



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Detekce patogenů u infekcí kloubů včetně totálních  
endoprotéz metodou BioFire (Biomérieux)**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Lucie Štětínová

**Vedoucí práce:** MVDr. Petr Ježek

České Budějovice 2024

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Detekce patogenů u infekcí kloubů včetně totálních endoprotéz metodou BioFire (Biomérieux)*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

## **Poděkování**

Děkuji MVDr. Petru Ježkovi za jeho námět pro moji bakalářskou práci, za cenné rady při jejím vedení. Děkuji mu rovněž za jeho odborný dohled a věcné připomínky. Dík patří také firmě Biomérieux za poskytnutí panelu BioFire Joint Infection.

# **Detekce patogenů u infekcí kloubů včetně totálních endoprotéz metodou BioFire (Biomérieux)**

## **Abstrakt**

S prodlužující se délkou aktivního života dochází k nárůstu počtu provedených totálních endoprotéz kloubu. Díky tomu se navyšuje i incidence periprotetických infekcí, nejčastěji bakteriálního původu. Tyto infekce, společně s infekcemi nativních kloubů, vyžadují včasnou a precizní diagnostiku. Inovativní řešení nabízí metoda BioFire (Biomérieux, Francie), kterou si mělo možnost vyzkoušet OKMP Příbram v rámci mezinárodní studie.

V teoretické části této práce je pojednáno o infekčních onemocněních kloubů, jako jsou septická artritida, gonokoková artritida, lymeská artritida, periprotetická infekce etc. Jsou představeni nejvýznamnější původci infekcí kloubů a kloubních náhrad. Část je též věnována mikrobiologické diagnostice.

Praktická část práce je věnována detekci patogenů u infekcí kloubů včetně totálních endoprotéz metodou BioFire (Biomérieux, Francie). Je zde popsána klasická multiplexní PCR, FilmArray multiplexní PCR systém a s ním panel BioFire Joint Infection, jenž byl použit v analýze synoviální tekutiny u pacientů s podezřením na septickou artritidu, či periprotetickou infekci. Data získaná pomocí této metody jsou v praktické části též vyhodnocena. Sběr dat probíhal od března roku 2021 do června roku 2022. Zpracování získaných výsledků je jedním z cílů této práce. Dalším cílem této práce bylo seznámit se s problematikou infekcí kloubů, nabytí poznatků týkajících se původců onemocnění kloubů, seznámení se s metodou BioFire Joint Infection (Biomérieux, Francie) a zhodnocení její přínosu pro vyšetření klinických vzorků.

V diskuzi je zhodnoceno, zdali se liší výsledky metody BioFire (Biomérieux, Francie) od výsledků klasické kultivace a lze-li použít metodu BioFire (Biomérieux, Francie) v rutinním vyšetření infekce kloubů.

**Klíčová slova:** infekce kloubů; septická artritida; *Staphylococcus aureus*; biofilm; endoprotéza; kultivace; periprotetická infekce, PCR

# **Detection of pathogens in joint infections, including total endoprostheses using the BioFire method (Biomérieux)**

## **Abstract**

With an increase in the length of active life, the number of total joint replacements is increasing. This increases the incidence of periprosthetic infections, most often of bacterial origin. These infections, together with infections of the native joints, require timely and precise diagnosis. An innovative solution is offered by the BioFire method (Biomérieux, France), which OKMP Příbram had the opportunity to try out in the framework of an international study.

The theoretical part of this thesis deals with infectious diseases of joints, such as septic arthritis, gonococcal arthritis, Lyme arthritis, periprosthetic infections, etc. The most important causative agents of joint and joint replacement infections are presented. One part is also devoted to microbiological diagnostics.

The practical part of the thesis is devoted to detection of pathogens in joint infections including total joint replacements by the BioFire method (Biomérieux, France). It describes the classical multiplex PCR, FilmArray multiplex PCR system and the BioFire Joint Infection Panel, which has been used in the analysis of synovial fluid in patients with suspected septic arthritis or periprosthetic infection. The data obtained using this method are also evaluated in the practical part. The data acquisition was running from March 2021 to June 2022. The analysis of the obtained data is one of the aim of this thesis. Another aim of this thesis was to get acquainted with the problem of joint infections, to knowledge acquisition regarding the causative agents of joint diseases, to learn about the BioFire Joint Infection method (Biomérieux, France) and to evaluate its contribution to the testing of clinical samples.

In the discussion it is evaluated, whether the results of the BioFire method (Biomérieux, France) differ from those of conventional cultivation and whether the BioFire method (Biomérieux, France) can be used in the routine testing of joint infection.

**Keywords:** joint infection; septic arthritis; *Staphylococcus aureus*; biofilm; endoprosthesis; cultivation; periprosthetic infection, PCR

# Obsah

Úvod.....	8
1 Teoretická část .....	9
1.1 ANATOMIE A PATOANATOMIE KLOUBU .....	9
1.2 INFEKCE KLOUBŮ A KLOUBNÍCH NÁHRAD .....	9
1.2.1 <i>Septická artritida</i> .....	10
1.2.2 <i>Gonokoková artritida</i> .....	11
1.2.3 <i>Lymeská artritida</i> .....	12
1.2.4 <i>Periprotetická infekce</i> .....	14
1.2.5 <i>Reaktivní artritida</i> .....	15
1.2.6 <i>Tuberkulózní artritida</i> .....	16
1.2.7 <i>Septická bursitida</i> .....	17
1.3 STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA VÝZNAMNÝCH BAKTERIÁLNÍCH PŮVODCŮ KLOUBNÍCH INFEKČÍ .....	18
1.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
1.3.2 <i>Staphylococcus - koaguláza negativní kmeny</i> .....	20
1.3.3 <i>Streptococcus subspecies</i> .....	21
1.3.4 <i>Enterokoky</i> .....	23
1.3.5 <i>Escherichia coli</i> .....	23
1.3.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
1.4 MIKROBIOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA .....	26
1.4.1 <i>Druh materiálu a jeho zpracování</i> .....	26
1.4.2 <i>Hemokultura</i> .....	27
1.4.3 <i>Kloubní punktát</i> .....	28
1.4.4 <i>Kloubní komponenta</i> .....	29
1.4.5 <i>Stěr na gonokultivaci</i> .....	29
1.4.6 <i>Mikroskopie</i> .....	30
1.4.7 <i>Kultivace</i> .....	31
1.4.8 <i>Identifikace</i> .....	31
1.4.9 <i>MALDI-TOF</i> .....	32
1.4.10 <i>Určení citlivosti vůči antimikrobiálním látkám</i> .....	32
1.4.11 <i>PCR</i> .....	34
1.4.12 <i>Interpretace výsledků</i> .....	34
2 Cíl práce .....	35
3 Metodika výzkumu.....	36

3.1	MATERIÁL A METODY .....	36
3.1.1	<i>Popis metody- multiplex PCR .....</i>	36
3.1.2	<i>FilmArray multiplexní PCR systém .....</i>	37
3.1.3	<i>BioFire Joint Infection panel .....</i>	39
4	Výsledky .....	41
4.1.1	<i>Mikroorganismy detekované BJI panelem a kultivací .....</i>	42
5	Diskuze.....	44
6	Závěr .....	47
	Seznam použité literatury.....	48

## Úvod

Infekce kloubů a kloubních náhrad sice netvoří v klinické praxi početnou skupinu onemocnění, jedná se však o stavy závažné, mající svými důsledky vliv nejen na funkci kloubu samotného, nýbrž i na organismus coby celek. Pokud se tyto infekce včas nepodchytí a není zde odpovídající terapie, třeba právě proto, že se nám nedaří zachytit původce tohoto onemocnění, může dojít i k nevratným poškozením kloubu. Tyto infekce jsou vážným problémem jak z pohledu medicínského, tak pohledu ekonomického. Pakliže se bakterie způsobující infekci objeví ve formě biofilmu na povrchu umělé kloubní náhrady, je to velmi nepříjemná a obávaná komplikace, jenž se zřídka obejde bez nutnosti reoperace. Počet provedených náhrad kloubů je na vzestupu a tím se stává tato problematika velice aktuální, zasluhující pozornost. Řešení těchto infekcí musí být komplexní a je zde nezbytná mezioborová spolupráce ortopeda s klinickým mikrobiologem.

Etiologickým agens infekce jsou nejčastěji bakterie, méně pak viry a kvasinky. Tito původci se do prostoru kloubu mohou dostat různými způsoby a to jak přímo při poranění kloubu, či nepřímo, kdy se mikrob do kloubu dostane krevní cestou. Včasná a správná identifikace patogenů zodpovědných za infekci je pro volbu následné terapie zásadní. Kultivační metoda patří ke zlatému standartu mikrobiologie, má v mikrobiologii klíčový význam a je velice přesnou metodou při identifikaci mikrobů a následném stanovení mikroba k antimikrobiálním látkám. Její nevýhoda ovšem spočívá v poměrně značné časové náročnosti. Výsledky kultivační metody spolu s vyšetřením citlivosti k antimikrobiálním látkám jsou k dispozici v řádu dní.

Dynamicky se rozvíjející obor molekulární biologie nám však může nabídnout metody, jež postrádají onu časovou náročnost. Jednou z těchto metod je metoda FilmArray, systém multiplexní PCR pro rychlé a komplexní vyšetření. Panel Biofire Joint Infection (BioMérieux, Francie), který byl použit pro detekci patogenů kloubů a kloubních náhrad v této práci, nabízí oproti konvenčním metodám současnou detekci až 39 patogenů a markerů antimikrobiální rezistence v krátkém časovém intervalu. Jedná se o inovativní způsob detekce patogenů kloubů a kloubních náhrad. Žádný jiný dosavadně používaný postup nenabízí tak komplexní a rychlou diagnostiku. Nesmírně mě tedy těší, že Oblastní nemocnice Příbram měla díky snaze MVDr. Petra Ježka a MUDr. Radka Myslivce možnost si díky účasti na mezinárodní studii tuto metodu vyzkoušet a já jsem se mohla s touto metodou seznámit.



# 1 Teoretická část

## 1.1 ANATOMIE A PATOANATOMIE KLOUBU

Kloub je místem, v němž se pohyblivě pojí dvě či více kostí. Plochy kloubu jsou většinou kryty chrupavkou hyalinní, která je různé tloušťky. Kloub je zavzat do vazivového kloubního pouzdra, které je anatomicky tvořeno zevně membranou fibrosum – stratum fibrosum, jenž přechází do vnitřku kloubu jako membrana synovialis – stratum synoviale s vrstvou synoviálních buněk na povrchu. Tyto buňky produkují čirou tekutinu zvanou synovie, která má zásadní vliv na pohyblivost kloubů. (Čihák 2016) Synoviální tekutina obsahuje vysokomolekulární kyselinu hyaluronovou, díky níž dochází k vysoké lubrikaci, která je nutná k tomu, aby nedocházelo ke tření kloubních ploch. Změny v objemu a složení synovie ukazují na patologický proces probíhající v kloubu. (Freemont2012) Pokud se v kloubu a jeho okolí objeví lokální známky zánětu a to začervení (rubor), zvýšená teplota (calor), bolest (dolor) a poškození funkce (functio laesa) – zde tedy jako omezení pohyblivosti, můžeme uvažovat nad infekcí kloubů. (Rozsypal 2023)

## 1.2 INFEKCE KLOUBŮ A KLOUBNÍCH NÁHRAD

O tom, že infekce kloubů a kloubních náhrad je věcí závažnou, bylo zmíněno již v úvodu práce. Nebezpečí tkví v možné destrukci kloubní chrupavky. Možný je rovněž prostup infekce do okolních struktur, či v nejhorším případě až v její vyústění v SIRS či celkovou sepsi organismu. (Rozsypal 2023) Infekce může do kloubu vstoupit přímou cestou – ať už při operačních úkonech, úrazech, při nichž dojde k otevření dutiny kloubu a tedy možnému zavlečení infekce do kloubu. Druhou možností přímého vstupu infekce je šíření infekce per continuitatem, tedy prostupem infekce z okolních struktur. Nepřímá cesta vstupu je spojená s výskytem infekce na jiném místě v organismu, přičemž patogen se do kloubu dostane hematogenní cestou. Častým zdrojem těchto infekcí bývají abscesy, infekce plic, či infekce močových cest. (Hurych, Štícha 2020) Infekce nepostihují pouze tkáň nativní, nýbrž i povrchy implantátů užívaných v ortopedii a traumatologii. Tyto tzv. biomateriálové infekce se v posledním desetiletí dostávají do popředí zájmu odborníků. (Musil et al. 2022) Následující řádky poskytnou přehled těch nejvýznamnějších infekcí kloubů.

### 1.2.1 Septická artritida

Jedná se o zánětlivý proces, který je zapříčiněn zejména bakteriemi a objevuje se při traumatech či chirurgické intervenci v oblasti kloubu.<sup>(Mačák 2022)</sup> Do této skupiny patří úrazy kloubu, dále pak různé nitrokloubní injekční aplikace – obstríky, punkce, tak chirurgické výkony. Další cestou infekce kloubu je cesta hematogenní. Touto cestou se dostane bakterie při septické artritidě do kloubu nejčastěji. Septická artritida může vzniknout rovněž, pokud se bakterie dostane do kloubu z okolních tkání, jež jsou postiženy infekcí. Takovým místem může být například erysipel na bérce a postiženým kloubem pak bude kloub kolenní. U septické artritidy dochází většinou k postižení jednoho kloubu a to v 80-90% . Mluvíme zde tedy o monoartritidě. Polyartritida, tedy postižení více kloubů se u septické artritidy objevuje v 10-20% případů, zvláště u rizikových pacientů.<sup>(Musil et al. 2022)</sup> Rizikovými faktory jsou již dříve poškozené klouby a to zejména vlivem působení autoimunitního zánětu při revmatoidní artritidě. Takto změněné klouby jsou k infekci náchylnější. Mezi další rizikové faktory se řadí diabetes, věk nad 65 let, předchozí intraartikulární injekce, kožní infekce, kožní vředy, imunosuprese, či imunodeficienze a rizikové sexuální chování. U některých mikroorganismů, jako například u *S. aureus*, se objevuje tkáňový tropismus k synoviální tekutině a snadno se váže prostřednictvím svých specifických tkáňových faktorů na některé její složky jako je kyselina hyaluronová, či na kloubní kolagen a sialoprotein. Incidence tohoto onemocnění se pohybuje okolo 2 - 6 případů na 100 000 obyvatel.<sup>(Brush 2022; Momodu 2023)</sup>

*S. aureus* je považován za nejčastějšího původce septických artritid. Udává se, že je zodpovědný za 40-60% případů tohoto onemocnění. Následují streptokoky s 20-30% podílem, enterokoky s 10-20% podílem ze všech případů. U 10-20% případů zůstává původce neobjasněn. Faktorem, který má značný vliv na infekční agens, je věk. *S. aureus*, *Streptococcus sk. A* a *Enterobacter* jsou etiologickým agens v kterémkoliv věku, u dětí převládá *S. aureus*, vyskytuje se rovněž *Kingella kingae*, u sexuálně aktivních jedinců je to *Neisseria gonorrhoea*, která nezpůsobuje ovšem typický průběh septické artritidy. Bývá spojena s výskytem papul a postihuje více kloubů. Pro svůj odlišný průběh a projevy lišící se od negonokokových septických artritid bude tato artritida probrána samostatně. U starších osob je častým původcem negonokokové artritidy *S. aureus*, u diabetiků *Streptococcus skupiny B*. Pakliže je pacient drogově závislý a lze usuzovat na intravenózní aplikaci drog, je zde předpoklad infekce pseudomonádami, či infekce gramnegativními bakteriemi. Rod *Mycobacterium* je odpovědný za vznik

tuberkulózní artritida, spirochéta *Borrelia burgdorferi* je příčinou vzniku lymeské artritidy při rozsevu onemocnění lymeská borelióza. Neboť se jak tuberkulózní, tak lymeská artritida, odlišuje od ostatních septických artritid, budou i ony popsány samostatně. (Musil et al. 2022) Při podezření na septickou artritidu se opakovaně odebírá hemokultura. Ta bývá pozitivní v cca 40% případů. (Bajaj 2011) K mikrobiologickému vyšetření se rovněž odebírá punkrát z kloubů, je-li přítomem hnis, odesílá se rovněž k rozboru. Ze vzorku se zhotoví mikroskopický preparát a provede se kultivace jak aerobní, tak anaerobní, a to včetně určení citlivosti k antimikrobiálním látkám. Využívá se rovněž PCR vyšetření. (Hurych a Štícha 2020)

### 1.2.2 *Gonokoková artritida*

Ke vzniku gonokokové artritidy dochází při diseminaci gonokokové infekce a řadí se mezi běžné komplikace akutní kapavky, která je způsobena diplokokem *Neisseria gonorrhoea*. Gonorrhoea, též kapavka je vysoce nakažlivou infekcí, která se přenáší zejména sexuálním kontaktem. Možný je rovněž přenos transplacentárně. Jde o onemocnění s krátkou inkubační dobou pohybující se mezi 2 až 14 dny, postihující primárně epitel urogenitálního traktu. K uchycení na epitel a průniku do buněk bakterie využívá opacitního faktoru a fimbrií. *Neisseria* využívá také IgA 1 proteáz, které štěpí složky IgA, čímž znemožní jeho obrannou funkci. Dalším faktorem virulence je pro tohoto gonokoka LOS – lipooligosacharid, díky němuž uniká lýze komplementem a jeho lipidová složka slouží jako endotoxin. (Hurych a Štícha 2020; Li 2023; Zimová 2013)

Pokud dojde k diseminaci onemocnění díky hematogennímu šíření a onemocnění postihne pohybový aparát, můžeme projevy řadit do 2 klinických jednotek. První je lokalizovaná artritida, často postihující koleno, kyčel, méně často pak loket, či drobné klouby ruky. Tato artritida má náhlý začátek a projevuje se zarudnutím v místě kloubu se silnou bolestivostí. Druhou jednotku tvoří syndrom artritida-dermatitida, kdy se v 75% případů objevují zejména na trupu a končetinách léze jako pustuly, makuly, papuly, či buly, které často mizí bez léčby. Dále se objevuje i tendosynovitida, při které pacienti udávají zvýšenou citlivost podél šlach a šlachových pochev, bolestí při pohybu či při extenzi. Tento zánět šlach a šlachových pochev postihuje často prsty na ruce a nohou, zápěstí a kotníky. Artritida z tohoto komplexu se vyznačuje polyartralgií velkých i malých kloubů. Při tomto syndromu se vyskytují i celkové příznaky jako je horečka nebo zimnice. (Li 2013)

Diagnostika gonokokové artritidy vychází z přítomnosti typických klinických projevů gonorrhoei, anamnézy pacienta. Až u 80% nemocných gonokokovou artritidou je *Neisseria gonorrhoea* zachycena kultivačním vyšetřením kloubního punktátu. (Zimková 2013) Kloubní punktát lze rovněž vyšetřit na přítomnost DNA *Neisseria gonorrhoea* pomocí PCR. Pokud nezachytíme tohoto gonokoka kultivací kloubního punktátu, PCR výtěru z uretry, rekta, či faryngu poskytuje pozitivní výsledek. Vyšetřením ELISA je možné stanovit jak přímo antigen, tak protilátky. (Li 2013; Zimková 2013; Musil 2022) Diagnostika gonorrhoei ze stěru z cervixu, rekta, faryngu je rozvedena v části MIKROBIOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA.

