

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta



Lékařská
fakulta

Univerzita Palackého
v Olomouci

MUDr. Michal Svoboda

**ANALÝZA KLOUBNÍHO PUNKTÁTU U INFEKČÍ KLOUBNÍCH NÁHRAD
STANOVENÍ DIAGNOSTICKÉHO PŘÍNOSU VYBRANÝCH METOD**

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.

Studijní program: Chirurgie

Olomouc 2020

Palacký University Olomouc
Faculty of Medicine and Dentistry



Faculty of Medicine
and Dentistry

MUDr. Michal Svoboda

**ANALYSIS OF JOINT FLUID SAMPLES IN PROSTHETIC JOINT
INFECTION DIAGNOSTICS**

DIAGNOSTIC UTILITY OF SELECTED METHODS

Dissertation Thesis

Supervisor: prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.

Study programme: Surgery

Olomouc 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod odborným vedením prof. MUDr. Jiřího Gallo, Ph.D. a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Olomouci dne 27.3.2020

MUDr. Michal Svoboda

Identifikační záznam

SVOBODA, MICHAL *Analýza kloubního punktátu u infekcí kloubních náhrad – stanovení diagnostického přínosu vybraných metod. [Analysis of Joint Fluid Samples in Prosthetic Joint Infection Diagnostics – Diagnostic Utility of Selected Methods].* Olomouc, 2020. Počet stran: 177, počet příloh: 5. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Ortopedická klinika. Školitel: prof. MUDr. Jiří Gallo, Ph.D.

Poděkování

Děkuji všem, kteří mě podporovali a bez kterých by tato práce nikdy nevznikla. Děkuji především svému školiteli, prof. MUDr. Jiřímu Gallo, Ph.D. za odborné vedení, inspiraci, pozitivní přístup a možnost podílet se na řadě vědeckých projektů.

Děkuji dále pacientům Fakultní nemocnice Olomouc, kolegům a kolegyním z naší kliniky, spolupracovníkům a spolupracovnicím z ostatních pracovišť, jmenovitě prof. MUDr. Rostislavu Večeřovi, Ph.D., PharmDr. Martinu Porubovi, Ph.D., Mgr. Renatě Večeřové, Ph.D., MUDr. Kateřině Bogdanové, Ph.D., MUDr. Zuzaně Slobodové, Ph.D., MVDr. Daliboru Doležalovi, MBA a celému jeho týmu ošetřovatelek zvířat, Svatoslavě Studené a Stanislavě Kříklavové – všem za příjemnou a podnětnou spolupráci na pokusech na zvířatech. Děkuji MUDr. Martinu Hobzovi za cenné rady a připomínky k pokusům na zvířatech, doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. a Radiologické klinice FNOL za poskytnutí obrazové dokumentace, Mgr. Janě Zapletalové, Dr. za statistickou analýzu dat, MUDr. Yvoně Lovečkové, Ph.D., RNDr. Jitce Proškové a Mgr. Jarmile Juráňové za spolupráci na klinických studiích.

Upřímně děkuji své rodině za trpělivost, podporu a poskytnuté zázemí.

Klíčová slova: Infekce kloubní náhrady, periprotetická infekce, diagnostika, kloubní punktát, sérum, cytologie, leukocyty, neutrofil, lymfocyty, biochemie, biomarkery, glukóza, laktát, koeficient energetické bilance, interleukin 6, NGAL, lipokalin 2, CRP

Keywords: Prosthetic joint infection, periprosthetic joint infection, diagnosis, joint fluid, serum, cytology, leukocyte count, neutrophil percentage, lymphocyte percentage, biomarker, glucose, lactate, coefficient of energy balance, interleukin 6, NGAL, lipocalin 2, CRP

Obsah

1.	Část teoretická	
1.1.	Úvod	9
1.2.	Biofilm	10
1.2.1.	Složení biofilmu	10
1.2.2.	Vlastnosti buněk vázaných v biofilmu	11
1.2.3.	Mechanismy antibiotické rezistence biofilmu	12
1.2.4.	Stádia vývoje biofilmu	12
1.2.5.	Ovlivnění biofilmu synoviální tekutinou	14
1.2.6.	Ovlivnění imunitního systému biofilmem	15
1.2.7.	Varianty malých kolonií	15
1.2.8.	Biofilmu podobné agregáty	16
1.2.9.	Další strategie přežití	17
1.2.10.	Vliv biofilmu na osteolýzu	17
1.3.	Epidemiologie infekcí kloubních náhrad	19
1.3.1.	Srovnání dat z vybraných národních registrů	19
1.3.2.	Nejčastější původci infekcí kloubních náhrad	27
1.3.3.	Rizikové faktory infekce kloubní náhrady	30
1.3.4.	Epidemiologické předpovědi	32
1.3.5.	Náklady na léčbu	32
1.4.	Klasifikace infekcí kloubních náhrad	33
1.4.1.	Coventry	33
1.4.2.	Tsukayama	33
1.4.3.	Trampuz a Zimmerli	34
1.4.4.	McPherson	34
1.4.5.	Další klasifikace	36
1.5.	Prevence infekce kloubní náhrady	37
1.5.1.	Optimalizace rizikových faktorů pacienta	37
1.5.2.	Prevence zavlečení bakterií do operační rány	38
1.5.3.	Vakcíny	41
1.5.4.	Povrchové úpravy implantátu	41
1.6.	Definice infekce kloubní náhrady	44
1.6.1.	IDSA 2012	44
1.6.2.	Kritéria MSIS 2011	45
1.6.3.	Mezinárodní konsenzus 2013	46
1.6.4.	Současný referenční standard	47
1.7.	Diagnostický algoritmus	49
1.8.	Základní pravidla pro testování vlastností diagnostických testů	52
1.8.1.	Diagnostické vlastnosti testu	52
1.8.2.	Určení optimální rozdělovací hodnoty	53

