEKA, M., AILABOUNI, R., et al. Synovasure 'quick test' is not as accurate as the laboratory-based α -defensin immunoassay: a systematic review and meta-analysis. *Bone Joint J*, 2018, vol. 100-B(1), p. 66-72.
 124. TANDE, AJ., PATEL, R. Prosthetic joint infection. *Clin. Microb. Rev*, 2014, vol. 27, p. 302-345.
 125. TERMAAT, MF., RAIJMAKERS, PG., SCHOLTEN, HJ. et al. The accuracy of diagnostic imaging for the assessment of chronic osteomyelitis: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg*, 2005, vol 87, p. 2464-2471.
 126. TETREAULT, MW., WETTERS, NG., AGGARWAL, VK. et al. Should draining wounds and sinuses associated with hip and knee arthroplasties be cultured? *J Arthroplasty*, 2013, vol. 28, p. 133-136.
 127. TIBREWAL, S., MALAGELADA, F., JEYASEELAN, L. et al. Single-stage revision for the infected total knee replacement: results from a single centre. *Bone Joint J*, 2014, vol. 96-B, p. 759-764.

128. TIGGES, S., STILES, RG., ROBERSON, JR. Appearance of septic hip prostheses on plain radiographs. *AJRAm J Roentgenol*, 1994, vol. 163, p. 377-380.
129. TOMS, AD., DAVIDSON, D., MASRI, BA. et al. The management of periprosthetic infection in total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br.*, 2006, vol. 88, p. 149-155.
130. TRAMPUZ, A., PIPER, KE., HANSSEN, AD. et al. Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination. *J Clin Microbiol*, 2006, vol. 44, p. 628–631.
131. TRAMPUZ, A., PIPER, KE., JACOBSON, MJ. et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*, 2007, vol. 357, p. 654-663.
132. TRIANTAFYLLOPOULOS, G., STUNDNER, O., MEMTSOUDIS, S. et al. Patient, surgery, and hospital related risk factors for surgical site infections following total hip rthroplasty. *The Scientific World Journal*, 2015, vol. 2015:979560. doi:10.1155/2015/979560.
Dostupné z <http://doi.org/10.1155/2015/979560> , 28.7.2018.
133. TSUKAYAMA, DT., ESTRADA, R., GUSTILO, RB. Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. *J Bone Join Surg Am*, 1996, vol. 78, p. 512-523.
134. TUNNEY, MM., PATRICK, S., GORMAN, SP. et al. Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg*, 1998, vol. 80-Br, p. 568–572.
135. VAN DIEK, FM., ALBERS, CGM., VAN HOOFF, ML. et al. Low sensitivity of implant sonication when screening for infection in revision surgery. *Acta Orthopaedica*, 2017, vol. 88, p. 294–299.
136. VERDARA, A., FERNÁNDEZ-PITTOL, MJ., MUNOZ-MAHAMUD, E. et al. Evaluation of lipocalin-2 as a biomarker of periprosthetic joint infection. *J Arthroplasty*, 2019, vol. 34(1), p. 123-125.

137. VIDLAK, D., KIELIAN, T. Infectious dose dictates the host response during staphylococcus aureus orthopedic-implant biofilm infection. *Infection and Immunity*, 2016, vol. 84, p. 1957-1965.
138. WINKLER, H. *In vitro* release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts. *J Antimicrob Chemother*, 2000, vol. 46, p. 423–428.
139. WINKLER, H., HEIDEN, P. Allograft bone as antibiotic carrier. *J Bone Joint Infect*, 2017, vol. 2, p. 52-62.
140. WINKLER, H., STOIBER, A., KAUDELA, K. et al. One stage uncemented revision of infected total hip replacement using cancellous allograft bone impregnated with antibiotics. *J Bone Joint Surg*, 2008, vol. 90-B, p. 1580–1584.
141. WITSO, E., PERSEN, L., LOSETH, K., et al. Cancellous bone as an antibiotic carrier. *Acta Orthop Scand*, 2000, vol. 71, p. 80-84.
142. WOUTHUYZEN-BAKKER, M., PLOEGMAKERS, JJW., OTTINK, K. et al. Synovial calprotectin: An inexpensive biomarker to exclude a chronic prosthetic joint infection. *J Arthroplasty*, 2018, vol. 33(4), p. 1149-1153.
143. WYATT, MC., BESWICK, AD., KUNUTSOR, SK. et al. The alphadefensin immunoassay and leukocyte esterase colorimetric strip test for the diagnosis of periprosthetic infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am*, 2016, vol. 98, p. 992–1000.
144. XIE, K., DAI, K., QU, X. et al. Serum and synovial fluid interleukin–6 for the diagnosis of periprosthetic joint infection. *Sci Rep*, 2017, vol. 7, p. 1496.
145. XIE, K., QU, X., YAN, M. Procalcitonin and α -defensin for diagnosis of periprosthetic joint infections. *J Arthroplasty*, 2017, vol. 32, p. 1387–1394.
146. XU, KD, McFETERS, GA., STEWART, PS. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology*, 2000, vol. 146, p. 547-549.
147. YEE, DKH., CHIU, KY., YAN, CH. et al. Review article: Joint aspiration for diagnosis of periprosthetic infection. *J Orthop Surg*, 2013, vol. 21, p. 236-240.

148. ZHAI, Z., LI, H., QIN, A. et al. Meta-analysis of sonication fluid samples from prosthetic components for diagnosis of infection after total joint arthroplasty. *J Clin Microbiol*, 2014, vol. 52, p. 1730–1736.
149. ZIMMERLI, W., OCHSNER, PE. Management of infection associated with prosthetic joints. *Infection*, 2003, vol. 31, p. 99-108.
150. ZMISTOWSKI, B., FEDORKA, B., SHEEHAN, E., et al. Prosthetic joint infection caused by gram-negative organisms. *J Arthroplasty*, 2011, vol. 26(Suppl), p. 104-108.