### 1.2.3 Lymeská artritida

O lymeské artritidě hovoříme tehdy, dojde-li při časně a pozdní diseminaci onemocnění lymeská borelióza ke změnám na pohybovém aparátu. Klinicky se artritida projevuje bolestí svalů a kloubů, vzniká zánět kloubu, synovie reaguje tvorbou výpotku, kloubní pouzdro je zesíleno, objevuje se velká únava, horečky. Pro tuto artritidu je typický rovněž její cyklický průběh. Období klinických příznaků je střídáno obdobím remise, kdy není žádných zjevných známek zánětu. Artritida postihuje velké klouby, přičemž nejčastěji je postižen kloub kolenní, kdy dochází k masivní tvorbě výpotku. V případě chronické perzistentní infekce lymeské boreliózy může dojít k rozvoji chronické artritidy. K tomuto může dojít až roky po prodělání infekce lymeské boreliózy. Příčinou v tomto případě není pouze infekce samotná, nýbrž i imunopatologická reakce, která se v místě rozvíjí. (Bartůněk 2013)

Původcem onemocnění lymeská borelióza, jenž je podkladem pro vznik lymeské artritidy je gramnegativní striktně patogenní spirocheta rodu *Borrelia*, konkrétně komplex *Borrelia burgdorferi sensu lato*. (dále jen Bbsl) Tento komplex zahrnuje okolo 11 genospecíí, přičemž u nás se nejvíce vyskytuje *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*. Bbsl je přenášena klíšťaty rodu *Ixodes*, v jejichž střevě probíhá množení borelií. K přenosu na hostitele dochází po průniku borelií skrze střevní stěnu klíštěte do hemolymfy, s níž se dostanou až do slinných žláz klíštěte. Klíště se pak přisaje na člověka a prostřednictvím slin pak vylučuje borelie do místa přisátí. Po přisátí infikovaného klíštěte je v časném stadiu infekce v naprosté většině případů přítomna erythema migrans- začervenání pokožky s vybledlým středem. S délkou doby přisátí vzrůstá riziko vzniku infekce lymeskou boreliózou. Té rovněž napomáhá skutečnost, že přenosnost klíšťat boreliemi je vysoká. Pro perzistenci

infekce jako takové je zásadní existence rezervoárových organismů. Ti fungují coby dlouhodobý zdroj infekce. Rezervoárovým zvířetem pro borelie jsou hmyzožraví ptáci, hlodavci aj. Přenos mezi lidmi se dosud neprokázal. K přenosu infekce může dojít i prostřednictvím obsahu střev klíšťat a to skrze neporušenou kůži. Borrelióza se šíří tkání lymfogenně, k méně intenzivnímu šíření dochází i cestou hematogenní.<sup>(Bartůněk 2013; Krbková 2007)</sup>

Borelie disponuje mnohými mechanismy, jež napomáhají k rozvoji infekce. Díky variabilitě povrchových antigenů, kdy je borelie schopna změny struktury, může dojít k úniku před imunitní reakcí. Borelie vykazují tkáňový tropismus a to vůči kůži, podkoží, nervovému systému, srdci, kloubům a kosternímu svalstvu, což přispívá šíření do těchto orgánů a jejich osídlování boreliemi. V kloubu se borelie s velkou ochotou váží na proteoglykany – na chondroitin sulfát a keratansulfát. Dochází zde rovněž k pronikání buněk produkujících zánětlivé cytokiny, aktivují se synoviální buňky k produkci zánětlivých cytokinů, jako je TNF- $\alpha$ , či IL-1. Endoteliální buňky produkují i hydrolytické enzymy jako jsou proteinázy a kolegenázy. Díky působení těchto, nastává destrukce kloubní chrupavky. Pakliže není infekce léčena v této fázi antibiotiky, či pokud terapie selže, v kloubech dochází k přežívání a dalšímu množení borelií, které jsou zdrojem perzistující infekce, díky níž může docházet ke vzniku chronické artritidy, která je zapříčiněna i díky prolomení autotolerance k vlastním antigenům. Artritis je pak tedy charakteru autoimunitního.<sup>(Bartůněk 2013; Krbková 2007)</sup> K rozvoji chronické artritidy přispívá i přítomnost haplotypu HLA-DRB1\*0401. Po prodělání lymeské boreliózy se u malého procenta případů vyskytuje tzv. postboreliový syndrom, kdy postižení popisují velkou únavu omezující je v životě, poruchy paměti a nálad, bolest kloubů. Tento syndrom však nebyl dosud přesně definován a některými autory je zpochybňována spojitost těchto stavů s prodělanou lymeskou boreliózou.<sup>(Krbková 2007)</sup>

Pro diagnostiku lymeské artritidy je využíváno nepřímého průkazu a to vyšetřením séra a kloubního výpotku metodou ELISA, kdy stanovujeme antiborreliové protilátky třídy IgG, IgM. Při pozitivitě se provádí potvrzení metodou WESTERN BLOT. Vyšetření ELISA má své limity, mezi něž patří omezená specifita a falešná pozitivita díky promořenosti populace.<sup>(Bartůněk 2013; Krbková 2007)</sup> PCR vyšetření není při diagnostice lymeské artritidy běžnou praxí, ale může potvrdit podezření neboť záchyt přítomnosti boreliové DNA se udává v 60-85% případů této infekce.<sup>(Krbková 2007)</sup>

#### 1.2.4 Periprotetická infekce

Infekce je s jistotou nejvíce obávanou komplikací, se kterou se v oboru endoprotetiky můžeme setkat. Jde o komplikaci, která se vyskytuje u 1-2% provedených náhrad kloubů. Tato čísla jsou vztahována k primárním náhradám kloubu. Řešení těchto infekcí velmi často spočívá v nutnosti reoperace a odstranění implantátu, ošetření prostoru kloubu s provedením následné reimplantace. Životnost současných endoprotéz se udává mezi 15-20lety, ovšem je zde značný vliv nadměrného přetěžování kloubu, ať už je příčinou obezita pacienta, či pokud pacient nemírní při sportovních aktivitách. Díky všem těmto faktorům se snižuje doba, po níž implantát bude pacientovi sloužit. (Douša 2021; Dungal 2014; Izakovicova 2019) Jako alternativa léčby se nabízí debridement s ponecháním endoprotézy na svém místě, s použitím výplachů jod povidonem či pěnou s obsahem antimikrobiálních látek. Existují zde však kritéria pro stanovení právě tohoto způsobu léčby. Pakliže se nedodrží, může to mít neblahé důsledky pro pacienta. (Tomáš 2017)

Patogeneze tohoto onemocnění většinou spočívá v zanesení mikroorganismu do dutiny kloubu během operace. Infekce kůže, infekce žaludku a střev, rovněž také infekce dýchacích cest či močopohlavní soustavy bývají také fokusem infekce a tedy potenciálním zdrojem pro hematogenní rozšíření infekce do oblasti kloubu. Jako původci těchto infekcí jsou v největší míře identifikováni původci ze skupiny gram pozitivních koků, obzvláště stafylokoky, streptokoky. Z gramnegativních bakterií jsou to často pak *E. coli*, *Proteus ssp.* U pacientů se současným výskytem dvou či více chronických onemocnění bývají často izolovány streptokoky. Tyto jsou častým nálezem u infekcí, které vznikly hematogenní cestou. U rizikových pacientů je situace jiná a objevují se zde specifictí původci. Příkladem budiž *Mycobacterium tuberculosis*. Mezi fungálními etiologickými agens hraje prim *Candida species*, konkrétně *Candida albicans* – ta je původcem u 47% všech fungálních infekcí kloubních náhrad. (Musil et al. 2022)

Naprosto zásadní vlastností těchto mikrobů je schopnost tvořit biofilm. Biofilm je populace mikroorganismů, která za pomoci adheziv pevně přilnula k povrchu, zde k implantátu. Buňky jsou uloženy v 3D struktuře obsahující četné dutiny, které jsou spojeny kanálky. Tato struktura je vysoce hydratovaná díky vlastní produkci matrice složené z polysacharidů, proteinů, nukleových kyselin, či lipidů. Jednotlivé buňky mikroorganismu se nejdříve vyskytují v planktonické formě, po přichycení se promění v již zmíněnou strukturu. Tato změna je spjata s hlubokými změnami uvnitř buněk. U

buněk komplexu biofilmu pak dochází ke změně fenotypu. Bakterie v biofilmu vykazují 1000x vyšší odolnost vůči působení antibiotika, na které by v původní, planktonické, formě byly citlivé. (Izakovicova 2019; Schindler 2014)

Mikrobiologická diagnostika spočívá v punkci kloubu, která musí být ovšem provedena přísně asepticky. Punktát se odešle ke kultivaci, jak aerobní, tak anaerobní, spolu s určením citlivosti k antimikrobiálním látkám. Pokud máme podezření na infekci fungálního původu, užije se odpovídající půda a provede se stanovení citlivosti k antimykotikům. Vyňatý implantát se podrobí sonifikaci, při níž je citlivě odstraněn biofilm. Sonifikovaná kapalina je po centrifugaci kultivována na agarových plotnách. Pokud je kultivace vyjde jako negativní a sonifikovaná kapalina zůstane nezkalená, považuje se výsledek vyšetření za negativní. Tekutinu po sonifikaci lze také použít pro průkaz patogenu pomocí metody PCR. Toto vyšetření poskytuje vysokou jak senzitivitu, tak specifitu. Vyšetření poskytuje vysokou senzitivitu i specifitu i u pacientů užívajících antibiotika. (Musil et al. 2022; Laboratorní příručka OKMP)

### ***1.2.5 Reaktivní artritida***

Reaktivní artritida je zánětlivé onemocnění, které postihuje zejména klouby dolních končetin. Vzniku této artritidy předchází prodělání infekce urogenitálního, či gastrointestinálního traktu. Patogen se do kloubů dostává prostřednictvím infikovaných monocytů jako antigen či jako imunokomplex. Organismus na jeho přítomnost reaguje a to vznikem imunitně podmíněné artritidy. U nemocných dochází i k extraartikulárním změnám nejčastěji na oku, urogenitálním aparátu, sliznicích, kůži a srdci. Často dochází k tzv. Reitnerovu syndromu, kdy se u postižených reaktivní artritida vyskytuje triáda onemocnění- artritida, konjunktivitida a uretritida. Díky nejednotně používaným diagnostickým kritériím nelze jednoznačně vymezit, co reaktivní artritidou je a co nikoliv. Někteří autoři považují za reaktivní artritidy všechny nově vzniklé, imunitně zprostředkované artritidy, po jakékoliv infekci jakékoliv sliznice. Jiní autoři zařazují jako popud k vzniku této artritidy rovněž vakcíny, či některé léky jako je interferon alfa. Napříč všemi názory však panuje shoda, že patogen při reaktivní artritidě nenapadá mikrob primárně klouby. (Dejmková 2008)

Ke vzniku reaktivní artritidy často samotná prodělaná infekce nestačí a je nutno jisté predispozice a tou je přítomnost alely HLA-B27, která je spojována se zvýšením produkce prozánětlivých cytokinů, změnami autotolerance a autoreaktivity a celkově se vznikem nespecifických zánětlivých onemocnění. Reaktivní artritida vzniká v součinnosti

infekci působícího patogenu s pozitivním haplotypem HLA-B27, který je přítomen u 65-90 % nemocných. (Dejmková 2008) Reaktivní artritida valná část autorů řadí do dvou velkých jednotek a to na reaktivní artritidu enterickou a postchlamydiovou. Enterickou reaktivní artritidu způsobují nejčastěji bakterie *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Enteritidis*, *Paratyphi B a C*, *Campylobacter jejuni* a další. Původcem postchlamydiové reaktivní artritidy je *Chlamydia trachomatis*. Diagnostika reaktivní artritidy je často složitá a je vyřčená na základě klinických projevů a na podkladě anamnézy, v níž je zaznamenáno prodělání infekce gastrointestinální či urogenitální, neboť kultivace synovie z postiženého kloubu bývá negativní. Bakterie v kloubu být přítomné mohou, avšak mají často změněnou formu a vyskytují se zde v tzv. L-formě. V takové formě postrádají schopnost reprodukce a nelze je tedy podrobit kultivaci. V této formě mnohdy perzistují v těle dlouhou dobu, odolávají účinkům ATB a mohou být zdrojem pro opakované reinfekce. Neboť v těle jsou vyvinuty protilátky po předchozí infekci, je možné využít stanovení nepřímé, ELISA metodou. Ani ta se však v tomto případě neukazuje jako zvlášť přínosná, neboť je zde omezená senzitivita i specifita vyšetření. U vyšetření na protilátky *Chlamydia trachomatis* se navíc vyskytuje zkřížená reakce s *Chlamydia pneumoniae*. *Chlamydia trachomatis* nejspolehlivěji odhalí realtime PCR. (Alušík 2022; Dejmková 2008; Chakraborty 2023)

### **1.2.6 Tuberkulózní artritida**

Tuberkulóza (TBC) postihuje mimoplicní tkáň zřídka, neboť její původce je organismus striktně aerobní a prostředí plic poskytuje mykobakteriím, coby původcům TBC, nejvhodnější podmínky k růstu a rozmnožování. Pouze 1-3 % případů TBC postihuje pohybový aparát. V ČR se jedná asi o 50 případů ročně. (Dungl 2014) V polovině případů je postižena páteř, druhou polovinu tvoří zejména postižení velkých kloubů a to kloubu kyčelního a kolenního. Tuberkulózní artritida vzniká jako indolentní zvolna progredující monoartritida na pozadí plicní TBC. Ke klinické manifestaci tuberkulózní artritidy může dojít až po řadě let, neboť mykobakterie jsou schopny perzistence v těle hostitele. V kloubu při tuberkulózní artritidě dochází ke tvorbě výpotku s obsahem fibrinu a kloub zduří. Ke vzplanutí této artritidy dochází snáze u kloubů, jež byly poškozeny artritickými změnami, dále u pacientů imunosuprimovaných, ať již díky užívání kortikosteroidů, či skrze autoimunitní onemocnění, u pacientů podstupujících biologickou léčbu, u diabetiků, nebo HIV pozitivních. Incidence onemocnění může



narůstát, neboť stoupá počet pacientů imunosuprimovaných a dochází rovněž ke vzniku rezistencí na dosud užívaná antituberkulotika. (Dungl 2014; Grange 2009; Petty 2011)