1.9. Předoperační diagnostika	55
1.9.1. Anamnéza	55
1.9.2. Klinický nález	56
1.9.3. Krevní testy	58
1.9.4. Zobrazovací metody	59
1.9.5. Nukleární medicína	60
1.9.6. Analýza kloubního punktátu	61
1.9.7. Předoperační bakteriologie	62
1.10. Peroperační diagnostika	65
1.10.1. Peroperační makroskopický nález	65
1.10.2. Vyšetření s rychlými výsledky	66
1.10.3. Kultivace peroperačních vzorků	67
1.10.4. Sonikace	67
1.10.5. Histologie	68
1.11. Inovativní a experimentální diagnostické metody	71
1.12. Terapie infekcí kloubních náhrad	73
1.12.1. Chirurgické intervence	73
1.12.2. Nechirurgické modalitty – antibiotika	76
1.12.3. Nechirurgické modalitty – experimentální	81
1.13. Prognóza	83
1.13.1. Pravděpodobnost vyléčení	83
1.13.2. Nezávislé prognostické faktory	84
VLASTNÍ PRÁCE	86
Cíle disertační práce	87
2. Část experimentální	88
2.1. Validace modelu infekce kloubní náhrady na zvířeti	88
2.1.1. Materiál a metody	88
2.1.2. Výsledky	92
2.1.3. Závěr	95
2.2. Testování antibakteriálních vlastností lipofosfonoxinů 3. generace	96
2.2.1. Materiál a metody	96
2.2.2. Výsledky	97
3. Klinické studie	100
3.1. Přínos cytologické analýzy kloubního punktátu k diagnostice IKN	100
3.1.1. Materiál a metody	101
3.1.2. Výsledky	105
3.2. Přínos stanovení sérového interleukinu 6 k diagnostice IKN	109
3.2.1. Materiál a metody	109
3.2.2. Výsledky	112

3.3.	Přínos stanovení synoviálních biochemických markerů k diagnostice IKN	115
3.3.1.	Materiál a metody	116
3.3.2.	Výsledky	120
4.	Diskuse	127
4.1.	Experiment na zvířeti	127
4.2.	Přínos cytologické analýzy kloubního punktátu k diagnostice IKN	129
4.2.1.	Výše rozdělovacích hodnot	129
4.2.2.	Heterogenita studií	130
4.2.3.	Ostatní typy buněk	132
4.2.4.	Korekce kontaminace výpotku leukocyty z krve	132
4.2.5.	Metalóza a ALTR	133
4.3.	Přínos stanovení sérového interleukinu 6 k diagnostice IKN	134
4.3.1.	Srovnání s ostatními studii	134
4.3.2.	Zvláštnosti chování testu u konkrétních kloubů	135
4.3.3.	Detekce časně pooperační infekce	136
4.4.	Přínos stanovení synoviálních biochemických markerů k diagnostice IKN	137
5.	Shrnutí výsledků doktorské disertační práce. Summary.	142
	Seznam použitých zkratk	144
	Seznam obrázků, grafů, schémat a tabulek	147
	Seznam použité literatury	151
	Seznam příloh – publikace autora disertační práce	177

ČÁST TEORETICKÁ

1. Část teoretická

1.1. Úvod

Totální náhrady nosných kloubů patří mezi nejúspěšnější a nejznámější chirurgické výkony vůbec. Od počátku 60. let 20. století, kdy sir John Charnley vyvinul cementovanou endoprotézu kyčle, zaznamenávají počty implantovaných TEP kyčlí celosvětově každoroční nárůst. Ačkoliv je bezproblémový průběh po náhradě kolena běžný teprve od 90. let 20. století, počty implantovaných TEP kolen v posledních letech dorovnávají počty implantovaných TEP kyčlí. Každý rok jsou tak miliony pacientů z různých zemí zbaveny ničující bolesti a navraceny zpět do pracovního a společenského života díky znovu nabyté funkci končetiny.

Navzdory všeobecně známému úspěchu a popularitě endoprotetiky nebývají kloubní náhrady bez komplikací. Registry kloubních náhrad evidují desítky možných příčin selhání endoprotézy, mezi nimiž jsou na prvních místech tradičně aseptické uvolnění a infekce kloubní náhrady. Incidence infekce kloubní náhrady v průběhu desetiletí díky zavedeným preventivním opatřením výrazně poklesla na zdánlivě marginální hodnotu, nicméně s ohledem na celkový počet implantovaných náhrad se stále jedná o desítky tisíc pacientů ročně. Při současném trendu nárůstu prooperovanosti populace budou případy řádově přibývat. Náklady na léčbu infekce kloubní náhrady jsou vysoké, léčba bývá dlouhodobá a často vyžaduje několik operačních výkonů. Pacienti, kteří jednou prodělali IKN, mají doživotně vyšší riziko, že se u nich tato komplikace vyskytne znovu ve stejné nebo i jiné lokalizaci.

Infekce kloubní náhrady by mohla být definována jako přítomnost viabilních bakterií nebo hub na povrchu implantátu a ve tkáních v jeho bezprostředním okolí, které se množí a svou přítomností a produkty svého metabolismu vyvolávají zánětlivou odpověď organismu, která vyústí v poškození tkání hostitele až klinické selhání kloubní náhrady [106]. Jakkoliv jasná je tato definice, bakterie a houby uvnitř protetického kloubu zatím neumíme detekovat s dostatečnou přesností. Správná a včasná diagnostika infekce kloubní náhrady a pochopení patogeneze nemoci dávají pacientovi vyšší šanci na úplné vyléčení a zachování funkční končetiny, redukcí délky hospitalizace, celkové doby léčby a počtu operací nutných k vyléčení. To s sebou nese i ekonomické dopady, a proto se v posledních letech mnoho výzkumných skupin zaměřilo na rozvoj v této oblasti.

Předložená práce shrnuje dosavadní poznatky z oblasti epidemiologie, prevence, diagnostiky a léčby infekcí kloubních náhrad. Dále prezentuje výsledky klinických studií, na kterých jsem spolupracoval během postgraduálního doktorského studia. Podílel jsem se rovněž na testování účinnosti nových antibakteriálních látek na zvířecím modelu akutní stafylokokové osteomyelitidy.

1.2. Biofilm

Interakce bakterií s cizím materiálem v těle pacienta poskytuje bakteriím určitou výhodu. Tato skutečnost je společná pro infekce kloubní náhrady, permanentní katetry, chlopenní náhrady, kardiostimulátory i další implantáty. Každý implantát je vhodným místem k přilnutí bakterií a vytvoření biofilmu, a navíc indukuje vznik imunologicky kompromitované oblasti s omezeným přístupem imunitních buněk a látek. Biofilm je základním faktorem perzistence infekce chirurgických implantátů [58]. Díky biofilmu unikají bakterie diagnostice a odolávají imunitním reakcím organismu i intenzivní antibakteriální terapii. Eradikace bakterií v biofilmu je velmi obtížná.

„Biofilm je strukturované společenství bakterií obalené do polymerové matrix, produkované bakteriálními buňkami a adheované k inertnímu nebo živému povrchu [51].“ Biofilm bychom si neměli představovat jako zvláštní bakteriální formu. Je to základní uspořádání bakteriální populace v přírodě. Většina bakteriálních buněk na naší planetě se vyskytuje ve formě biofilmu a pouze minimum bakterií žije ve volné, planktonické formě [52]. Příklady běžných biofilmů jsou kluzká vrstva na říčních kamenech nebo zubní plak. Biofilm je výsledkem dlouholeté evoluce a vzniká jako adaptivní reakce na nepříznivé podmínky okolního prostředí, která umožňuje jednobuněčným organismům přežít uvnitř mnohobuněčného společenství [133]. Pro bakterie je lidské tělo jen další prostředí se specifickými podmínkami, kterým se v zájmu přežití, růstu a množení přizpůsobují pomocí základních mechanismů získaných v průběhu své evoluce. Odhaduje se, že více než 65 % všech lidských infekčních onemocnění je způsobeno bakteriálním biofilmem [330].

1.2.1. Složení biofilmu

Extracelulární matrix biofilmu je tvořena polysacharidy, polymerními proteiny, volnou DNA, kyselinou teichoovou a lipidy [10]. Hlavním smyslem těchto látek je mechanická ochrana bakteriálních buněk, zabránění prostupu antimikrobiálních sérových složek (tedy protilátek a komplementu) až k bakteriálním buňkám a zadržení esenciálních živin [92].

Klinicky významnou roli hraje PIA (polysaccharide intercellular adhesine), který je zodpovědný za adhezi mezi buňkami. Chemické složení PIA je poly-1,6- β -N-acetylglukosamin, zkráceně PNAG. Bakterie, které byly experimentálně zbaveny genu pro tvorbu PIA, ztratily schopnost tvorby biofilmu na některých površích [137]. Byla popsána i řada jiných proteinů, které dávají bakteriálním buňkám schopnost adheze k povrchům: accumulation-associated protein (*Aap*), extracellular matrix protein (*Emp*), protein A nebo *Staphylococcus aureus* surface protein G (*SasG*). Ne všechny biofilmy tedy využívají PIA [114].

Extracelulární DNA (eDNA) je nástrojem sdílení faktorů virulence a přenosu genů antibiotické rezistence mezi bakteriálními buňkami a zároveň přispívá i k lepším mechanickým vlastnostem biofilmu a adhezi bakterií pomocí vazby eDNA k polymerním proteinům a polysacharidům extracelulární matrix [393]. Bakterie dodávají eDNA do extracelulární matrix buď aktivní sekrecí nebo pomocí autolýzy vybraných buněk. Tento proces i proces příjmu eDNA bakteriální buňkou, zvaný kompetence, je řízený systémem buněčné signalizace zvaným quorum-sensing systém [363]. V biofilmu je horizontální přenos genů vyvinutý mnohem výrazněji než v planktonické populaci bakterií [142]. Podíl eDNA v extracelulární matrix biofilmu se mění v průběhu cyklu vyžívání biofilmu [343] a reaguje na změnu podmínek. Vystavení biofilmu subinhibiční koncentraci antibiotika zvyšuje podíl eDNA v extracelulární matrix, což nejen urychluje přenos genů antibiotické rezistence, ale také zhoršuje průnik antibiotika k bakteriálním buňkám [76].

Důležitou součástí bakteriálního biofilmu jsou sérové proteiny hostitele. *S. aureus* pomocí koagulázy přeměňuje fibrinogen na fibrin, který se potom stává pevnou složkou extracelulární matrix. Fibrin výrazně snižuje penetraci antibiotik biofilmem [342]. Zvláštní postavení má modulin rozpustný ve fenolu (PSM). Za určitých podmínek může PSM agregovat do amyloidních fibril a stabilizovat biofilm zlatého stafylokoka [381]. Kromě toho působí jako cytotoxin na eukaryotické buňky a hraje stěžejní roli v quorum-sensing systému.

1.2.2. Vlastnosti buněk vázaných v biofilmu

Bakteriální buňky žijící uvnitř biofilmu vykazují odlišný fenotyp od volných buněk rozptýlených v prostředí. Jsou rozmístěny hustě vedle sebe, vystaveny nedostatku živin a kyslíku a nadbytku zplodin svého metabolismu, což vede nutně k určitým k metabolickým a fenotypovým změnám.

Zpomalení až zastavení růstu. Bakterie v biofilmu tlumí syntézu DNA, proteinů a buněčné stěny [395]. S úpravou metabolismu souvisí i redukovaná potřeba a změna zastoupení přijímaných živin [92]. Část populace růst, množení a příjem živin úplně zastaví [51]. Tato extrémní životní forma, **perzistory**, zcela zastavila látkovou výměnu a dýchání, avšak dokáže se „oživit“ v reakci na konkrétní signály.

Přechod na anaerobní metabolismus. Stafylokoky mají aerobní metabolismus za dostatečného přístupu kyslíku, ale v hlubších vrstvách biofilmu se musí přizpůsobit jeho nedostatku [255]. Důkazem je exprese alkohol dehydrogenázy a L-laktát dehydrogenázy, enzymů zapojených do anaerobního metabolismu [353].

Zvýšená mutabilita. Navzdory utlumené reprodukci je v biofilmech větší pravděpodobnost vzniku mutant s novými vlastnostmi než u bakterií v planktonické formě [92].