Původcem onemocnění je, již zmíněný rod *Mycobacterium*. Nejčastěji jde o komplex *Mycobacterium tuberculosis*, kam se řadí *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* či *Mycobacterium africanum*. Méně častým původcem jsou atypická/paratuberkulózní mykobakterie mezi něž se zařazují *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium chelonae* a *Mycobacterium marinum*. (Musil et al 2022) Poté, co mykobakterie vnikne do tkáně, dojde k odezvě organismu a to formou nespecifického zánětu provázeného otokem, infiltrací mononukleáry a makrofágy. Právě makrofágy pohlcují-fagocytují mykobakterie. K rozsevu infekce dojde lymfogenní, či hematogenní cestou. Tuberkulóza je typická také přítomností tuberkulózních uzlíků- tuberkulů typického vzhledu, kdy na periférii je přítomen lem z lymfocytů, pod ním se nachází vrstva buněk epiteloidních s velkými mnohjadernými Langerhansovými buňkami. Tuberkul často podléhá kaseózní nekróze, která postihuje i okolní struktury a může tak dojít k šíření infekce per continuitatem do okolí. (Homolka 2016)

Kultivační průkaz mykobakterií je náročnou disciplínou hned v několika směrech. Jelikož mykobakterie jsou bakterie s dlouhou generační dobou a to 15-20 h oproti pár minutám u jiných bakterií, je kultivace náročná časově. Kultivace je ukončena nejdříve za 3-6 týdnů. Ke kultivaci se užívají speciální půdy, jako je půda Šulova obohacena bovinním sérem, či půda Löwenstein-Jensenova s obsahem vaječných žloutků. Namísto je rovněž zmínit, že kultivace výpotku postiženého kloubu se daří jen zřídka, neboť mykobakterie se v kloubu nachází v paucibacilární formě a jsou tak obtížně kultivovatelné. Vhodnější je provést kultivaci tracheálního aspirátu, či bronchoalveolární laváže. Z těchto můžeme rovněž zhotovit mikroskopický preparát a obarvit jej barvením dle Ziehl-Nielsenova. Z přímých metod průkazu mykobakterií se jeví vhodná metoda PCR, která nám oproti kultivaci přináší potvrzení přítomnosti mykobakteriální DNA ve vzorku a to již v řádu pár hodin. (Musil et al. 2022)

### **1.2.7 Septická bursitida**

Septická bursitida vzniká tehdy, dojde-li k infekci bursy. Bursa, nebo také tihový váček, je uzavřeným váčkem obsahující synoviální tekutinu, a patří k pomocným zařízením kloubů. Bursy se vyskytují mezi kostmi, vazy a díky svému fluidnímu charakteru pomáhá snižovat v kloubu tření a napomáhá tak pohyblivosti v kloubu. Septická bursitis se týká nejčastěji kolenního kloubu, či lokte. Při rozvoji septické bursitis hraje roli u

burz uložených superficiálně, tedy blízko povrchu kůže, právě ztráta integrity kůže jako kupříkladu při dermatitis či psoriáze, nebo při poranění kůže. Typický je pak rozvoj bursitidy při opakovaných poraněních v oblasti kloubů, které postihuje často např. sportovce, tesaře, zedníky. V takovém případě bakterie do bursy pronikne zvenčí skrze poranění. Septická bursitida postihuje více muže, pacienty imunosuprimované, pacienty se dnou, reaktivní artritidy či při onemocnění diabetes mellitus. K šíření bakteriální infekce může dojít i per continuitatem např. při septické artritidy kloubu nacházejícího se v blízkosti bursy. Hematogenní šíření infekce z jiného infekčního fokusu je rovněž jednou z příčin vzniku septické bursitis. Mezi projevy septické bursitis patří zarudnutí v místě postižení, kůže je zde teplá na dotek, vyskytuje se horečka. Komplikací septické bursitis může být vznik kožní ulcerace, či neuropatie jako reakce na útlak nervu zvětšenou bursou. Může dojít rovněž k rozvoji chronické bursitidy a to zejména díky atypickým mykobakteriím, jako je *Mycobacterium marinum*- typicky u chovatelů akvariálních ryb a rybářů, či díky kandidóze. (Bracilovic 2019; Kotton 2023; Truong 2023)

Neboť septická bursitis se vyskytuje nemálo v koexistenci se septickou artritidy, nacházíme zde obdobné etiologické agens. Jako nejčastější původce se ukazuje *Staphylococcus aureus*, který je zodpovědný za více než 80% případů septických bursitid. (Bracilovic 2019) Mezi další původce se řadí pak streptokoky, koaguláza negativní stafylokoky, enterokoky, *E. coli*, také *Cutibacterium*, či *Pseudomonas aeruginosa*. Jak již bylo zmíněno výše v případě chronické septické bursitis se může vyskytovat jako původce rod *Mycobacterium*. Původce je diagnostikován vyšetřením synoviální tekutiny, kdy se tato podrobí mikroskopii a kultivačnímu vyšetření, či metodou PCR. Při systémových projevech jako je horečka či zimnice se přidává odběr hemokultur. (Bracilovic 2019; Kotton 2023 Truong 2023)

### **1.3 STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA VÝZNAMNÝCH BAKTERIÁLNÍCH PŮVODCŮ KLOUBNÍCH INFEKČÍ**

#### **1.3.1 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* je grampozitivní fakultativně anaerobní kokovitá bakterie, představující nejvýznamnějšího zástupce skupiny koaguláza-pozitivních stafylokoků. Patří mezi oportunní patogeny. (Votava a kol., 2003) Tato bakterie se nachází až u 40 % populace, ovšem často nezpůsobuje obtíže a člověk pak slouží coby bezpříznakový přenašeč. (Becker a kol., 2016) Nosičství patří mezi rizikové faktory, které způsobují vznik infekce. *Staphylococcus aureus* je typickým původcem pyogenních infekcí, které

mohou být lokální, ohraničené v podobě abscesů. Bakterie dokáže zapříčinit různé typy infekcí, jako je například infekce kůže a měkkých tkání, také infekce dýchacích cest, endokarditidy, septické artritidy a osteomyelitidy, infekce močových cest či dokonce sepse. (Loftus a kol., 2018) Infekce nejčastěji vzniká v místě poranění, jako jsou popáleniny, traumatické rány, operační rány atp. Predispozicí ke vzniku infekce jsou také virové nemoci, jako chřipka, dále pak diabetes mellitus, malignity či imunosuprese jedince. Vysoké riziko infekce stafylokokem je u předčasně narozených dětí, u novorozenců, seniorů. (Votava a kol 2003)

*Staphylococcus aureus* je schopen přežít ve vysoké koncentraci soli, odolává alkoholovým desinfekcím, vysušení, roste v širokém teplotním rozmezí (od 7°C až do 46°C), a daří se mu při pH v rozmezí od 4,2 do 9,3. (Votava a kol., 2003) I díky své nenáročnosti a odolnosti je *Staphylococcus aureus* významným nozokomiálním patogenem. Bakterie rovněž disponuje celou řadou faktorů virulence, díky nimž je mikroorganismus schopen vyvolat infekci. Míra virulence souvisí se spektrem těchto faktorů u daného kmene bakterie. Mezi faktory virulence, jež se nachází v buněčné stěně bakterie, patří přítomnost polysacharidového pouzdra znemožňujícího fagocytózu, přítomnost proteinu A, který vazbou na Fc fragment imunoglobulinů rovněž znemožňuje fagocytózu mikroorganismu a také kyselina teichoová v bakteriální stěně. Díky této kyselině je mikroorganismus schopen navázat se například na sliznice. Bakterie rovněž disponuje enzymy, mezi něž patří hyaluronidáza, usnadňující bakterii šíření tkání, a plazmakoaguláza, která hraje roli v tvorbě abscesů.

*Staphylococcus aureus* je producentem exotoxinů, mezi něž patří hemolyziny ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), které působí cytolyticky, či toxicky na erytrocyty, leukocyty, makrofágy, lymfocyty a poškozují tkáň. Dalším exotoxinem je Panton-Valentinův leukocidin, vysoce účinný cytotoxin se zásadním vlivem na průběh stafylokokové infekce. Jeho působením dochází k nekrotické destrukci tkáně, k leukopenii, čímž je omezena fagocytóza. Tento stafylokok disponuje enterotoxiny (A-G), působící alimentární enterotoxikózu, dále toxinem syndromu toxického šoku (TSST-1), který je spolu s exfoliatiny (A,B,C) řazen mezi tzv. superantigeny, které jsou schopny nespecificky vyvolat nekontrolovatelnou aktivaci T-lymfocytů s vyplavením obrovského množství cytokinů. Exfoliatiny jsou zodpovědné za vznik impetiga u novorozenců a stojí za klinickým obrazem syndromu opařené kůže. V neposlední řadě je tu coby faktor virulence přítomnost několika genů rezistence vůči beta laktamovým ATB, či vůči ATB vankomycinu. Takové kmeny se

značí jako MRSA, (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), čili odolný účinku meticilinu, a dále pak VRSA (z *vancomycin-resistant S. aureus*) tedy rezistentní vůči vankomycinu. MRSA kmeny jsou ve vyšší míře patogenní a tedy nebezpečné pro oslabené jedince a hospitalizované. Pacienti s MRSA i VRSA jsou uloženi na izolační pokoj, aby se zamezilo šíření tohoto nebezpečného kmene. Máme-li podezření na přítomnost MRSA kmene, pro jeho diagnostiku můžeme využít chromogenních MRSA agarů, latexaglutinací, či PCR. (Hurych, Šticha et al.2020; Votava a kol., 2003)

Pro kultivaci druhu *Staphylococcus aureus* se využívá krevní agar s 5 % beraních krvinek. Kontaminované vzorky se vkládají na selektivní půdu, například krevní agar s 10 % NaCl, který zamezí růstu gramnegativních bakterií. V případě pozorování na krevním agaru, lze spatřit 1 – 3 mm velké, neprůhledné, hladké, lesklé, okrouhlé a pigmentované kolonie s  $\beta$ -hemolýzou. (Votava a kol., 2003)

### **1.3.2 *Staphylococcus - koaguláza negativní kmeny***

Koaguláza negativní stafylokoky jsou grampozitivní bakterie kokovitého tvaru. Jedná se o stafylokoky, které mají fakultativně anaerobní metabolismus a jsou schopny tvořit katalázu. Koaguláza negativních stafylokoků je v současné době popsáno několik desítek druhů, které se od sebe liší morfologií, schopností růstu za přítomnosti NaCl, optimální teplotou pro růst a množení, produkcí enzymů či schopností využít sacharidy. (Piette, Verschraegen, 2009). Mezi druhy koaguláza negativních stafylokoků se řadí ty, u nichž nedochází k tvorbě koagulázy, tedy nekatalyzují přeměnu fibrinogenu na fibrin, čímž nedochází k tvorbě koagula v plazmě, či krvi. (Hurych, Šticha 2020)

Koaguláza negativní stafylokoky se vyskytují, coby součást fyziologického mikrobiomu člověka i zvířat. Přesto u rizikových skupin jedinců mohou zapříčinit infekci, která přináší komplikace v léčbě. Tato skupina stafylokoků může být nebezpečná pro pacienty, kteří mají umělou srdeční náhradu, pro předčasně narozené děti, pro pacienty s kloubními náhradami, či pacienty s katetry. (Otto 2012) V nemocničním prostředí jsou tyto bakterie častým patogenem, přičemž léčbu infekce jím způsobenou, znesnadňuje vysoký podíl kmenů s geny rezistence pro meticilin a vzrůstající počet kmenů, které vykazují nižší citlivost ke glykopeptidovým antibiotikům. (Becker a kol 2014) Velmi významný faktor virulence představuje schopnost těchto bakterií tvořit biofilm, který poskytuje bakteriím jak ochranu vůči imunitnímu systému jedince, tak vůči působení ATB. Díky tvorbě biofilmu jsou častými původci infekcí implantátu, jak již bylo

zmíněno výše. U infekcí umělých náhrad kloubů jsou dokonce koaguláza negativní stafylokoky příčinou infekce ve 30-40% případů. (Musil a kol 2022)

Mezi nejvýznamnější druhy koaguláza negativních stafylokoků se řadí *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* a *Staphylococcus lugdunensis*. Uvedené druhy jsou spojeny s rozvojem infekcí implantátů. Druh *Staphylococcus saprophyticus* může být příčinou akutní uretritidy, *Staphylococcus lugdunensis* způsobuje infekční endokarditidy. Skupina koaguláza negativních stafylokoků nedisponuje tolika faktory virulence coby koaguláza pozitivní *Staphylococcus aureus*, nicméně patří mezi druhy velkého klinického významu a nelze je opomíjet. (Becker 2014)

### **1.3.3 *Streptococcus subspecies***

Rod *Streptococcus* zahrnuje drobné grampozitivní kataláza negativní koky. Typické pro tyto koky je jejich řazení se do dvojic či řetězků. Streptokoků existuje několik druhů, některé jsou patogenní, jiné pak oportunně patogenní. Bakterie jsou běžnou součástí přirozené flóry v ústech, dále pak v horních cestách dýchacích, ve vaginální sliznici či v zažívacím traktu. Streptokoky jsou zpravidla fakultativně anaerobní, jejich kultivace vyžaduje obohacený krevní agar a zvýšenou tenzi CO<sub>2</sub>. Bakterie fermentují cukry, jsou citlivé na vankomycin a vyjma  $\gamma$ -hemolytických streptokoků jsou schopny lyzovat beraní erythrocyty v krevním agaru. (Hurych a Štícha 2020)

Dle typů hemolýzy lze streptokoky také klasifikovat. Skupina  $\alpha$ -hemolytická, kdy se jedná se o hemolýzu neúplnou, která je vyvolaná peroxidem vodíku a působí degradaci hemoglobinu. V důsledku toho dochází k jevu zvanému viridace, kdy se červené krevní barvivo hemoglobin změní na zelený verdoglobin. Typické je pro druh *Streptococcus pneumoniae* a viridující ústní streptokoky.  $\beta$ -hemolytická skupina streptokoků se vyznačuje úplnou hemolýzou, která se projevuje odbarvením erythrocytů s projasněním agaru. Tento druh hemolýzy je pozorován u druhů *Streptococcus pyogenes*, či *Streptococcus agalactiae*. U skupiny  $\gamma$ - hemolytické mluvíme o nehemolytických streptokokcích, agar se neodbarví a zůstane nezměněn. Mezi tyto druhy se řadí například *Streptococcus bovis*. (Hurych a Štícha 2020; Reglinski 2015)

Mezi další důležitou charakteristiku třídění streptokoků patří přítomnost polysacharidu C, který je skupinově velmi specifický. Vyskytuje se u beta-hemolytických streptokoků a naopak není přítomen u pneumokoků a viridujících streptokoků. (Reglinski 2015) Bakterie se pak člení (dle Lancefieldové) do skupin A, B, C, D a další, přičemž klinicky

nejvýznamnější jsou skupiny A s představitelem *S. pyogenes* a skupina B s představitelem *S. agalactiae*. Pro druh *Streptococcus agalactiae* se používá označení GBS a je vyšetřován ve stěru z vaginy a rekta u těhotných žen okolo 36 týdne těhotenství, neboť je původcem nebezpečné purulentní meningitis a sepse novorozenců. Tato bakterie umí uniknout fagocytóze a to díky výskytu pouzdra s obsahem kyseliny sialové, jež brání aktivaci komplementu. U GBS pozitivních rodiček se přistupuje k i.v. podání penicilinu na začátku porodu, aby se tak utvořila profylaxe pro případ nakažení novorozence při průchodu porodními cestami. (Hurych a Štícha 2020)

Klinicky nejvýznamnějším představitelem  $\beta$ -hemolytických streptokoků, zároveň streptokokem skupiny A je již zmiňovaný *Streptococcus pyogenes*, který disponuje značnou výbavou, co se faktorů virulence týká. Podstatný je zejména M protein, který je svou strukturou podobný jiným savčím proteinům a tím je umožněn vznik zkřížené reaktivity protilátek, důsledkem čehož dochází k rozvoji revmatické horečky. V pouzdře této bakterie se nachází hyaluronová kyselina, která je tělu vlastní, nedochází proto k reakci imunitního systému a je navozena tolerance mikroba. Jako další jsou přítomny streptokokové pyogenní exotoxiny zodpovědné za vznik spály a rozvoj šokového stavu (syndrom streptokokového toxického šoku). Streptolysin O působí, díky vytvoření póru v plazmatické membráně, lýzu napadených buněk. Díky tomu, že je antigenní povahy, je možné zjistit hladinu protilátek proti streptolysinu O tzv. ASLO vyšetřením. Bakterie rovněž disponuje enzymy jako je např. hyaluronidáza či streptokináza, což jí usnadňuje vstup tkání. (Reglinski, 2015, Huchych, Štícha 2020)