Expresie stresových genů. Bakterie tvoří biofilmy v reakci na zhoršené podmínky okolního prostředí. Exprimují stresové geny, např. univerzální stresový protein A (*uspA*), což je fylogeneticky konzervovaná molekula, kterou tvoří bakterie, houby, *archaea* i hmyz v případě ohrožení. Bakterie vázané v biofilmu výrazněji exprimují nukleosid-difosfát-kinázu (*Ndk*), která je v první řadě enzymem syntézy nukleosid-trifosfátů jiných než ATP (CTP, UTP, GTP). *Ndk* je ale aktivní i v syntéze polysacharidů a v supresi imunitních buněk. Zvýšená exprese *Ndk* znamená, že bakterie syntetizují složky extracelulární matrix biofilmu. Další over-exprimovaný protein je *FabG*, který hraje stěžejní roli v syntéze dlouhých mastných kyselin [353].

Změny pH a elektrických vlastností membrány [92].

Ochrana před fagocytózou. Uvnitř biofilmu jsou bakterie do jisté míry chráněné před fagocytózou [286]. Míra rezistence k fagocytóze se odvíjí od druhu bakterie a složení biofilmu [130].

Různé bakteriální buňky téhož kmene uvnitř jednoho biofilmu exprimují různé geny a nabývají různých fenotypů, díky čemuž se biofilm lehce podobá organizovaným tkáním mnohobuněčných organismů, kde se jednotlivé subpopulace buněk specializují na různé funkce [51]. Každý stafylokokový biofilm obsahuje nejméně 4 subpopulace: buňky rostoucí s aerobním metabolismem, buňky rostoucí s anaerobním metabolismem, spící buňky a mrtvé buňky [255]. Výše popsané vlastnosti buněk vázaných v biofilmu jsou u různých subpopulací vyjádřené v různé míře. Každý fenotyp potom může mít i jiný profil antibiotické rezistence.

Bakterie exprimují různé geny v závislosti na převládajícím typu leukocytů, které je obklopují. Zatímco neutrofilový fenotyp bakterií téměř nemění, přítomnost makrofágů způsobí down-regulaci genů řídících růst, tvorbu buněčné stěny nebo replikaci [263].

1.2.3. Mechanismy antibiotické rezistence biofilmu

Struktura biofilmu obecně brání volné difuzi molekul antibiotik, protilátek i komplementu. Proto většina antibiotik dosahuje uvnitř biofilmu koncentrací výrazně nižších, než je koncentrace v séru. Extracelulární hydrolytické enzymy biofilmu inaktivují některá antibiotika ještě předtím, než se dostanou do kontaktu s bakteriálními buňkami [192]. Kladně nabité aminoglykosidy bývají zachyceny záporně nabitými molekulami exopolysacharidové matrix [142].

Mechanismus antibiotické rezistence však není pouze špatná prostupnost biofilmu pro většinu antibiotik. Tato hypotéza byla překonána poté, co bylo dokázáno že některá antibiotika dosahují i uvnitř biofilmu koncentrace přesahující MIC pro planktonické formy bakterií. Dokonce i vankomycin, velká molekula, má značnou penetraci biofilmem [56]. Rezistence bakterií uvnitř biofilmu je tedy způsobena změnami fenotypu buněk popsanými výše, které vedou k výraznému nárůstu MIC většiny antibiotik. Na příkladu zlatého stafylokokka bylo ukázáno, že MIC některých antibiotik pro metabolicky a reprodukčně inaktivní bakteriální buňky může být uvnitř biofilmu až 1000x vyšší v porovnání s planktonickými bakteriemi [198]. Proto se u bakterií tvořících biofilm zavádí pojem minimální biofilm inhibující koncentrace (MBIC) a minimální biofilm eradikující koncentrace (MBEC).

Struktury a procesy, na které antibiotika cílí, tedy syntéza DNA, proteinů a buněčné stěny, jsou mnohonásobně méně ovlivnitelné, pokud jsou inaktivní. Například β -laktamy jsou účinné pouze na buňky, které právě syntetizují buněčnou stěnu. Proto zůstávají netknuté ty bakterie vázané v biofilmu, které buněčnou stěnu netvoří [102].

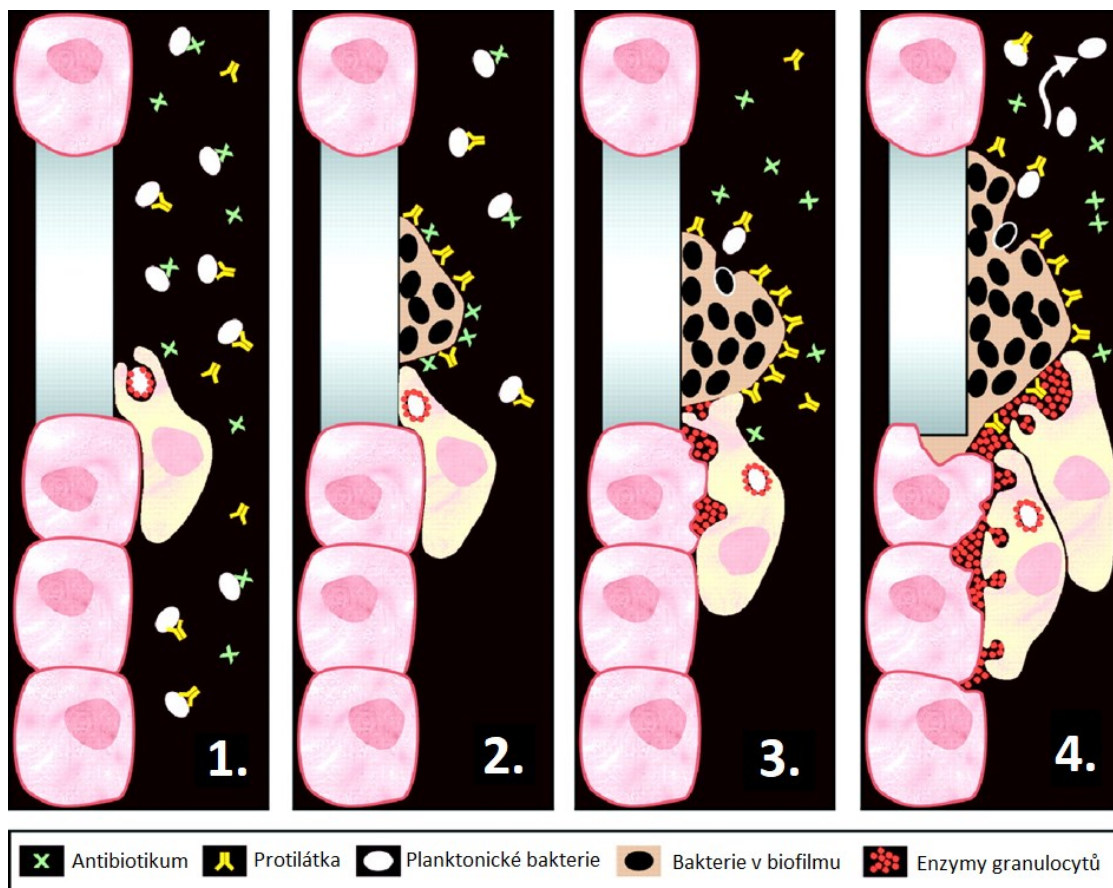
Uvnitř biofilmu samozřejmě fungují „tradiční“ mechanismy antibiotické rezistence planktonické formy bakterií, jako jsou modifikace cílové molekuly, zhoršení propustnosti plasmatické membrány pro antibiotikum, aktivní transport antibiotika ven z buňky nebo enzymatická hydrolyza antibiotika [192]. Bakterie žijící v biofilmu vykazují výrazně vyšší frekvenci mutací než bakterie v planktonické formě, takže vznik nového mechanismu antibiotické rezistence je uvnitř biofilmu pravděpodobnější [78].

1.2.4. Stádia vývoje biofilmu

Tvorba biofilmu začíná během prvních vteřin po kontaktu bakterií s povrchem implantátu. Biofilm ve svém vývoji periodicky prochází čtyřmi stádii vývoje [114]:

1. **Adheze buněk.** Ihned po zavedení ortopedického implantátu se implantát začíná pokrývat pacientovými sérovými proteiny. Z nich nejdůležitější jsou fibrin, fibronectin, von Willebrandův faktor a vitronectin. Sérové proteiny jsou v kloubu přítomny ve zvýšené míře po poranění a krvácení, tedy samozřejmě i po implantaci kloubní náhrady. Bakterie na svém povrchu exprimují fibrinogen vázající protein, von Willebrandův faktor vázající protein a další molekuly, které jim usnadňují adhezi k povrchu implantátu pomocí vazby na hostitelské proteiny [209][226]. Bakterie mohou k povrchu implantátu přilnout i bez pomoci hostitelských proteinů, což je závislé na elektrickém náboji, hrubosti a hydrofobii povrchu implantátu [259]. Experimentálně bylo ovšem prokázáno, že mutanty, které nejsou schopny na svém povrchu

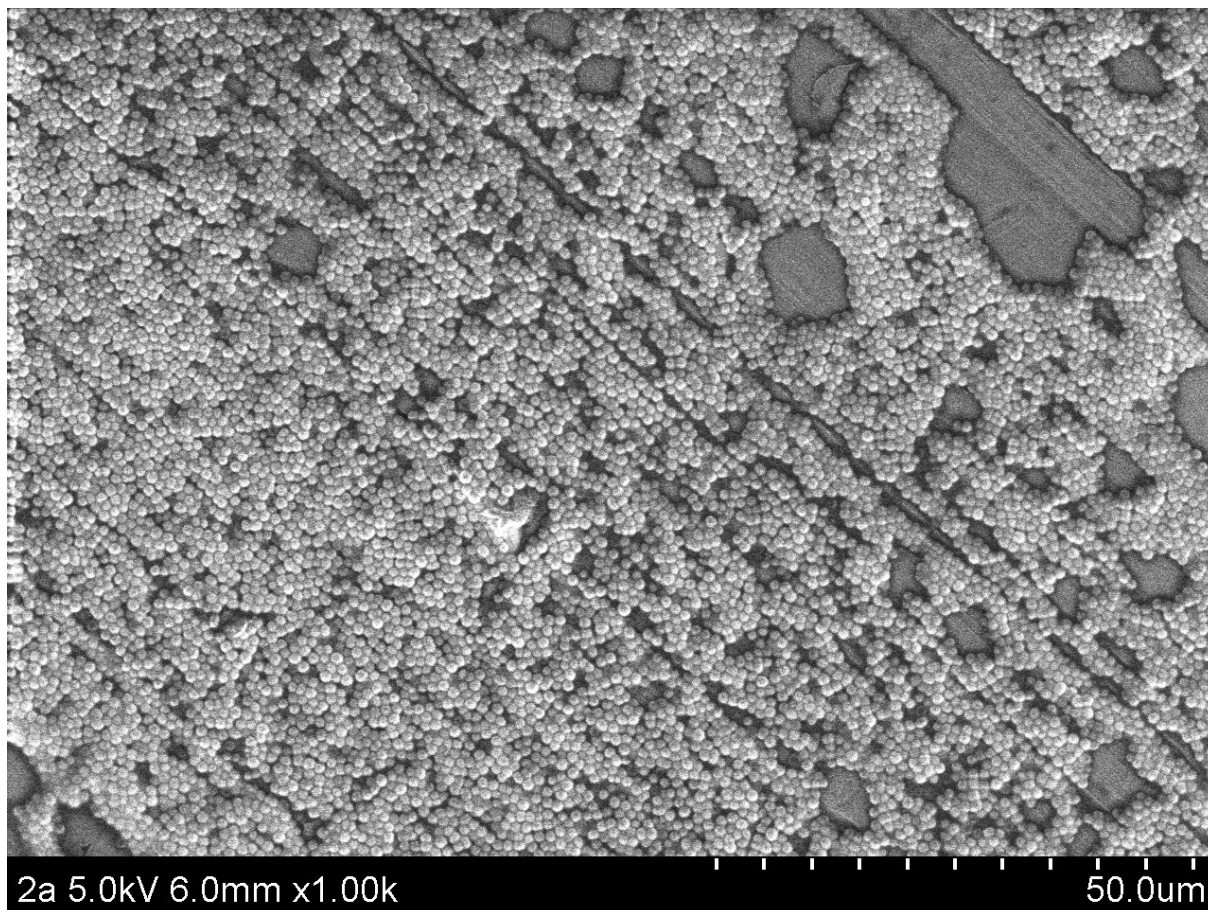
exprimovat fibrinogen vázající protein nebo fibronektin vázající protein, nejsou schopny tvořit biofilm na kloubních náhradách ani volně plující agregáty v kloubním výpotku [61]. Biofilmy se netvoří jen na inertních površích implantátů, ale též na živých nebo nekrotických tkáních, jako např. na kostním sekvestu u osteomyelitidy nebo uvnitř bronchiálního stromu pacienta s cystickou fibrózou [51].