Dalším významným zástupcem je *Streptococcus pneumoniae*, nechvalně známý jako „pneumokok“. Běžně se vyskytuje, spolu s orálními streptokoky (*S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*), jako součást flóry orofaryngu. Dokáže však způsobit málo závažné sinusitidy a otitidy, rovněž tak infekce ohrožující postiženého na životě. Mezi takové infekce patří purulentní meningitidy, septické artritidy či pneumonie. Přítomnost pouzdra s antifagocytárními vlastnostmi je hlavním faktorem virulence u tohoto druhu. Existují zde ještě invazivní faktory jako je enzym hyaluronidáza, neuraminidáza a pneumokokový povrchový protein A, díky nimž je zajištěn vstup tkáněmi, dále pak exotoxiny autolysin a pneumolysin, díky jejichž působení dochází k rozvoji zánětu. (Hurych, Štícha 2020)

### 1.3.4 *Enterokoky*

Enterokoky jsou oválné, grampozitivní bakterie, které se původně řadily mezi streptokoky, konkrétně mezi streptokoky D (dle Lencefieldové). (Hurych a Štícha 2020) Shlukují se především do dvojic, výjimkou ovšem nejsou ani jednotlivé buňky. Enterokoky lze pozorovat na krevním agaru v nažloutlých, či mléčně bílých koloniích, díky produkci karotenoidu. (Lebreton et al. 2014). Na žluč-eskulinovém agaru, půdě selektivní právě pro enterokoky, můžeme pozorovat černé zabarvení agaru, díky reakci vzniklého eskulinu s ionty železa. (Votava et al. 2003) Enterokoky jsou odolné vůči vysychání, dobře snášejí vysoké teploty, vysoké pH a prospívají i v hypertonicím prostředí. Dále jsou kataláza negativní a mohou vykazovat hemolytickou aktivitu. (Sedláček, 2007)

Enterokoky se nejčastěji vyskytují v půdě, povrchových a odpadních vodách či v gastrointestinálním traktu ptactva, u savců, hmyzu a plazů. Přítomny jsou rovněž ve zkvašených mléčných výrobcích. (Lebreton et al. 2014) Jsou součástí běžné flóry v tlustém střevě a vagině. Zde produkují baktericidní látky, díky nimž dochází k inhibici růstu patogenní flóry. Ve své výbavě ovšem tento rod má také faktory, jež jej činí virulentním. Mezi takové patří enzym želatináza pro destrukci kolagenu a tím lepší přístup tkáněmi a rovněž schopnost bakterií tvořit biofilm. Díky němu s úspěchem kolonizují katétrů, implantáty a osidlují rány. Komplikaci v léčbě rovněž činí jednak výskyt tzv. VRE kmenů, tedy kmenů které vykazují rezistenci vůči ATB vankomycinu a kromě toho také jejich přirozená rezistence vůči další řadě antibiotik. (Hurych a Štícha 2020)

### 1.3.5 *Escherichia coli*

*E. coli* je nejprozkoumanějším mikroorganismem, neboť je využíván coby modelový organismus pro různé genové a klinické studie. Jedná se o koliformní bakterii, tedy fakultativně anaerobní, gramnegativní tyčinku, která na MacConkey agaru, který je selektivní pro růst laktóza fermentujících bakterií, tvoří purpurové kolonie. Patří mezi stanovované mikrobiologické ukazatele kvality pitné vody, slouží tedy coby indikátor fekálního znečištění. (Hurych a Štícha 2020; Votava et al. 2003) *E. coli* má podíl na syntéze vitamínu K ve střevě, je součástí přirozené střevní mikroflóry, zároveň je však původcem infekčních onemocnění lokalizovaných ve střevě i mimo něj. Je častým nosokomiálním patogenem. Projevy onemocnění, jež zapříčiní některý ze stovek dosud objevených kmenů této bakterie, mohou být mírné, lokalizované systémově, jako například gastroenteritidy, či naopak závažné, v podobě septického šoku. (Mueller 2023)

*E.coli* po vniknutí do organismu využívá mechanismy, díky nimž se vyhýbá imunitnímu systému hostitele. Disponuje fimbriemi a ve vnější membráně se nachází endotoxin jako součást lipopolysacharidu. Endotoxin působí jako pyrogen, různými způsoby také aktivuje imunitní systém, důsledkem čehož je zánět a lýza napadených buněk, díky níž se může toxin dále rozšířit. Kmeny vyvolávající střevní onemocnění jde rozlišit na: enterotoxigenní (ETEC) působící průjmů u cestovatelů, např. v Egyptě, dále pak kmeny enteropatogenní (EPEC), které jsou příčinou serózních průjmů novorozenců a kojenců, enterohemoragické (EHEC) coby původce kolitid s hemorragií, kdy u některých nemocných může dojít k poškození ledvin za vzniku hemolyticko-uremického syndrom, jehož následky bývají fatální. Jako další se vyskytují enteroinvazivní (EIEC) kmeny působící průjmů s příměsí krve. (Hurych, Štícha 2020 ; Mueller 2023)

*E. coli* způsobuje mimo průjmových onemocnění, infekci cest močových, přičemž patří mezi její nejčastější původce, dále infekce pánevní a břišní. Hrozbu představuje přítomnost *E. coli* rovněž v nemocnicích či zařízeních poskytujících dlouhodobou péči, neboť je tato bakterie původcem pneumonií, peritonitid, meningitid, infekcí kloubů a kloubních náhrad. (Mueller 2023)

### **1.3.6 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* se řadí mezi striktně aerobní gramnegativní bakterie. Je to kultivačně nenáročná bakterie, na krevním agaru můžeme pozorovat  $\beta$ -hemolýzu, má kovový lesk, mladší kolonie voní po jasmínu, starší po acetonu. Na MacConkey agaru se vyznačuje tvorbou pigmentů - modrozeleného pyocyaninu a žlutozeleného fluoresceinu. Přírodním rezervoárem tohoto mikroorganismu je půda, voda, nachází se na tělech rostlin, zvířat a na sliznicích člověka. (Hurych a Štícha 2020)

Přestože je *Pseudomonas* běžnou součástí mikroflóry člověka a u osob zdravých obvykle nevyvolává obtíže, u oslabených jedinců je situace jiná a pseudomonáda je zde v roli klinicky významného patogena, působícího mnohdy závažné infekce. Ohroženými jedinci jsou novorozenci s nezrálým imunitním systémem, osoby imunosuprimované, pacienti s intravenózními vstupy, popáleninami, katétrů. Pseudomonády jsou navíc přirozeně rezistentní vůči řadě antibiotik a při svém setkání s antimikrobiální látkou jsou schopné rozvoje rezistence nové. Tento fakt samozřejmě komplikuje terapii. K patogenitě tohoto druhu přispívá též přítomnost několika faktorů virulence. Mezi ně patří přítomnost mukózního glykokalyxového obalu, který spolu s fimbriemi bakterie využívá pro uchycení na sliznici. Ve stěně bakterie je rovněž



přítomen lipopolysacharid vykazující endotoxinovou aktivitu. Bakterie je schopna tvorby biofilmu a je producentem řady toxinů, mezi něž patří např. exotoxin A s imunosupresivním účinkem, či lecitináza s účinkem membranolýtickým. (Becker 2014; Chen 2022)

*Pseudomonas aeruginosa* je původcem celého spektra onemocnění. Vyvolává infekci kůže a měkkých tkání, jako jsou dermatitidy, působí oční infekce, způsobuje infekce ucha, zvláště pak zánět zevního zvukovodu. Dále je příčinou infekce kostí a kloubů- zde je původcem osteomyelitid, septických artritid a díky tvorbě biofilmu se jí daří osidlovat kloubní náhrady. *Pseudomonas aeruginosa* je rovněž zodpovědná za infekce CNS- vytváří zde abscesy, meningitidy. Dále působí infekce trávicího traktu v podobě průjmů, či nekrotizujících enterokolitid a způsobuje infekce i v oblasti urogenitálního aparátu. Nebezpečným patogenem je také pro srdce a plíce, neboť zde způsobuje například endokarditidy, perikarditidy či pneumonie. U pacientů imunokompromitovaných je velice důležité zamezit diseminaci pseudomonádových infekcí, díky nimž by byl život pacientů ohrožen vznikem sepse. (Becker 2014; Chen 2022)

## 1.4 MIKROBIOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA

K dosažení optimálních výsledků mikrobiologického vyšetření je bezpodmínečně nutné, aby vzorek, jenž je přijat k mikrobiologickému rozboru, byl odebrán dle zásad správného odběru. Stanoveným cílem takového rozboru je izolovat původce onemocnění a identifikovat jej. Pakliže původce bude původu bakteriálního, po jeho identifikaci se přistupuje ke stanovení jeho citlivosti vůči antimikrobiálním látkám. Mezi jednu ze základních zásad správného odběru vzorku patří zvolit místo, z něž budeme vzorek odebírat. Vybírá se takové místo, kde je předpoklad výskytu etiologického agens. Toto opatření zvyšuje jeho záchyt. Je žádoucí, aby vzorek k vyšetření byl odebrán ještě před zahájením antimikrobiální terapie, pokud je to jen trochu možné. Pokud je antimikrobiální terapie již zahájena, je nutné tuto skutečnost uvést do průvodky. Vzorek musí být zároveň odebrán správným způsobem. Zde máme na mysli především zachování co možná nejvyšší asepticnosti při jeho odběru. Způsob odběru vzorku se rovněž bude lišit dle způsobu zpracování vzorku v laboratoři. Jiné podmínky, jakož i jiné odběrové soupravy a transportní média si žádá vzorek, který bude zpracován pro anaerobní kultivaci, než vzorek, s nímž bude provedena kultivace aerobní. Je důležité řídit se dle Laboratorní příručky, která poskytuje tyto informace a je dostupná na internetových stránkách příslušné nemocnice. Včasný transport vzorku ke zpracování laboratoří, jakož i dodržení vhodné teploty a šetrné manipulace, při níž nedojde ke znehodnocení vzorku, patří také k zásadám správného odběru vzorku. V neposlední řadě je nutné, aby byl každý vzorek náležitě označen a provázela ho průvodní žádanka. Taková žádanka musí obsahovat identifikační údaje, které jsou povinné. Chybějící údaje a jejich následné dotazování mohou prodloužit proces příjmu vzorku a jeho postoupení dalšímu zpracování. Po fázi preanalytické, kdy byl získán vzorek k mikrobiologickému vyšetření, a tento doručen k rozboru, se přistupuje k vlastnímu zpracování. (Laboratorní příručka OKMP ON Příbram)

### ***1.4.1 Druh materiálu a jeho zpracování***

Pro mikrobiologickou diagnostiku prováděnou za účelem odhalení příčiny infekcí kloubů a kloubních náhrad se nejčastěji používá kloubních punktátů. Tento klinický materiál hraje zásadní roli pro včasné stanovení diagnózy. Při vzestupu tělesné teploty se provede odběr hemokultur. Odběr hemokultur je rovněž indikován při hnisavém charakteru punktátu, či kloubního výpotku. Zde usuzujeme na septickou artritidu. Pakliže je z důvodu suspektní infekce extrahována umělá kloubní náhrada, nespokojíme se s prostým stěrem z povrchu vyňaté kloubní náhrady, neboť zde často dochází, vlivem

nárůstu bakterií ve formě biofilmu na povrchu implantátu, k falešně negativnímu výsledkům. Aby se biofilm šetrně rozrušil a výsledek byl validní, je nutno kloubní náhradu zpracovat metodou sonifikace. Pokud lze z klinických a anamnestických údajů usuzovat na gonokokový původ artritid, je vhodné k mikrobiologickému vyšetření zaslat stěr z rekta, uretry, faryngu, či cervixu. (Musil 2022; Dung 2014)

#### **1.4.2 Hemokultura**

K odběru hemokultur se přistupuje, pokud organismus pacienta vykazuje známky sepsy, či je přítomen infekt, jehož lokalizací si nejsme jistí. Odběr krve k hemokultivaci je též vhodné provést při prvních příznacích horečky, jako je zimnice či třesavka, nicméně na vzestup teploty se nečeká, lze odebrat kdykoliv při podezření na bakteriémii. (Bergerová

2020) Optimální pro hemokultivaci je odběr krve provést před zahájením antimikrobiální terapie. Pokud je antimikrobiální terapie již zahájena, odběr je vhodné načasovat krátce před podáním další dávky. Krev se odebírá aseptickou venepunkcí, přičemž se nejprve desinfikuje gumová zátka hemokultivační lahvičky 70% alkoholem, poté se provede desinfekce místa vpichu potřením preparátem s jódem po předchozím otření místa vpichu 70% alkoholem. Desinfekce místa vpichu je nutné provést centrifugálně, tj. směrem ven od místa vpichu. (Laboratorní příručka OKMP) Novou strategií v odběru hemokultur

je tzv. „Single samplý strategy“, kdy se požadovaný objem krve, který u dospělého činí 40-60 ml, odebere v rámci jednoho odběru. Dle požadavků na vyšetření tedy provedeme odběr do 4-6 lahviček v rámci jedné venepunkce. Je nutné dodržet rovněž optimální objem odebrané krve v hemokultivační lahvičce, ten činí 8-12 ml. Kontrolu sterility kůže, která se dříve prováděla, není nutné dle této metodiky již provádět. Senzitivitu vyšetření hemokultur může ovlivnit právě nedostatečný počet odebraných hemokultivačních lahviček, malý objem krve v lahvičkách, nedostatečná desinfekce místa vpichu, či nedodržení podmínek uchování a transportu vzorku. (Bergerová 2020)

V současné době je již standardem automatizace zpracování hemokultur. ON Příbram využívá přístroj BACTEC od firmy Becton Dickinson, jenž poskytuje plně automatizované zpracování hemokultur, kdy detekce probíhá za pomoci fluorescenčního senzoru. Testování lahviček probíhá každých 10 minut, přičemž přístroj při detekci pozitivní lahvičky, tuto označí a díky tomu může dojít ke včasnému zpracování pozitivních hemokultur. (BLOCK SCIENTIFIC ©2024)

Zpracování odebraných hemokultur: Víčko pozitivní hemokultury se vydesinfikuje 70 % alkoholem, následně propíchneme jehlou s jednorázovou injekční stříkačkou. Je

nutné, aby konec jehly byl zanořen do kapaliny, proto si lahvičkou pootočíme. Odsajeme kapku, kterou přeneseme na podložní sklíčko a provedeme nátěr. Obarvíme dle Gramma a následně provedeme kultivaci. Pozitivní hemokultury vyočkujeme na kultivační půdy hned, vyočkování ostatních se provádí 5. den. Během 48 h dochází k detekci většina pozitivních hemokultur. Pozitivní nález hlásí mikrobiolog ošetřujícímu lékaři. Hemokultura se vyočkovává na krevní agar aerobně a anaerobně za použití anaerostatu pro docílení anaerobní atmosféry. Používá se rovněž a čokoládový agar, kde jsou erythrocyty hemolyzovány za použití tepla. Tento agar poskytuje vhodné podmínky pro růst hemofilů a kultivuje se při zvýšené tenzi CO<sub>2</sub>. Kultivaci aerobní provádíme 18-24 h při teplotě 36°C, anaerobní kultivace probíhá za téže teploty po 48 h. V některých případech i déle (7 a více dní). (Laboratorní příručka ONP)

### ***1.4.3 Kloubní punktát***

Odběr punktátu pro mikrobiologické vyšetření je indikován tehdy, dojde-li k tvorbě výpotku v kloubu, či existuje podezření na infekci kloubů. Odebírá se synoviální tekutina přísně asepticky za použití jednorázové sterilní stříkačky. Před odběrem místo pro punkci potřeme 70% alkoholem s následnou desinfekcí jodovým preparátem. Po odběru se na stříkačku nasadí gumová zátka, aby došlo k zabránění přístupu vzduchu do odebraného vzorku. Tím vytvoříme vhodné podmínky, jež zvýší šanci záchytu jak aerobních tak anaerobních mikroorganismů. Punktát nejdříve podrobíme makroskopickému posouzení, neboť jeho vzhled a charakter nám může prozradit mnohé. Purulentní charakter jasně ukazuje na přítomnost infekčního činitele, přítomnost fibrinových vloček odráží prodělaný zánět v kloubu. Pakliže je odebraný vzorek serózního charakteru je vhodné jej za účelem zkoncentrování případných mikroorganismů centrifugovat, supernanant z povrchu odsát, zbytek resuspendovat. Zhotovíme mikroskopický preparát, barvíme dle Gramma.