Obrázek 1.1: Stádia vývoje biofilmu. Převzato z [51]

2. **Agregace buněk.** Bakteriální buňky intenzivně proliferují a formují klastry buněk navzájem propojených adhezními molekulami. Kromě toho bakterie secernují složky extracelulární matrix, která postupně pokryje celé jejich kolonie a vytvoří jim ochrannou bariéru. V tomto stádiu je biofilm ještě nestabilní a poměrně snadno odstranitelný.
3. **Vyvrávání biofilmu.** Během třetí fáze se bakteriální buňky specializují do subpopulací s různými rolami a komunikují pomocí quorum-sensing systému. Quorum-sensing systém mezibuněčné signalizace je zodpovědný za rychlost množení jednotlivých subpopulací a transkripci konkrétních genů, tedy i vlastností subpopulací, jejich schopnost přijímat živiny a odolávat antibiotikům. Povrchově uložené bakterie mají snadnější přístup ke kyslíku a živinám, a proto jsou metabolicky aktivnější než hluboko uložené buňky. Alespoň omezeně se rozmnožují a jsou citlivější k antibiotikům [102]. Vyvrálý biofilm má složitější architekturu, je organizovaný do vrstev a protkaný vodními kanály umožňujícími vstup živin [52]. Zralý biofilm je už velmi obtížné eradikovat. Odstranění biofilmu pouze mechanismy imunitního systému těla hostitele je vzácným jevem [51].

4. **Uvolnění bakterií z biofilmu.** Z vyzrálého biofilmu se periodicky uvolňují bakterie do volně plující frakce nebo se oddělují celé kusy biofilmu, aby kolonizovaly další volné povrchy, popř. metastazovaly do jiných částí těla hostitele. Za načasováním a rozsahem tohoto procesu opět stojí quorum-sensing systém. Biofilm stárne a degraduje podobně jako tkáň vyšších organismů.



Obrázek 1.2: Biofilm *Staphylococcus epidermidis* na kovovém terčiku Ti_6Al_4V . Snímek pořídila Bc. Lucie Válková pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu Hitachi SU6600. Snímek laskavě poskytl doc. Panáček z Přírodovědecké fakulty UPOL.

1.2.5. Ovlivnění biofilmu synoviální tekutinou

Čtyři stádia vyzrávání biofilmu, která se cyklicky opakují během infekce kloubní náhrady, jsou řízena quorum-sensing systémem, tedy systémem buněčné signalizace mezi bakteriálními buňkami, který je zodpovědný za specializaci subpopulací, expresi různých genů v různých subpopulacích biofilmu, a tedy i různé fenotypy některých buněk. Součástí tohoto systému je i *Agr* (accessory gene regulator) a jeho efektor PSM (modulin rozpustný ve fenolu), které byly zkoumány na bakterii *Staphylococcus aureus*. PSM je specifický stafylokokový cytotoxin a zároveň enzym rozpouštějící části zralého biofilmu a zodpovídá za rozsev bakterií z biofilmu do volné frakce. Jeho cílovou molekulou je jedna z hlavních složek extracelulární matrix biofilmu, PIA. Pokud při mutaci bakterie ztratí gen *Agr* a netvoří tedy PSM, její biofilm se spontánně nerozpouští a nabývá obrovských rozměrů. Navíc postrádá typickou architekturu. Aktivita genu *Agr* je výrazně snížena v přítomnosti kloubní tekutiny. Stejný bakteriální kmen tedy uvnitř kloubu tvoří silnější a méně strukturovaný biofilm než *in vitro*, a to účinkem látek produkovaných hostitelem [61].

1.2.6. Ovlivnění imunitního systému biofilmem

Nejnovější imunologické poznatky dokládají, že přežívání bakteriálních biofilmů a unikání imunitnímu systému je zapříčiněno nejen zvláštním fenotypem bakterií uvnitř biofilmu včetně enormní antibiotické rezistence, ale též obleněním imunitní reakce v okolí biofilmu. Zatímco planktonické bakterie vedou makrofágy ke klasické aktivaci, tedy fagocytóze, uvolnění prozánětlivých cytokinů a reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku, stafylokokový biofilm indukuje protizánětlivou odpověď organismu, charakterizovanou hromaděním alternativně aktivovaných makrofágů v jeho okolí a expanzí myeloidních supresorových buněk – MDSC [127]. To, jestli se makrofágy aktivují klasickým prozánětlivým nebo alternativním protizánětlivým způsobem, se odvíjí od mnoha faktorů okolního prostředí. Alternativně aktivovaný makrofág uvolňuje protizánětlivé cytokiny, velmi neochotně fagocytuje a indukuje fibrotizaci tkáně. Má suprimovanou tvorbu indukovatelné NO syntetázy (iNOS), hlavního baktericidního mechanismu, takže netvoří reaktivní sloučeniny dusíku. Místo toho exprimuje arginázu 1, enzym tvorby prolinu, prekursoru kolagenu. Zlatý stafylokok charakter prostředí v přítomnosti makrofágů aktivně upravuje směrem alternativní aktivace makrofágů, čímž přispívá k dysfunkci makrofágů. Využívá k tomu účinek leukocidinu AB a alfa toxinu, které mohutně secernuje do svého okolí [380]. Experimentálně bylo prokázáno, že injekční aplikace makrofágů, které jsou již z předchozího *in vitro* prozánětlivého prostředí aktivovány klasickou cestou, na právě se rodící biofilm výrazně zpomalí růst a vývoj biofilmu [134].

MDSC mohou mít v periprotetické tkáni 2 úlohy: potlačují aktivaci T-lymfocytů nebo se diferencují do neutrofilů, makrofágů nebo dendritických buněk. Zlatý stafylokok svými působky směruje diferenciaci MDSC do makrofágů s protizánětlivou aktivací [374]. V periprotetické tkáni se stabilně nachází velmi nízký podíl T-lymfocytů, což je způsobeno právě inhibicí jejich aktivace a proliferace v přítomnosti robustního infiltrátu MDSC [138]. V přítomnosti složky PIA extracelulární matrix biofilmu je narušena i práce neutrofilních granulocytů, které vykazují menší schopnost fagocytózy bakteriálních buněk [327]. Pokud bakterie secernují PSM, tento potom působí toxicky na neutrofilů a v krajním případě vede k jejich buněčné lýze. Přítomnost neutrofilů stimuluje zlaté stafylokoky k akcentované sekreci PSM [263].

V přítomnosti stafylokokového biofilmu je tedy imunitní systém výrazně kompromitován. Implantát jako každé cizí těleso je pro imunitní buňky a látky hůře dostupným terénem už jenom proto, že na rozdíl od vlastních tkání není perfundován. Horší perfuzi má i operační jizva. Všechny tyto faktory vedou k tomu, že nejmenší počet bakterií nutný pro vznik infekce je po operaci s implantátem až o 6 řádů nižší než po operaci bez implantátu. K vyvolání infekce kloubní náhrady *S. aureus* stačí teoreticky pouhých 100 buněk zlatého stafylokoka [645].

1.2.7. Varianty malých kolonií

Některé bakterie jsou schopny transformace do stavu, který jim umožňuje přizpůsobit se náročnějším podmínkám prostředí. Tento stav se nazývá varianty malých kolonií, „small colony variants“ nebo „SCV“. Fenotyp SCV obvykle vzniká v reakci na restrikcii živin, kontakt se subletální koncentrací antibiotik, genetickou mutací nebo jiný stresový faktor, kterému jsou bakterie vystaveny [20]. SCV není alternativa k biofilmu, ale jeden z možných fenotypů, kterého bakterie v biofilmu nabývají. Fenotyp SCV byl zatím pozorován u tří bakteriálních druhů: *S. aureus*, *S. epidermidis* a *S. lugdunensis* [366]. Pokud *S. aureus* přejde do formy SCV, tvoří větší a strukturovanější biofilm než běžné varianty [274]. Označení SCV bylo použito kvůli makroskopické morfologii kolonií vykultivovaných na agarových plotnách, protože bakterie ve formě SCV tvoří kolonie cca. 10x menší

než jejich genotypicky totožné varianty v běžné formě. SCV neznají hemolýzu, vykazují výrazně zpomalený růst, menší nároky na živiny, vyšší antibiotickou rezistenci a různé biochemické odlišnosti v porovnání s běžně izolovanými variantami. Nejednou se stane, že na kultivační plotně vyrostou klasické kolonie a SCV geneticky totožného kmene a SCV jsou potom přehlédnuté nebo interpretované jako kontaminace [13].

Hlavní biochemickou odlišností SCV od běžných variant zlatého stafylokoka je auxotrofie pro hemin, menadion a tymidin. Fakt, že bakteriální buňka ztratila schopnost syntetizovat vlastní tymidin a je plně odkázána na jeho příjem z prostředí, hraje z hlediska antibiotické rezistence významnou roli proto, že tato SCV varianta obchází účinek ko-trimoxazolu, který brání endogenní syntéze tymidinu. Další odlišností SCV od klasické varianty zlatého stafylokoka je defekt v elektronovém transportu, a tedy změna elektrického potenciálu na buněčné membráně, která znemožní průchod aminoglykosidů do bakteriální buňky a způsobí tak jejich absolutní neúčinnost [197].

SCV jsou schopny perzistovat intracelulárně uvnitř savčích buněk, čímž dlouhodobě unikají moci imunitního systému hostitele [249]. V případě zlatého stafylokoka se o přítomnosti bakterie uvnitř lidských buněk často nehovoří, nicméně tento jev byl popsán na buňkách endotelu pacientů s infekční endokarditidou [57] a dále na osteoblastech, fibroblastech a polymorfonukleárech u infekce kloubní náhrady [266]. Do osteoblastů penetrují výhradně buňky s fenotypem SCV, zatímco profesionální fagocyty fagocytují i klasické varianty bakterií [366]. Produkty metabolismu SCV jsou výrazně méně toxické pro okolí, popř. buňku, ve které SCV přežívají, než je tomu u běžných variant, a proto buňka zůstává dlouhodobě viabilní [281]. Uvnitř buňky jsou potom SCV vystaveny menším koncentracím antibiotik, než kterých je dosaženo v intersticiu. Různá antibiotika mají samozřejmě různou míru prostupu do intracelulárního prostoru v závislosti na své lipofilitě [57]. Po vysazení antibiotické léčby se intracelulární SCV stávají zdrojem reinfekce.

Ačkoliv byla intracelulární perzistence v osteoblastech *S. aureus* prokázána opakovaně, internalizace *S. epidermidis* zůstává sporná a *S. lugdunensis* nebyl v osteoblastu zastižen nikdy. I u zlatého stafylokoka se jedná spíše o vzácný jev: na 100 000 zkoumaných osteoblastů připadá pouze 100 internalizovaných buněk *S. aureus*.

Dodání heminu, menadionu a tymidinu buňkám ve formě SCV vede k nabytí klasického fenotypu, včetně hemolýzy a opuštění intracelulárního přežívání zlatého stafylokoka [20].