Následuje kultivace, při níž punktát vyočkujeme na krevní agar, MC Conkay agar a čokoládový agar. Pokud je požadována anaerobní kultivace očkujeme na Schaedler agar, obsahující ovčí krev, hemin a vitamin K a Schaedler KV agar, který obsahuje místo krve ovčí lyzovanou krev koňskou, dále ATB - kolistin a vankomycin. Pro vytvoření anaerobní atmosféry použijeme anaerostat. Odebraným punktátem naočkujeme rovněž BHI bujón určený k pomnožení. Tento dáme rovněž kultivovat. Kultivace probíhá při 36±1°C pro BHI, krevní agar, Mc Conkay agar aerobně, čokoládový agar při zvýšené tenzi CO<sub>2</sub> 18-24 h. Anaerobní kultivace probíhá při téže

teplotě 48 h. Po 24 h vyočkujeme BHI bujón stejně jako při primokultivaci. (Mokrá, Laboratorní příručka ONP)

#### **1.4.4 Kloubní komponenta**

V případě infekce kloubní náhrady se k mikrobiologickému vyšetření odesílá celá kloubní komponenta vyňatá z těla pacienta. Operatér vyjmutou komponentu při výkonu umístí s maximálním ohledem na možnou kontaminaci z prostředí operačního sálu do sterilního kontejneru, jenž je nutné pečlivě uzavřít. Pokud není kontejner k dispozici, vystačíme si s odběrem komponentu do sterilní operační rukavice. Doručení do laboratoře by mělo být bez prodlení. Kloubní komponentu zalijeme buď přímo ve sterilním kontejneru, či ve sterilní kádince Ringerovým roztokem, který musí být rovněž sterilní. Zalítí provedeme tak, aby hladina roztoku sahala až nad komponentu. Poté použijeme metodu sonikace, kdy za pomoci ultrazvukové lázně (po 5 minut) šetrně rozrušíme biofilm, jehož přítomnost na komponentě předpokládáme. Ze sonikátu odebereme 6 ml sterilní pipetou do zkumavky. Sonikát odebereme rovněž do ependorfy pro možné PCR vyšetření. Následuje centrifugace po 5 minut při 3000 otáčkách. Poté se odsaje 3 ml supernatantu opět sterilní špičkou, sediment resuspendujeme. 0,5 ml suspenze vpravíme na agarovou plotnu a kývavým pohybem jemně rozlijeme po jeho povrchu. Zhotovíme mikroskopický preparát.

Kultivujeme aerobně na krevním agaru, v BHI bujónu, mikroaerofilně při 36±1°C po 24h. Anaerobní kultivace je provedena na Schaedler a Schaedler KV agaru za použití anaerostatu při 36±1°C po 48h. K vyhodnocení přistupujeme u tuhých půd první až sedmý den po kultivaci. Kontroluje se denně. (Musil 2022 et al., Laboratorní příručka ONP, Pracovní postupy klinika)

#### **1.4.5 Stěr na gonokultivaci**

Pokud u člověka dojde k diseminaci bakterie *Neisseria gonorrhoea*, může u něho dojít ke vzniku gonokokové artritidy. Existuje-li podezření na přítomnost gonokokové infekce, je vhodné provést stěr na gonokultivaci. Stěr se u mužů provádí z uretry, u žen z cervixu a je možné provést stěr rovněž z rektu a faryngu. Při provádění odběru je důležité mít na mysli, že se jedná o bakterii velmi citlivou, které je nutné při transportu zajistit, aby v průběhu transportu k vyšetření nedošlo k vyschnutí, ke kolísání teplot a aby byl vzorek uchován při vyšší tenzi CO<sub>2</sub> s přítomností živného média. Použití vhodného speciálního transportního média je zde více než na místě. Vzorek by měl být doručen k vyšetření v co možná nejkratší době. Při podezření na diseminovanou formu infekce

je vhodné doplnit vyšetření o hemokultivaci a vyšetření kloubního punktátu. Pokud byl odebrán uretrální výtok, či sekret z cervikálního kanálu u žen, zhotovíme mikroskopický preparát. Obarvíme dle Gramma a v mikroskopu můžeme pozorovat diplokoky vzhledu kávového zrna. Ke kultivaci se používá *Neisseria gonorrhoea* selektivní agar se speciální směsí peptonů, ovčí krví a směsí ATB k potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů. Očkování provádíme na půdu, která je řádně vytemperována. Po 48 h při 36±1°C za zvýšené tenze CO<sub>2</sub> můžeme v pozitivním případě pozorovat kolonie se vzhledem kapek rosy. Tato bakteriální kolonie bude vykazovat pozitivní katalázovou reakci. Pro identifikaci provedeme ještě oxidázový test, kdy při aplikaci kolonie na testovací plošku diagnostického proužku, jímž prokazujeme produkci cytochromoxidázy, dojde v pozitivním případě k jejímu modrofialovému zbarvení. *Neisseria gonorrhoea* dává pozitivní reakci. Pozitivní výsledek vyšetření na gonokultivaci se odesílá v zalepené obálce pouze k rukám lékaře. (Černá 2014; Li 2023; Pracovní postupy klinika)

#### **1.4.6 Mikroskopie**

Zhotovení mikroskopického preparátu a jeho pozorování skrze mikroskop bývá často prvním krokem při vyšetření mnohých vzorků v mikrobiologii. Základní barvení se provádí dle Gramma, kdy se fixovaný preparát nejdříve ponoří do krystalové violeti na 1-2 minut, následuje oplach vodou, poté roztok Lugolův na 1-2 minut a opět oplach vodou. Následuje odbarvení acetonem na 5 vteřin s následným dobarvením karbolfuchsinem na 15 až 20 vteřin. Opláchneme vodou a osušíme filtračním papírem. V ON Příbram se k barvení preparátů používá barvicí automat. Bakterie grampozitivní se karbolfuchsinem nezabarví, bakterie gramnegativní ano. Po osušení obarveného preparátu přistoupíme k samotné mikroskopii a dle morfologie buněk se usuzuje na výskyt určitého druhu, či rodu bakterie. Po mikroskopii vždy následuje kultivace. Pokud existuje podezření, že původcem infekce jsou mykobakterie, jež mají ve svém bakteriálním pouzdře lipidy s obsahem mykolové kyseliny a jsou díky tomu acidorezistentní, obarvíme preparát barvením dle Ziehl Nielsena. Toto barvení se provede tak, že barvíme za horka (nad kahanem) karbolfuchsinem, který takto lépe pronikne do buněk, následuje odbarvení kyselým alkoholem, oplach pod tekoucí vodou a následné dobarvení malachitovou zelení. Pro eliminaci vdechování potenciálně škodlivých výparů, vznikajících při zahřívání, je možné požit uzavřený barvicí automat, který naše nemocnice využívá. (Pracovní postupy klinika)

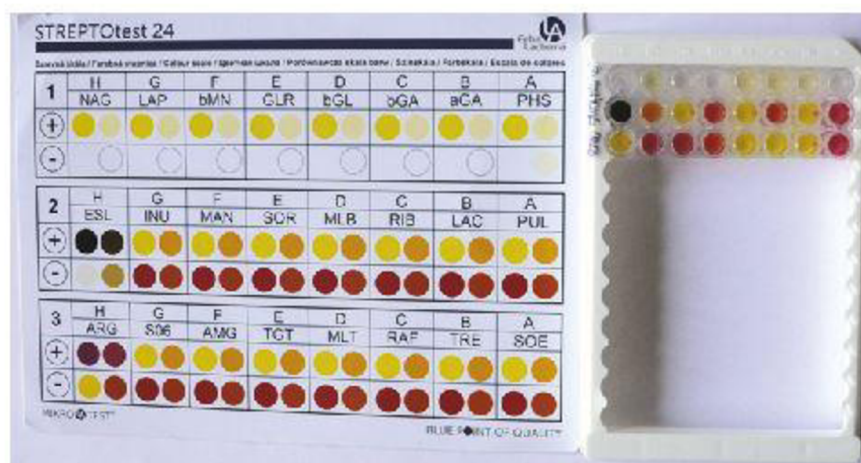
#### **1.4.7 Kultivace**

Kultivační vyšetření je považováno za „zlatý standart“ přímé diagnostiky onemocnění mikrobiálního původu. Při kultivaci je využíváno takových živných půd, které poskytnou bakterii optimální podmínky pro jejich růst a množení. Bakteriím jsou poskytnuty živiny, optimální pH, teplota a správná kultivační atmosféra k tomu, abychom jim nahradily podmínky, které jim dosud poskytoval organismus hostitele. Tato media mohou mít konzistenci tekutou (zde jsou základem různé bujony) či pevnou. Pevné půdy vznikají přidáním agaru do bujonu. Půdy lze obohatit různými přísadkami, jako je vejce, krev, či krevní sérum a získáme tak půdy obohacené. Nejběžnější takovou půdou je krevní agar s 5-10 % ovčí defibrilované krve. Krevní agar patří k základním půdám, roste zde většina bakterií. Lze jej však považovat i za půdu diagnostickou, neboť umožňuje pozorovat hemolytické vlastnosti mikroorganismů. Ty se projevují buď částečným, či úplným projasněním agaru pod bakteriální kolonií, či v jejím okolí. Můžeme zde rovněž pozorovat fenomén viridace, kdy bakterie, zejména orální streptokoky, či *Streptococcus pneumoniae* přeměňuje červené krevní barvivo hemoglobin na zelený verdoglobín. Půdy s přísadkami různých chemických látek nazýváme půdami selektivními, protože na nich rostou pouze některé organismy. Půdy diagnostické nám zase díky určitému přidanému substrátu, přítomnému často s indikátorem, umožňují diagnostikovat mikroorganismy na základě jeho biochemických vlastností. Selektivně diagnostické půdy pak vznikají kombinací předešlých dvou. Příkladem takové půdy je McConkay agar s obsahem žlučových solí pro inhibici růstu gram pozitivních bakterií. (Votava et al. 2010; Melter 2014)

#### **1.4.8 Identifikace**

Zkušený mikrobiolog dokáže provést předběžnou identifikaci rozmanitých bakterií s klinickým významem na základě jejich morfologie, typického uspořádání a dle jejich růstu za aerobních či anaerobních podmínek. Na podkladu různých biochemických vlastností se provádí následná identifikace. Použitím jednoduchých testů, jako je například katalázový test můžeme rozlišit katalázapozitivní stafylokoky od katalázanegativních streptokoků a enterokoků. Dalším příkladem takového jednoduchého testu může být například plazmokoagulázový test, který nám pomůže s rozlišením plazmokoagulázapozitivních kmenů rodu *Stafylococcus*. Pro identifikaci bakteriálních druhů se používá biochemických testů, kdy můžeme zhodnotit, jak daná bakterie metabolizuje sacharidy, či jak využívá různé substráty. Tyto testy lze provádět jako testy zkumavkové či ve formě mikrotestů. Mikrotesty jsou destičkové testy, kdy je

na dně jamek kultivační medium se substrátem a indikátorem. Při reakcích dochází ke změně zbarvení indikátoru. Vyhodnocení se provádí okometricky, či v případě mikrotestů i za pomoci softwarového výpočtu, obojí na základě biochemického profilu dané bakterie, kdy je tento porovnáván s biochemickými vlastnostmi známých druhů. Příkladem těchto testů může být STAPHY 24 – destičkový test určený pro identifikaci v rámci rodu *Staphylococcus*, či STREPTO 24 jako pomocník pro identifikaci rodu *Streptococcus* a *Enterococcus*. Tento zachycuje **obr. 1.** (Votava et al 2010; Melter 2014)



**Obrázek 1: Identifikační test STREPTO test24 (Lachema, Pliva)**

#### **1.4.9 MALDI-TOF**

MALDI – TOF neboli matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace je moderní sofistikovaná metoda identifikace mikroorganismu na základě jejich fenotypu. Vyšetřovaný mikroorganismus je identifikován na základě hmotnostního spektra svých bílkovin. Toto spektrum je porovnáváno s hmotnostními spektry známých mikroorganismů. Pro tuto identifikační metodu je podstatné mít na agarové půdě připravenou kolonii bakterií. Kolonie je spolu s matricí aplikována na pevný nosič. Díky matrici nedojde při ozařování vzorku laserem k tomu, aby biomolekuly podrobené analýze, byly fragmentovány. Na 1 destičku je možné umístit 48-96 vzorků. MALDI-TOF poskytuje pomoc s identifikací druhů, které jsou méně běžné. Poskytuje rychlý způsob identifikace mikroorganismů, v řádu několika minut a je doplňkem ostatních fenotypových metod identifikace bakterií. V současné době se stalo již laboratorním standardem identifikace v mnoha laboratořích vč. naší. (Melter 2014; Lahoda 2022)

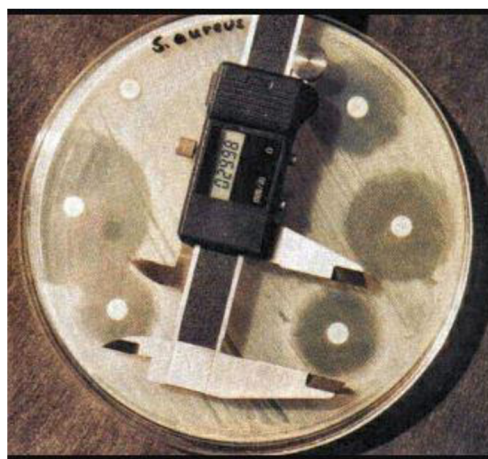
#### **1.4.10 Určení citlivosti vůči antimikrobiálním látkám**

Určení citlivosti mikroba vůči antimikrobiálním látkám představuje jednu z důležitých činností laboratoře mikrobiologie. Správné stanovení napomáhá cílené antibiotické



terapii vůči danému etiologickému agens. Citlivost můžeme určit jak kvalitativně a to diskovou difuzní metodou, či v případě potřeby kvantitativně a to metodou mikrodiluční, či za pomoci E-testů. Provádění diskového difuzního testu je dnes rutinní diagnostikou. Test probíhá tak, že na pevné agarové půdě (používá se často půdy Mueller-Hinton), kde jsou narostlé kolonie vyšetřovaného kmene, se aplikují papírové disky, které obsahují antibiotikum. To difunduje do svého okolí a tvoří se zde zóna inhibice růstu bakterií okolo příslušných disků s ATB. Vznik této zóny nám signalizuje, že dané antibiotikum potlačuje růst testovaného bakteriálního kmene. Po inkubaci, která trvá 18-24 h při 36± 1°C se za pomoci posuvného měřítka, či díky automatickému odečtu na přístroji, změří průměr inhibičních zón. (viz **obr. 2**) Podle velikosti inhibičních zón a následným porovnáním s tzv. break pointy se určí, zdali je daný mikroorganismus vůči antibiotiku citlivý či vůči němu vykazuje rezistenci.

Při kvantitativní metodě stanovení citlivosti vůči antimikrobiálním látkám provádíme určení tzv. minimální inhibiční koncentrace mikrodiluční metodou. Zjišťujeme tím nejnižší koncentraci, která je schopná potlačit růst bakteriální populace při daných podmínkách. Odečet se provádí po kultivaci v bujónu v plastových mikrotitračních destičkách s různými koncentracemi ATB. Destička obsahuje 12 sloupců pro až 12 různých antibiotik a 8 řádků pro 8 různých koncentrací daného antibiotika. Kultivace probíhá 18-24 h při teplotě 36± °C. Pokud mikroorganismus v bujónu roste, projeví se to zákalem. V opačném případě zůstává čirý. První jamka, v níž již není přítomen zákal, nám ukazuje na hodnotu minimální inhibiční koncentrace pro dané antibiotikum. E-testy jsou metodou odvozenou z určení minimální inhibiční koncentrace mikrodiluční metodou. E-test je představován proužkem z papíru, jenž obsahuje vzestupnou koncentraci antibiotika. Proužek se položí na agarovou plotnu, kde je naočkovaná testovaná mikrobiální kultura a v místě kde inhibiční zóna protne proužek, můžeme na něm odečíst hodnotu minimální inhibiční koncentrace. (Votava et al. 2010)



**Obrázek 2: Disková difuzní metoda - měření velikosti inhibičních zón**

#### ***1.4.11 PCR***

PCR čili polymerázová řetězová reakce je metodou pro přímé stanovení přítomnosti mikroorganismů, respektive přítomnosti jejich DNA či RNA. Toto molekulárně-genetické vyšetření poskytuje mimořádný přínos v diagnostice kultivačně náročných či nekultivovatelných agens jako jsou chlamydie, borrelie a jiné. PCR může uspišit výsledek vyšetření a při již zahájené antibiotické terapii jde často o jediný způsob, jakým je možné určit původce. Vítaným pomocníkem je PCR rovněž při detekci pomalu rostoucích mikroorganismů. PCR metoda vykazuje vysokou senzitivitu. Může docházet k záchytům DNA z již mrtvých mikroorganismů či DNA kontaminantů a s touto skutečností je nutné při interpretaci výsledků počítat. (Musil 2022; Rozsypal 2013)

#### ***1.4.12 Interpretace výsledků***

Po provedení mikrobiologické diagnostiky, jež nás dovedla ke stanovení určitého etiologického agens, je nutno nad tímto výsledkem kriticky uvažovat. Je třeba o něm přemýšlet v souvislostech, ať v souvislosti s anamnézou daného pacienta, v souvislosti se započatou antibiotickou léčbou, či v souvislosti s možným ovlivněním výsledku, díky případné kontaminaci. Je třeba zohlednit, zda byl odběr materiálu proveden dle zásad správného odběru klinického materiálu, či jak probíhal transport vzorku. Uvážit se musí rovněž prostředí, kde se pacient nachází. V případě nemocničního prostředí bereme v potaz infekce nozokomiální. (Lahoda 2022)

## **2 Cíl práce**

1. Seznámení se s problematikou infekcí kloubů, nabytí poznatků týkajících se původců infekcí kloubů
2. Zpracování získaných výsledků a jejich porovnání s výsledky kultivací
3. Seznámení s metodou BioFire Joint Infection panel (Biomérieux , Francie) a zhodnocení jejího přínosu pro vyšetření klinických vzorků

### 3 Metodika výzkumu

Vyšetření synoviální tekutiny multiplexní PCR za použití panelu BioFire Joint Infection (Biomérieux, Francie) při podezření na septickou artritidu či periprotetickou infekci

#### Výzkumné otázky:

1. Liší se výsledky metody BioFire Joint Infection (Biomérieux, Francie) od výsledků klasické kultivace?
2. Lze použít metody BioFire Joint Infection (Biomérieux, Francie) v rutinním vyšetření infekce kloubů?

#### 3.1 MATERIÁL A METODY

V rámci studie, která se uskutečnila na 34 klinických pracovištích v 19 zemích Evropy a na Středním Východě od března roku 2021 do června roku 2022, byla posuzována účinnost panelu BioFire Joint Infection (Biomérieux, Francie). Oddělení klinické mikrobiologie a parazitologie (OKMP) Oblastní nemocnice Příbram a.s. bylo jediným klinickým pracovištěm v České republice, které se této studii účastnilo. Panel BioFire Joint Infection je určen pro použití v systému BioFire multiplexní PCR. V příbramské nemocnici bylo zpracováno celkem 54 vzorků synoviálních tekutin a to jak za pomoci tohoto systému, tak kultivačně. Byly porovnány výsledky získané za pomoci metody BioFire Joint a za pomoci kultivace. Vzorky pocházely od pacientů s podezřením na septickou artritidu, či na periprotetickou infekci. Díky nižšímu počtu získaných vzorků byly vyšetřeny všechny zasláné vzorky synoviálních tekutin, nikoliv pouze ty s jasně purulentním charakterem. Zkoumal se význam použití multiplexní PCR v diagnostice jak nativních, tak protetických kloubních infekcí. Od května roku 2022, kdy společnost Biomérieux získala od amerického Úřadu pro kontrolu léčiv a potravin povolení *De Novo* pro BioFire Joint Infection panel, je tato metoda autorizovaná pro komerční použití. Do této doby bylo testování původců infekcí kloubů pomocí panelu BioFire Joint Infection určeno pouze pro výzkumné účely. <sup>(BIOMÉRIEUX 2022; Pascual et al. 2024)</sup>

##### 3.1.1 Popis metody- multiplex PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, která po mnohonásobném zmnožení (amplifikaci) DNA detekuje přítomnost genetické informace, což je využíváno pro detekci přítomnosti DNA/RNA viru, či bakterie. Tato metoda pro označení úseků DNA, které se mají namnožit, využívá tzv. primery. Po mnohonásobné amplifikaci zvoleného

úseku dochází k syntéze nového vlákna DNA za použití enzymu termostabilní DNA polymeráza s označením Taq polymeráza. Celý tento děj se odehrává v tzv. termocykleru, který se vyznačuje tím, že je během krátkého časového úseku (v řádech sekund) schopen měnit uvnitř zařízení teplotu o několik desítek stupňů. Modifikací klasické PCR je multiplexní PCR, jež nabízí možnost amplifikovat více cílových sekvencí v jedné reakci.

Při PCR multiplex je užito více párů specifických primerů, které vykazují komplementaritu vůči rozličným cílovým sekvencím a to v rámci jedné amplifikační reakce. Aby bylo možné použít více primerů v jedné reakci, musí tyto primery vykazovat jisté společné znaky, jako jsou podobné teploty tání ( $T_m$ ). Při interakcích probíhajících mezi primery může docházet ke vzniku jistých nespecifických produktů, které mohou interferovat s amplifikací cílových DNA, a tím může docházet ke snížení citlivosti metody. I přes toto praktické omezení se jeví multiplexní PCR jako atraktivní metoda, vhodná pro stanovení více druhů patogenů v rámci jednoho vyšetření. Její nespornou výhodou je schopnost detekce patogenů, jež se kultivují obtížně, či jsou nekultivovatelní. (Poritz 2011; Smith 2024)

### **3.1.2 *FilmArray multiplexní PCR systém***

FilmArray je uživatelsky velice přívětivý multiplexní PCR systém od firmy Biomérieux (Francie). Používá se s komplexními panely, navrženými za účelem detekce skupiny patogenů, která je umožněna díky izolaci, amplifikaci a detekci nukleové kyseliny z organismů. Dále tyto panely detekují geny antimikrobiální rezistence. K dispozici je například panel pro infekce respirační, gastrointestinální, panel pro pneumonie, či infekce kloubů. Metoda uživateli usnadňuje testování, neboť celé vyšetření je plně automatizované, počínaje přípravou vzorků, analýzou výsledků konče.

**Příprava vzorku a reagentů:** Všechna činidla, která jsou potřebná pro analýzu, jsou obsažena v lyofilizované formě v zásobnicích v samostatném vaku, který se vloží do bloku, sloužícího coby plnicí stanice. K samotnému vyšetření postačí 200  $\mu$ l synoviální tekutiny. Nejdříve se provede aplikace hydratačního roztoku do portu na pravé straně vaku (viz **obr. 3**). Tento port je značen modře. Vzorek se promíchá převrácením a za pomoci transferové pipety, jež je součástí balení se přidá přibližně 200  $\mu$ l (po druhou čárku na pipetě) k FilmArray pufru do injekční lahvičky pro vzorek. Lahvička se následně uzavře a její obsah se promíchá tak, že ji opatrně alespoň 3krát obrátíme. Víčko uzavřeme a lahvičku umístíme do portu pro vzorek, který je umístěn na levé

straně vaku. Ve vaku je přítomno vakuum, jež se stará o nasátí správného objemu vzorku. Přesnost pipetování není třeba striktně dodržet, o správný objem se opět postará vakuum přítomné ve vaku. Podoba FilmArray vaku je znázorněna na **obr. 4 a 5**



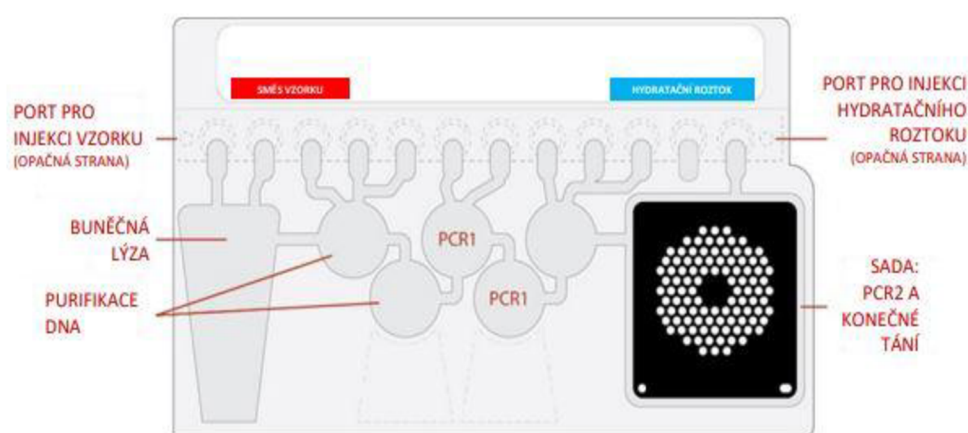
**Obrázek 3: FilmArray stanice pro plnění vaku (zdroj: Twitter společnosti Biomérieux)**

Po aplikaci jak vzorku, tak hydratačního roztoku se vak vloží do přístroje a za pomoci čtečky čárových kódů se načte ID vaku, ID vyšetřovaného vzorku a lze spustit analýzu. Následující děje jsou již plně automatizované a zcela v režii přístroje:

- **lýza vzorku:** vzorek postoupí do lyzační komory a je zde podroben lýze buněk, která je provedena za pomoci třepání s keramickými kuličkami za vysoké rychlosti. Díky lýze buněk dojde k uvolnění nukleových kyselin z buněk.
- **purifikace:** lyzát obsahující uvolněné nukleové kyseliny je hnán přes magnetické kuličky, na něž se tyto nukleové kyseliny naváží a přesunou se do purifikační komory. Zde dojde k eluci veškerých zbylých fragmentů buněk, magnetické kuličky jsou pak vychytány za pomoci posuvného magnetu a purifikované nukleové kyseliny, uvolněné z magnetických kuliček, jsou odplavovány dále do místa, kde dojde k prvnímu stupni PCR.
- **reverzní transkripce a multiplex PCR:** v komoře, kde proběhne multiplexní reakce, dojde nejprve k transkripci RNA na DNA a následně probíhá jedna velkobjemová multiplexní reakce v jejímž rámci proběhne zároveň mnoho jednotlivých reakcí.
- **singleplex PCR:** během této fáze dojde za pomoci dílčích reakcí k detekci produktů z prvního stupně PCR. V tomto kroku jsou užity primery specificky provádějící amplifikaci pouze cílové DNA. To omezí vliv nespecifických produktů, jež vznikají v klasické multiplexní PCR. Pro monitoring každé dílčí

reakce je využíváno fluorescenčního barviva vázajícího se na dvoušroubovici DNA.

- **softwarová analýza:** pro proběhnutí posledního cyklu PCR nastává analýza dat křivky tání, za účelem identifikace jednotlivých amplikonů. Dále je rozeznávána změna fluorescenčního signálu, jenž je generován v každé jamce. Různé amplikony, tedy produkty PCR reakcí, mají každý svou charakteristickou teplotu tání, což se projevuje změnou intenzity fluorescence použitého barviva za různých teplot. Právě tyto změny fluorescence nám křivka tání (melting curve) zobrazuje. (BIOFIRE DIAGNOSTICS 2015; Poritz et al. 2011)



Obrázek 4: Schématické zobrazení FilmArray vaku (zdroj obrázku: [www.biofire.com](http://www.biofire.com))



Obrázek 5: Skutečná podoba FilmArray vaku (zdroj obrázku: [www.biofire.com](http://www.biofire.com))

### 3.1.3 *BioFire Joint Infection panel*

BioFire Joint Infection (JI) panel je, jak již bylo zmíněno v úvodní části, určen pro použití v systému FilmArray. Tento panel slouží k vyšetření synoviální tekutiny. K dosažení optimálního výsledku vyšetření je nutno dbát na přísnou aseptičnost při

odběru vzorku synovie. Způsobu odběru a uchování vzorku synoviální tekutiny, se věnuje část MIKROBIOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA, zde připomeňme nutnost včasného transportu do mikrobiologické laboratoře a aseptické manipulace se vzorkem.

Testování slouží k detekci patogenů, spojovaných s infekcemi kloubů. Je zaměřen na 39 klinicky významných cílů, mezi něž patří grampozitivní, gramnegativní bakterie, dále pak kvasinky a v neposlední řadě geny rezistence vůči ATB. Mezi nesporné výhody patří komplexnost tohoto vyšetření, díky níž je pak snazší detekovat i polymikrobiální infekci. Výrobce je dále vyzdvihována jednoduchost jeho používání, kdy pro přípravu vzorku uživateli stačí pouhé dvě minuty, a rychlost celého testování, to trvá přibližně hodinu. Testování nelze použít k testování citlivosti k antibiotikům, nicméně panelem lze otestovat přítomnost určitých genů rezistence. Výsledek není oproti kultivační metodě ovlivněn předchozí antibiotickou terapií. **Obrázek 6** nabízí přehled klinických cílů panelu BioFire JI. (BIOMÉRIEUX 2022)

Gram-positivní bakterie	Gram-negativní bakterie
<i>Anaerococcus prevotii/vaginalis</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Cutibacterium avidum/granulosum</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Finegoldia magna</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Peptoniphilus</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter cloacae complex</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Kingella kingae</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae group</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Serratia marcescens</i>
Kvasinky	Geny antimikrobiální rezistence
<i>Candida spp.</i> <i>Candida albicans</i>	<b>Carbapenemases</b> IMP KPC NDM OXA-48-like VIM <b>ESBL</b> CTX-M <b>Methicillin Resistance</b> <i>mecA/C</i> and MREJ <b>Vancomycin Resistance</b> <i>vanA/B</i>

Obrázek 6: Klinické cíle panelu BioFire JI (zdroj obrázku: [www.biomerieux.cz](http://www.biomerieux.cz))

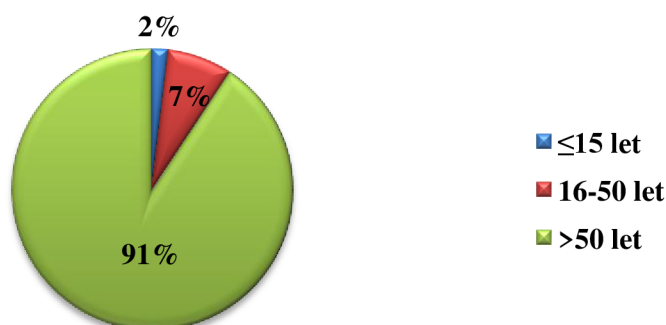


## 4 Výsledky

Během sledovaného období se na OKMP v Oblastní nemocnici Příbram a. s. vyšetřilo 54 vzorků synoviální tekutiny. Vyšetření byla prováděna za účelem posouzení shody mezi panelem BioFire Joint Infection (Biomérieux, Francie) a kultivací synoviální tekutiny a rovněž za účelem posouzení potencionálního využití tohoto panelu v diagnostice kloubních a periprotetických infekcí. Vzorky synoviální tekutiny nejčastěji pocházely od věkové skupiny pacientů starších 50 let (viz **graf 1**). Převažovaly vzorky pacientů s podezřením na septickou artritidu (celkem 52 vzorků) nad těmi s podezřením na periprotetickou infekci (celkem 2 vzorky) (viz **graf 2**). Mezi typy kloubů hrály prim klouby kolenní, ze kterých vzorky pocházely v 63 %. Zastoupení jednotlivých typů kloubů přehledně ukazuje **graf 3**.

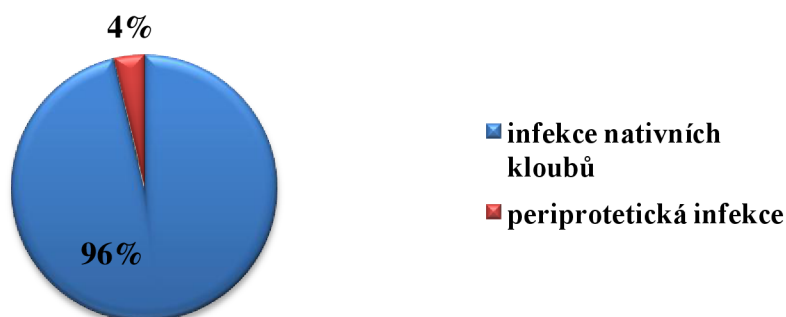
### GRAFY A TABULKY

#### Rozdělení dle věku



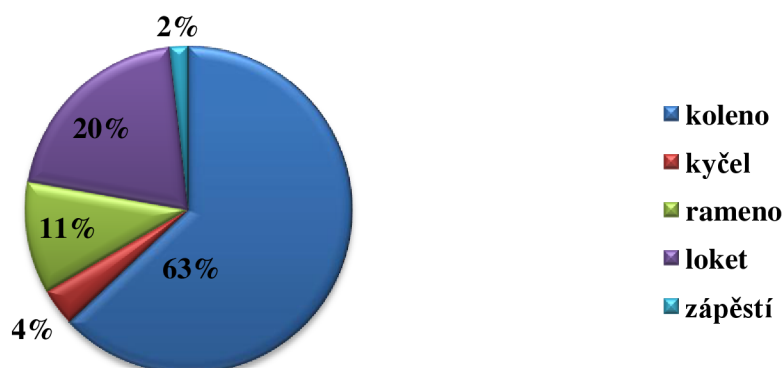
Graf 1: Zastoupení množství vzorků synovie dle věkových skupin (zdroj: LIS ON Příbram)

#### Typ infekce



Graf 2: Rozdělení vzorků synovie dle typu infekce (zdroj: LIS ON Příbram)

## Druh kloubu



Graf 3: Zastoupení typu kloubu (zdroj: LIS ON Příbram)

Většina vzorků ( $n=43$ ) byla vyhodnocena oběma metodami jako negativní. Prostřednictvím BJI panelu a zároveň kultivačně bylo identifikováno celkem 9 vzorků jako pozitivních. U 1 vzorku byla pozitivita vyhodnocena pouze za pomoci BJI panelu a 1 vzorek byl vyhodnocen jako pozitivní pouze kultivačně. Vše je zaznamenáno v následující **tabulce 1**.

	+ BJI panel	- BJI panel
synovie + kultivace	9 (17%)	1 (2%)
synovie - kultivace	1(2%)	43 (79%)

Tabulka 1: Porovnání shody mezi metodami BioFire Joint Infection panelu (BJI) a kultivační metodou pro nativní klouby a periprotetické infekce (zdroj: LIS ON Příbram)

### 4.1.1 Mikroorganismy detekované BJI panelem a kultivací

Mezi kultivační metodou a panelem BJI panovala vysoká shoda, výsledky se lišily pouze ve 2 případech. (viz **tab 1**) Přehled detekovaných mikroorganismů a genů antimikrobiální rezistence pomocí BJI panelu a kultivací přináší **tabulka 2 a 3**.

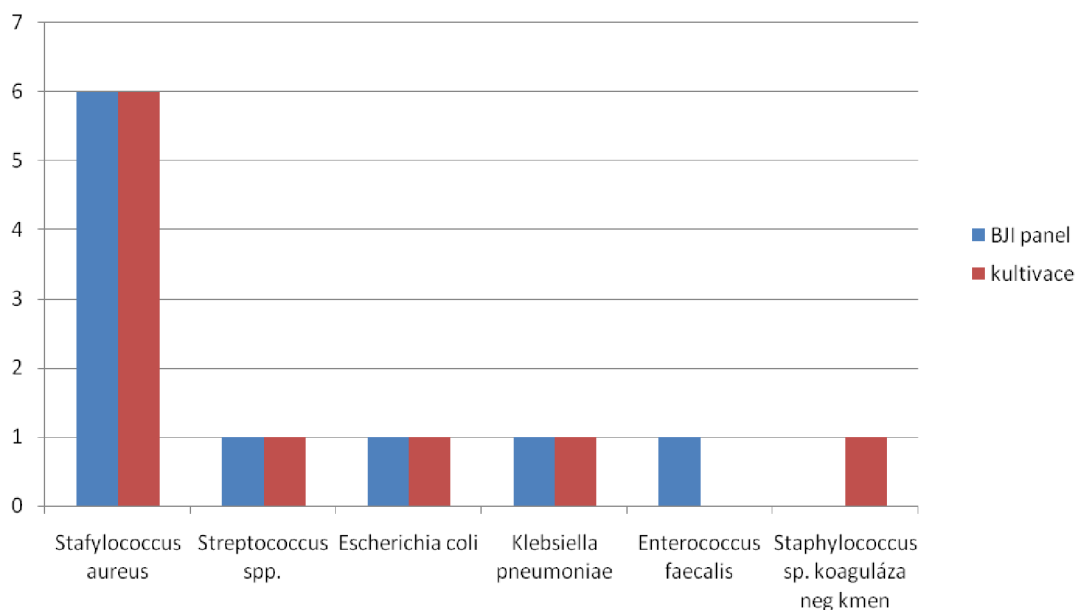
G+ aeroby	BJI + K+	K – BJI+	K + BJI-	celkem+	BJI+	K+
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	1	0	1	1	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	0	0	6	6	6
<i>Staphylococcus sp.</i> koaguláza negativní kmen	0	0	1	1	0	1
<i>Streptococcus spp.</i>	1	0	0	1	1	1
G- aeroby						
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	1	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	0	1	1	1

Tabulka 2: Detekce mikroorganismů za pomoci BioFire Joint Infection panelu (BJI) a kultivace (K) (zdroj: výsledky z databáze přístroje FilmArray multiplex PCR v ON Příbram a LIS ON Příbram)

Geny antimikrobiální rezistence	BJI + K+	K – BJI+	K + BJI-	celkem+	BJI+	K+
<i>mecA/C</i>	1	0	0	1	1	1

**Tabulka 3: Detekce genů rezistence za pomoci BioFire Joint Infection panelu (BJI) a kultivace (K) mikroorganismů nesoucích tyto geny. (zdroj: výsledky z databáze přístroje FilmArray multiplex PCR v ON Příbram a LIS ON Příbram)**

Detekované patogeny a jejich zastoupení ve vyšetřovaných vzorcích rovněž přehledně zobrazuje **graf 4**.



**Graf 4: Přehled mikroorganismů detekovaných pomocí BioFire Joint Infection panelu (JI panel) a kultivačně (zdroj: výsledky z databáze přístroje FilmArray multiplex PCR v ON Příbram a LIS ON Příbram)**

Nejčastěji identifikovaným mikroorganismem detekovaným metodou BioFire Joint Infection panel (Biomérieux, Francie) i metodou kultivace byl s jasnou převahou druh *Staphylococcus aureus*. Dalšími detekovanými druhy byl *Streptococcus spp.*, spolu s *Escherichia coli* a druhem *Klebsiella pneumoniae*. Tyto mikroorganismy byly identifikovány každý v 1 vzorku a to současně za pomoci BJI panelu a kultivace. V jednom vzorku byl BJI panelem detekován druh *Enterococcus faecalis*, který ovšem kultivační metodou potvrzen nebyl. Naopak v jednom případě kultivace prokázala výskyt *Staphylococcus sp. koaguláza negativního kmene*, přičemž BJI panelem byl tento vzorek hodnocen jako negativní. BJI panel detekoval v jednom případě výskyt genu rezistence *mecA/C*, přítomného u meticilin-rezistentního kmene druhu *Staphylococcus aureus*. Tento nálezn byl potvrzen kultivací právě MRSA kmene.

## 5 Diskuze

Tato bakalářská práce se zabývá tématem infekcí kloubů, a to včetně totálních endoprotéz. Je zaměřena na původce těchto infekcí a způsoby jejich identifikace. Teoretická část je věnována klinicky nejvýznamnějším infekcím kloubů a kloubních náhrad, následně jsou představeni a charakterizováni významní bakteriální původci těchto infekcí. Její poslední část přibližuje mikrobiologickou diagnostiku při detekci těchto patogenů. Praktická část se věnuje popisu molekulárně-biologické metody multiplexní PCR, zvláště pak její modifikaci – systému FilmArray, který se používá s komplexními panely. V tomto případě byl použit BioFire Joint Infection panel (Biomérieux, Francie) pro detekci skupiny patogenů, kteří jsou původcem septické artritidy či periprotetické infekce. Výsledky použité v této práci pochází z Oddělení klinické mikrobiologie a parazitologie příbramské nemocnice, jež byla zapojena do již zmíněné nadnárodní studie, která se uskutečnila od března roku 2021 do června roku 2022 za účelem vyhodnocení vzorků synoviální tekutiny od pacientů s podezřením na septickou artritidu či periprotetickou infekci a s cílem posoudit účinnost JI panelu.

MUDr. David Musil, Ph.D. v knize *Infekce v ortopedii* z roku 2022 uvádí, že nejčastějším původcem infekčních artritid je *Staphylococcus aureus* (identifikován u 40 - 60 % případů), jako další uvádí streptokoky (20 - 30 % případů), které jsou následovány enterokoky a gramnegativními bakteriemi. (podíl v etiologii tohoto onemocnění činí shodně po 10 – 20 %). Výsledky, o něž se opírá praktická část této práce, potvrzují dominantní zastoupení druhu *Staphylococcus aureus* mezi původci septických artritid, kdy byl tento druh detekován v 6 z 10 případů záchytu patogenu JI panelem. Detekovány byly rovněž druhy *Streptococcus spp.* a ze skupiny gramnegativních bakterií pak druh *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*. Výčet nejčastějších patogenů, coby původců SA uvedených v knize, je v souladu s našimi výsledky.

Pomocí metody BioFire Joint Infection panel (Biomérieux, Francie) byl v jednom případě podezření na periprotetickou infekci detekován druh *Enterococcus faecalis*. Kultivace však neprokázala výskyt mikrobů. V tomto případě došlo k extrakci kloubní náhrady kyčle a dřík i hlavice byly zpracovány metodou sonikace. Mikroskopie nepotvrdila výskyt mikrobů, kultivačním nálezem byly sporulující vzdušné nepatogenní mikroby, ojediněle, dále pak *Staphylococcus hominis ssp. hominis* a *Staphylococcus*

*epidermidis*, rovněž ojedinele. Tento nález tak pravděpodobně vypovídá pro kontaminaci.

Závěr kontaminace u tohoto vzorku rovněž podpořilo zkušební vyšetření sonikátu za pomoci BJI panelu, kdy byl sonikát jak z dříku, tak i z hlavice shledán metodou jako negativní. Možnosti provést zkušební vyšetření sonikátu za pomoci BJI panelu jsme využili ještě u jednoho vzorku - opět šlo o totální endoprotézu kyčle. V tomto případě BJI panel detekoval v sonikátu dříku druh *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. Tento nález byl potvrzen kultivačně. V sonikátu z hlavice TEP byl BJI panelem detekován druh *Finegoldia magna*. Tento druh patří mezi kultivačně velice náročné, tudíž zde kultivace nález nepotvrdila. *Finegoldia magna* patří mezi gramnegativní anaerobní koky (GPAC) o nichž Dr. Fernando Cobo v knize Encyklopedia of Infection and Immunity z roku 2022 píše: „Grampozitivní anaerobní koky (GPAC) jsou většinou izolovány z polymikrobiálních infekcí, takže jejich význam byl často přehlížen. Tyto anaerobní bakterie jsou součástí mikrobioty ústní dutiny, horních cest dýchacích, močopohlavního a střevního traktu a kůže.“ V knize Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases od editorky Sarah S. Long z roku 2022 je o GPAC zmíněno následující: „Grampozitivní anaerobní koky jsou nejčastěji součástí hlubokých infekcí měkkých tkání, centrálního nervového systému, nitrobřišních infekcí, infekcí kostí a kloubů a gynekologických infekcí. Tyto organismy mohou být jedinými původci osteoartikulárních infekcí.“ Dále je zde popsána synergie mezi GPAC a bakteriemi gramnegativními. Lze tedy jen doufat, že výskytu GPAC bude věnována pozornost při interpretaci výsledků, neboť z uvedeného je patrné, že jejich význam v etiopatogenezi infekčních onemocnění není zanedbatelný. Detekci těchto patogenů za pomoci metody BioFire Joint Infection panel (Biomérieux, Francie) se dařilo právě v již zmiňované studii Stéphanie Pascual z firmy Biomérieux z roku 2024, kdy došlo k detekci celkem 28 případů výskytu GPAC, přičemž kultivace byla pozitivní pouze v 6 případech. Kupříkladu z 9 detekovaných druhů *Finegoldia magna* byla pouze 1 detekována současně pomocí kultivace a panelu JI.

V jednom vzorku punktátu zápěstí prokázala kultivace nález *Staphylococcus sp. koaguláza negativního kmene*, po pomnožení. Mikroskopií punktátu však žádné mikroby nebyly nalezeny. Neboť koaguláza negativní stafylokoky jsou častým kontaminantem a BJI panelem byl tento vzorek hodnocen jako negativní, hodnotíme i tento nález jako pravděpodobně kontaminantní.

Metoda BioFire Joint Infection má jako každá metoda svá omezení a limity. Mimo jiné výrobce – firma BioFire Diagnostics v instrukcích pro uživatele uvádí, že JI panel byl navržen pouze k testování synoviální tekutiny, nelze jej použít kupříkladu k vyšetření sonikátu z extrahovaných protéz. Nález bakteriální či kvasinkové DNA neznáčí přítomnost viabilních mikroorganismů. Na nález je nutné nahlížet v kontextu klinických příznaků. Díky zkřížené reaktivitě může docházet k falešně pozitivním výsledkům. Panel JI dále nezahrnuje některé mikroorganismy, které se uplatňují coby etiologický agens v případech septických artritid či periprotetických infekcí. Jedná se o koaguláza negativní stafylokoky (v JI panelu pouze *Staphylococcus lugdunensis*) a *Cutibacterium acnes*. V případě jejich detekce by ovšem vyvstala otázka interpretace těchto nálezů. Bylo by nutné zhodnotit, jestli tyto mikroby mají podíl na etiopatogenezi dané infekce, či jsou zde pouze v roli kontaminantů. Stejně jako metoda byl limitován též náš výzkum. Vzhledem k nižšímu počtu dostupných vzorků byly do výzkumu zařazeny všechny zaslané vzorky synoviální tekutiny, nejen ty jasně purulentní. Díky tomu je podíl negativních výsledků našeho výzkumu vyšší (79%) nežli je tomu ve výsledcích nadnárodní studie Stéphanie Pascual z firmy Biomérieux z roku 2024. Zde podíl negativních výsledků činil 67%.

## 6 Závěr

S narůstajícím počtem provedených náhrad kloubů stoupá kvalita života pacientů díky zachování pohyblivosti kloubu. Avšak s počtem provedených endoprotéz přibývá i komplikací v podobě periprotetických infekcí. Tyto infekce, stejně jako infekce postihující nativní klouby, patří k závažným onemocněním vyžadujících úzkou spolupráci ortopeda a klinického mikrobiologa. Tato onemocnění mohou totiž vést k destrukci kloubů (v případě infekčních artritid) či k nutnosti extrakce implantovaného kloubu. Obojí vede ke ztrátě funkce kloubu a jeho imobilitě, díky níž je snížena kvalita života pacienta. Čas je zde tedy faktorem poměrně zásadním a včasné odhalení původce onemocnění a zvolení odpovídající antibiotické terapie je klíčem ke zvládnutí těchto onemocnění.

Cílem této práce bylo seznámit se s problematikou infekcí kloubů a nabýt poznatků, týkajících se původců těchto onemocnění. Tento cíl byl naplněn díky studiu odborné literatury, jak české, tak zahraniční. Další cíl byl splněn v praktické části a to grafickým znázorněním výsledků detekce mikroorganismů synoviální tekutiny pomocí BioFire Joint Infection panelu a kulturační metodou OKMP Oblastní nemocnice Příbram a.s. Posledního cíle práce, a to seznámení se s metodou BioFire Joint Infection panel a zhodnocení jejího přínosu pro vyšetření klinických vzorků, bylo dosaženo díky zevrubnému studiu všech dostupných materiálů od výrobce, tedy společnosti Biomérieux a seznámením se se zahraničními studii zabývajícími se hodnocením účinnosti tohoto panelu a jeho přínosem. Popisu této metody, jakož i jejímu přínosu pro diagnostiku, byl věnován prostor v praktické části této práce.

Výsledky prezentované v této práci jasně ukazují přednosti metody BioFire Joint Infection panel a těmi je vysoká diagnostická výtěžnost, komplexnost detekce velké skupiny patogenů jedním vyšetřením, jehož výsledky jsou dostupné již za krátký čas. Tato skutečnost může pomoci zefektivnit léčbu. Význam této metody spočívá rovněž v detekci nekultivovatelných mikroorganismů. JI panel může dopomoci k nastavení optimální antibiotické terapie, díky schopnosti detekovat geny antimikrobiální rezistence. Panel JI musí být používán v kombinaci s kulturací synoviální tekutiny.

Bylo by vhodné, kdyby tento panel byl přístupný většímu množství klinických pracovišť a mohlo by tak dojít k lepšímu posouzení jeho přínosu v oblasti diagnostiky a zároveň by se dala lépe posoudit uživatelská zkušenost a nákladová efektivita.

## Seznam použité literatury

1. ALUŠÍK, Štefan. Reaktivní, infekční nebo postinfekční artritida? Online. *Vnitřní lékařství*. 2022, roč. 68, č. 7, s. 449-453. Dostupné z: <https://doi.org/10.36290/vnl.2022.094>. [cit. 2024-02-05]
2. BAJAJ, Lalit. *Berman's Pediatric Decision Making*. Fift Edition. Mosby, 2011. ISBN 9780323054058
3. BARTŮNĚK, Petr. *Lymeská borelióza*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4355-4.
4. BECKER, Karsten; HEILMANN, Christine a PETERS, Georg. Coagulase-negative staphylococci. Online. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014, roč. 27, č. 4, s. 870-926. Licence: PubMed. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>. [cit. 2024-03-12].
5. BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Triton, 1996. ISBN 978-80-2380-297-9
6. BERGEROVÁ, Tamara. *Nová strategie v odběru hemokultur*. Online - webinář. 2020. Dostupné z: <https://postudium.cz/mod/book/view.php?id=5779&chapterid=2490>. [cit. 2024-03-16].
7. BioFire Diagnostics LLC. 2023. *BioFire Joint Infection (Ji) Panel - Instructions for Use*. Available from: <https://www.biofiredx.qarad.eifu.online/ITI/all?keycode=ITI0017>. Retrieved 30 Aug 2023.
8. BIOMÉRIEUX. *BIOFIRE® Joint Infection (JI) Panel* [online]. Copyright 2022 [cit. 2024-03-07]. Dostupné z: <https://www.biomerieux.cz/produkty/biofirer-joint-infection-ji-panel>
9. BIOMÉRIEUX. *The BIOFIRE® FILMARRAY® System*. Online. Dostupné z: <https://www.biofiredx.com/products/filmarray/>. [cit. 2024-03-07].
10. BLOCK SCIENTIFIC. *Becton Dickinson BACTEC 9050 Blood Culture System*. Online. © Lab Advanced Solutions (LAS) 2024. Dostupné z: <https://www.blockscientific.com/becton-dickinson-bactec-9050-blood-culture-system#attr=>. [cit. 2024-03-17].
11. BRACILOVIC, Ana. *Septic Bursitis Treatment*. Online. 2019. Dostupné z: <https://www.arthritis-health.com/types/bursitis/septic-bursitis-treatment> [cit. 2024-02-21].
12. BRUSCH, John L. MEDSCAPE. *Septic Arthritis* [online]. 2022 [cit. 2023-12-15]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/236299-overview>
13. ČERNÁ, Edita. Gonorrhoea, diagnostika a léčba, komplikace v podobě abscesu Bartoliniho žlázy. *Dermatologie pro praxi* [online]. 2014, 8(3), 108-114 [cit. 2024-02-04]. Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2014/03/06.pdf>



14. ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 1*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ, ilustroval Stanislav MACHÁČEK. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-3817-8
15. DEJMKOVÁ, Helena. Reaktivní artritida známá, neznámá. *Medical Tribune* [online]. 2008, (25) [cit. 2024-02-05]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/archiv/reaktivni-artritida-znama-neznama/>
16. DOUŠA, Pavel; PEŠL, Tomáš; DŽUPA, Valér a KRBEC, Martin (ed.). *Vybrané kapitoly z ortopedie a traumatologie pro studenty medicíny*. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2021. ISBN 978-80-246-4828-6
17. DUNGL, Pavel. *Ortopedie*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN 9788024743578
18. ESTEBAN, Jaime, Luisa SORLÍ, Eduard ALENTORN-GELÍ, Lluís PUIG a Juan P HORCAJADA. Conventional and molecular diagnostic strategies for prosthetic joint infections. *Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. 14(1), 83-97 [cit. 2024-01-02]. Dostupné z: doi:10.1586/14737159.2014.861327
19. FREEMONT, Antony J. a Jayne DENTON. *Atlas of Synovial Fluid Cytopathology*. Springer, 2012. ISBN 9401057028
20. GOERING, Richard V.; DOCKRELL, Hazel M.; ZUCKERMAN, Mark A.; ROITT, Ivan M. a CHIODINI, Peter L., JULÁK, Jaroslav (ed.). *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Přeložil Jan BOBEK, přeložil Renáta ČERMÁKOVÁ, přeložil Karel HOLADA, přeložil Zora MĚLKOVÁ, přeložil Tibor MOŠKO, přeložil Jan NOVÁK, přeložil Ludmila PROKEŠOVÁ, přeložil Jiřina SUCHANOVÁ. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.
21. GRANGE, John M. *Tuberculosis A Comprehensive Clinical Reference* [online]. Saunders Elsevier, 2009 [cit. 2024-02-13]. ISBN 978-1-4160-3988-4. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3988-4.X0001-7>
22. HOMOLKA, Jiří. *Tuberkulóza*. 5., upravené vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3476-0
23. HURYCH, Jakub a ŠTÍCHA, Roman. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2020. ISBN 978-80-7553-844-4
24. CHAKRABORTY, Rebanta K. a RAMPHUL, Kamleshun. *Reactive Arthritis*. Online. 2023. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499831/>. [cit. 2024-02-05]
25. CHEN, Selina a RUDOY, Ralph. *Pseudomonas Infection Clinical Presentation*. Online. 2022. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/970904-clinical?form=fpf>. [cit. 2024-03-15].

26. IZAKOVICOVA, Petra, Oliver BORENS a Andrej TRAMPUZ. EFORT OPEN REVIEWS. *Periprosthetic joint infection: current concepts and outlook* [online]. 2019 [cit. 2023-12-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6667982/>
27. KOLÁŘOVÁ, Libuše. *Obecná a klinická mikrobiologie*. Praha: Galén, [2020]. ISBN 9788074924774
28. KOTTON, Camille N; KAY, Jonathan a LEVERSEDGE, Fraser J. *Septic bursitis*. Online. 2023. Dostupné z: <https://medilib.ir/uptodate/show/7650> [cit. 2024-02-21].
29. KRBKOVÁ, Lenka. Lymeská borelióza. Online. *Medicina pro praxi*. 2007, roč. 5, s. 200-203. Licence: SOLEN Medical education. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/05/03.pdf>. [cit. 2024-02-18].
30. LAHODA BRODSKÁ, Helena a KOHOUT, Pavel. *Laboratorní vyšetření v klinické praxi*. Praha: Grada Publishing, 2022. ISBN 978-80-271-3243-0.
31. LEBRETON F., WILLEMS R. J. L., GILMORE M. S. *Enterococci From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [online]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014, s. 1-59 [cit. 2024-02-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>
32. LI, Raymund a Jason D. HATCHER. STATPEARLS. *Gonococcal Arthritis* [online]. 2023 [cit. 2024-02-04]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470439/?fbclid=IwAR3zzC04R2mQuCuNCzDsleDnaezeDXE7rhuRW5uAugO0GElmJptsBrefzFA>
33. LOFTUS, R. W., F. DEXTER, A. D. M. ROBINSON, A. R. HORSWILL. Desiccation tolerance is associated with *Staphylococcus aureus* hypertransmissibility, resistance and infection development in the operating room. Online. *The Journal of hospital infection*. 2018, 100 (3), s. 299-308. Licence: PubMed. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.06.020>. [cit. 2024-02-13]
34. LONG, Sarah S. (ed.). *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Online. Sixth Edition. Elsevier, 2022. ISBN 978-0-323-75608-2. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2019-0-00075-1>. [cit. 2024-03-10]
35. MAČÁK, Jirka a MAČÁKOVÁ, Jana. *Patologie*. 3., doplněné a přepracované vydání. Praha: Grada Publishing, 2022. ISBN 978-80-271-3507-3
36. MARÍN, Mercedes, Jaime ESTEBAN, Maria Antonia MESEGUER a Mar SÁNCHEZ-SOMOLINOS. Microbiological diagnosis of bone-joint infections. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [online]. Vol 28(No 8 , 534-540 [cit. 2023-12-18]. Dostupné z: doi:10.1016/j.eimc.2010.02.016
37. MELTER, Oto a MALMGREN, Annika. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2414-3.
38. MOKRÁ, Dana. PROPEDEUTIKA. *Laboratorní vyšetření pohyb.ústrojí* [online]. [cit. 2024-02-02]. Dostupné z: <http://new.propedeutika.cz/?p=459>

39. MOMODU, Ifeanyi I. a Vipul SAVALIYA. STATPEARLS. *Septic Arthritis* [online]. 2023 [cit. 2023-12-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538176/>
40. MUELLER, Matthew a Christopher R. TAINTER. *Escherichia coli Infection* [online]. 2023 [cit. 2024-02-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
41. MUSIL, David; GALLO, Jiří a CHRDLÉ, Aleš. *Infekce v ortopedii*. Jessenius. Praha: Maxdorf, [2022]. ISBN 978-80-7345-703-7
42. OTTO, Michael. Molecular basis of Staphylococcus epidermidis infections. Online. *Seminars in immunopathology*. 2012, article 34 (2), s. 201-214. Licence: PubMed. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0296-2..> [cit. 2024-02-16].
44. O'TOOLE, George, Heidi B. KAPLAN a Roberto KOLTER. PUBMED. *Biofilm formation as microbial development* [online]. 2000 [cit. 2023-12-20]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11018124/>
45. PASCUAL, S., NOBLE, B., AHMAD-SAEED, N., ALDRIDGE, C., AMBRETTI, S., AMIT, S., ANNET, R., O'SHEA, S. A., BARBUI, A. M., BARLOW, G., BARRET, L., BERTH, M., BONDI, A., BORAN, N., BOYND, S. E., CHAVES, C., CLAUSS, M., DAVIES, P., DIANZO-DELGADO, I. T., ESTEBAN, J., FUCHS, S., FRIIS-HANSEN, L., GOLDENBERGER, D., GOLLE, A., GROONROOS, J. O., HOFFMANN, I., HOFFMANN, T., HUGHES, H., IVANOVA, M., JEZEK, P., JONES, G., CEREN KARAHAN, Z., LASS-FLOURL, C., LAURENT, F., LEACH, L., HORSBOLL PEDERSEN, M. L., LOIEZ, C., LYNCH, M., MALONEY, R. J., MARSH, M., MILBURN, O., MITCHELL, S., MOORE, L. S. P., MOFFAT, L., MURDJEVA, M., MURPHY, M. E., NAYAR, D., NIGRISOLI, G., O'SULLIVAN, F., ÖZ, B., PEACH, T., PETRIDOU, C., PRINZ, M., RAK, M., REIDY, N., ROSSOLINI, G. M., ROUX, A.-L., RUIZ-GARBAJOZA, P., SAEED, K., SALAR-VIDAL, L., SALAS VENERO, C., SELVARATNAM, M., SENNEVILLE, E., STARZENGRUBER, P., TALBOT, B., TAYLOR, V., TREBŠE, R., WEARMOUTH, D., WILLINGER, B., WOUTHUYZEN-BAKKER, M., COUTIRIER, B., and ALLANTAZ, F. *Potential value of a rapid syndromic multiplex PCR for the diagnosis of native and prosthetic joint infections: a real-world evidence study*. *Journal of Bone and Joint Infection* [online]. 2024, (9), 87–97 [cit. 2024-03-18]. Dostupné z: [doi:doi.org/10.5194/jbji-9-87-2024](https://doi.org/10.5194/jbji-9-87-2024)
46. PETTY, Ross E., Ronald M. LAXER, Carol B. LINDSLEY a Lucy R. WEDDERBURN. *Textbook of Pediatric Rheumatology* [online]. 7th Edition. Elsevier, 2016 [cit. 2024-02-13]. ISBN 978-0-323-24145-8. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/C2012-0-00349-3](https://doi.org/10.1016/C2012-0-00349-3)

47. PORITZ, Mark A.; BLASCHKE, Anne J.; BYINGTON, Carrie L.; MEYERS, Lindsay; NILSSON, Kody et al. FilmArray, an Automated Nested Multiplex PCR System for Multi-Pathogen Detection: Development and Application to Respiratory Tract Infection. Online. *PLoS ONE*. 2011, roč. 6, č. 10. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026047>. [cit. 2024-02-07].
48. REGLINSKI, Mark a SRISKANDAN, Shiranee. Chapter 38 - Streptococcus pyogenes. Online. In: *Molecular Medical Microbiology*. Second edition. Academic press, 2015, s. 675-716. ISBN 978-0-12-397169-2. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012397169200038X>. [cit. 2024-02-14].
49. ROZSYPAL, Hanuš; HOLUB, Michal a KOSÁKOVÁ, Monika. *Infekční nemoci ve standardní a intenzivní péči*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2197-5.
50. ROZSYPAL, Hanuš. *Základy infekčního lékařství*. Druhé, upravené vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2023. ISBN 978-80-246-5443-0
51. ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-676-0
52. SEDLÁČEK, I. (2007): Taxonomie prokaryot. 1. vydání. Masarykova univerzita, Brno. 270 s. ISBN 8021042079.
53. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Sestra (Grada). Praha: Grada, 2014. ISBN 9788024747712
54. SMITH, Mike. *POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)*. Online. Updated: March 7, 2024. Dostupné z: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>. [cit. 2024-03-10]
55. STREITOVÁ, Dana a ZOUBKOVÁ, Renáta. *Septické stavy v intenzivní péči: ošetrovatelská péče*. Sestra (Grada). Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-5215-0.
56. TOMÁŠ, Tomáš, Luboš NACHTNEBL, Štěpán ONDRŮŠEK, Jakub RAPI a Róbert LANGER. Léčba periprotetické infekce pomocí debridement s ponecháním implantátu. *Ortopedie*. 2017, (2), 60-66. ISSN 1802-1727
57. THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Blood Culture* [online]. 2005 [cit. 2024-01-25]. Dostupné z: [http://www.oxid.com/CZ/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=BC0100&cat=&sec=2&c=CZ&lang=EN&fbclid=IwAR1Dy0sxVL4nh2EuyRfjSdww5V6kkp4QSHlD6INkTaT8mA3nvT2M5wotB74](http://www.oxid.com/CZ/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=BC0100&cat=&sec=2&c=CZ&lang=EN&fbclid=IwAR1Dy0sxVL4nh2EuyRfjSdww5V6kkp4QSHlD6INkTaT8mA3nvT2M5wotB74)
58. TRUONG, Justina, Ahmed MABROUK a John V. ASHURST. STATPEARLS. *Septic Bursitis* [online]. 2023 [cit. 2024-02-21]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29262131/>

59. VOTAVA, M. (2003) *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5.
60. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, c2010. ISBN 978-80-86850-04-7.
61. ZÍMOVÁ, Jana a Pavel ZÍMA. *Kapavka – gonorrhoea, aktuálně a v přehledu (3. část)* [online]. Solen, 2013, **14**(2), 72-76 [cit. 2024-02-19]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2013/02/07.pdf>
62. *Laboratorní příručka Oddělení klinické mikrobiologie a parazitologie ON Příbram* 2014. [online] <https://www.nemocnicepribram.cz/data/27.pdf>
63. *Oddělení klinické mikrobiologie a parazitologie ON Příbram- Pracovní instrukce klinika*

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Identifikační test STREPTO test24 (Lachema, Pliva).....	32
Obrázek 2: Disková difuzní metoda - měření velikosti inhibičních zón.....	34
Obrázek 3: FilmArray stanice pro plnění vaku.....	38
Obrázek 4: Schématické zobrazení FilmArray vaku.....	39
Obrázek 5: Skutečná podoba FilArray vaku.....	39
Obrázek 6: Klinické cíle panelu BioFire JI.....	40

## Seznam grafů

Graf 1: Zastoupení množství vzorků synovie dle věkových skupin.....	41
Graf 2: Rozdělení vzorků synovie dle typu infekce.....	41
Graf 3: Zastoupení typu kloubu.....	42
Graf 4: Přehled mikroorganismů detekovaných pomocí BioFire Joint Infection panelu (JI panel) a kultivačně.....	44

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Porovnání shody mezi metodami BJI panel a kultivace.....	42
Tabulka 2: Detekce mikroorganismů za pomoci BioFire Joint Infection panelu (BJI) a kultivace (K).....	43
Tabulka 3: Detekce genů rezistence antimikrobiálních látek pomocí BioFire Joint Infection panelu (BJI) a kultivace (K).....	46

## Seznam použitých zkratk

ASLO - antistreptolysinový titr

ATB - antibiotika

*Bbsl* - *Borelia burdorferi sensu lato*

BHI - brain heart infusion, tekuté medium ke kultivaci mikroorganismů

BJI panel, JI panel - panel BioFire Joint Infection od firmy Biomérieux

CNS - centrální nervový systém

CO<sub>2</sub> - oxid uhličitý

DNA - deoxyribonucleic acid, deoxyrybonukleová kyselina

ELISA - enzyme-linked immuno sorbent assay, imunoenzymatické vyšetření

EHEC - enterohemoragické *Escherichia coli*

EIEC - enteroinvazivní *Escherichia coli*

EPEC - enteropatogenní *Escherichia coli*

ETEC - enterotoxigenní *Escherichia coli*

*E. coli* - *Escherichia coli*

*E. faecalis a faecium* - *Enterococcus faecalis a faecium*

GBS - *Streptococcus agalactiae*

GPAC - Grampozitivní anaerobní koky

G+/- - grampozitivní / gramnegativní (bakterie)

HIV - human immunodeficiency virus, virus lidské imunodeficiencie

IgA - imunoglobulin třídy A

IgG - imunoglobulin třídy G

IL-1 - interleukin 1

i.v. - intravenózní (podání), do žíly

K - kultivace

KV agar - Kanamycin-Vancomycin agar

OKMP - Oddělení klinické mikrobiologie a parazitologie

ON - Oblastní nemocnice

MALDI – TOF - matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace

MO - mikroorganismus

MRSA - methicillin-resistant, meticylin rezistentní *Staphylococcus aureus*

NaCl - chlorid sodný

pH - potential of hydrogen, záporný dekadický logaritmus číselné hodnoty koncentrace vodíkových iontů v roztoku

PCR - polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

*spp* - species - druhy

*ssp* - subspecies - poddruh

RNA - ribonucleotide acid, ribonukleová kyselina

SIRS - systemic inflammatory response syndrome, syndrom systémové zánětové odpovědi

*S. aureus* - *Staphylococcus aureus*

*S. pyogenes* - *Streptococcus pyogenes*

TBC - tuberkulóza

TNF-  $\alpha$  - tumor necrosis factor, faktory nekrotizující nádory

TSST-1 - toxin syndromu toxického šoku

VRE - vancomycin resistant, vankomycin rezistentní enterokok

VRSA - vancomycin-resistant, vankomycin rezistentní *S. aureus*