Všechna uvedená zjištění platná pro *S. aureus* však nelze plošně použít pro další stafylokoky tvořící SCV. Vyšší rezistenci na aminoglykosidy nebo ko-trimoxazol vykazují pouze některé kmeny *S. epidermidis* ve formě SCV. SCV *S. epidermidis* nejsou nikdy auxotrofní pro hemin, menadion nebo tymidin. Nebylo ani prokázáno, že SCV *S. epidermidis* by tvořily výraznější biofilm než běžné varianty stejného kmene [197].

1.2.8. Biofilmu podobné agregáty

Nová zjištění nás vedou k přehodnocení náhledu na bakteriální biofilm jako na entitu vznikající pouze na površích tkání nebo neživých materiálů. V přítomnosti kloubní tekutiny totiž bakterie upravují expresi některých genů a nabývají fenotypu bakterií přisedlých v biofilmu, i když se volně pohybují v kloubním prostoru v podobě agregátů. Ačkoliv mají pravděpodobně přístup k dostatku kyslíku, stafylokoky v agregátech exprimují alkohol dehydrogenázu a L-laktát dehydrogenázu, enzymy zapojené do anaerobního metabolismu, a dále univerzální stresový protein A (*uspA*), což svědčí o tom, že jsou vystaveny stresu podobně jako bakterie v biofilmech [353].

Podobně jako biofilm, tyto agregáty k bakteriální adhezi využívají lidské sérové proteiny (např. fibrin a fibronektin) a bakteriální fibrinogen vázající protein. Experimentálně bylo ověřeno, že podání plasminu výrazně redukuje tvorbu biofilmu i volných bakteriálních agregátů. Plasmin je serinová proteáza krevní plasmy, která odbourává řadu krevních proteinů, především fibrin v koagulech. Bakterie neschopné tvořit agregáty a biofilm jsou výrazně citlivější k antibiotikům [60]. Fakt, že tvorba agregátů je výrazně utlumena v přítomnosti plasminu, je považován za důkaz, že agregace bakterií je nejvíce závislá na fibrinu a méně na ostatních sérových proteinech. Bohužel pro pacienta je to právě fibrin, který je ze všech bakteriemi vázaných sérových proteinů nejhojněji zastoupen v traumatizovaných kloubech, tedy i v místě implantace kloubní náhrady [61].

1.2.9. Další strategie přežití

Bakterie působící infekci kloubní náhrady tvoří biofilmy, biofilmům podobné agregáty, nabývají formy SCV a přežívají uvnitř lidských buněk, včetně osteoblastů. Existují i další způsoby, kterými bakterie unikají imunitnímu systému a cílené antibakteriální léčbě:

Odolnost vůči oxidativnímu stresu. Zlaté stafylokoky vázané v biofilmu na své cytoplasmatické membráně exprimují stafyloxantin a superoxid dismutázu, které je chrání před oxidativním stresem reaktivních sloučenin kyslíku, a znemožňují zahubení bakteriální buňky jedním z nejdůležitějších antibakteriálních mechanismů neutrofilů [48].

Odolávání fagocytóze. Zlatý stafylokok vázaný ve zralém biofilmu odolává fagocytóze polymorfonukleárními neutrofilů. Čerstvý biofilm je fagocytózou ještě zranitelný [132]. Snahou polymorfonukleárních neutrofilů je po fagocytóze propadnout apoptóze, v jejímž průběhu štěpí intracelulární sloučeniny včetně DNA intracelulárních fagocytovaných stafylokoků. Programovaná buněčná smrt zabrání vylití cytotoxických sloučenin, narozdíl od případné neřízené nekrózy. Senzitivita k fagocytóze je závislá na druhu bakterie. *S. epidermidis* je odolnější k fagocytóze neutrofilů a výrazně méně indukuje apoptózu neutrofilů [130].

Perzistence uvnitř profesionálních fagocytů. Pokud je přece jen zlatý stafylokok fagocytován, může a nemusí perzistovat uvnitř neutrofilů a může se jejich pomocí přesouvat do přilehlých tkání [44]. Uvnitř neutrofilů jsou potom bakterie do jisté míry chráněny před působením antibiotik a mohou v nich perzistovat až do ukončení antibiotické terapie, aby se potom staly zdrojem recidivy infekce.

Inhibice komplementu. Zlatý stafylokok je schopný inhibovat aktivaci komplementu [44].

Asymetrické dělení. *Staphylococcus aureus* vázaný v biofilmu se na okrajích kostních fisur dělí asymetricky tak, že dceřiné buňky nabývají menších rozměrů a podlouhlých tvarů. To jim umožňuje pronikat do nejužších štěrbin a lakun osteocytů, kde mají neomezený přísun živin a do jisté míry jsou chráněny před imunitou [258].

1.2.10. Vliv biofilmu na osteolýzu

Představa, že bakteriální biofilmy secernují toxiny a enzymy, které rozpouštějí kostní matrix a přeměňují ji na zdroj živin a umožňují invazi do kostní tkáně, je potvrzená pozorováním a přijatá [155]. To ovšem není jediný mechanismus osteolýzy. Poškození osteocytů (biomechanické, účinek zánětlivých mediátorů, bakteriálních toxinů, intracelulární invaze bakterií) způsobí jejich apoptózu a uvolnění RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand), který reaguje s RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B) na povrchu monocyto-makrofágových prekurzorů a přiměje je k diferenciaci

v osteoklasty. Prozánětlivé cytokiny rovněž stimulují osteoklastogenezi buď přímo nebo stimulací produkce RANKL osteoblasty [366]. Další buňky, které produkují RANKL, jsou polymorfonukleární neutrofilny, které jsou v přítomnosti bakterií přirozeně aktivované.

Zajímavostí je, že notoricky známý superantigen TSST-1 (toxin stafylokokového toxického šoku 1), který je spojovaný s toxickým šokem způsobeným pomnožením zlatého stafylokoka v menstruačním tampónu, hraje v infekci kloubní náhrady jinou roli: stimuluje resorpční aktivitu osteoklastů [358].

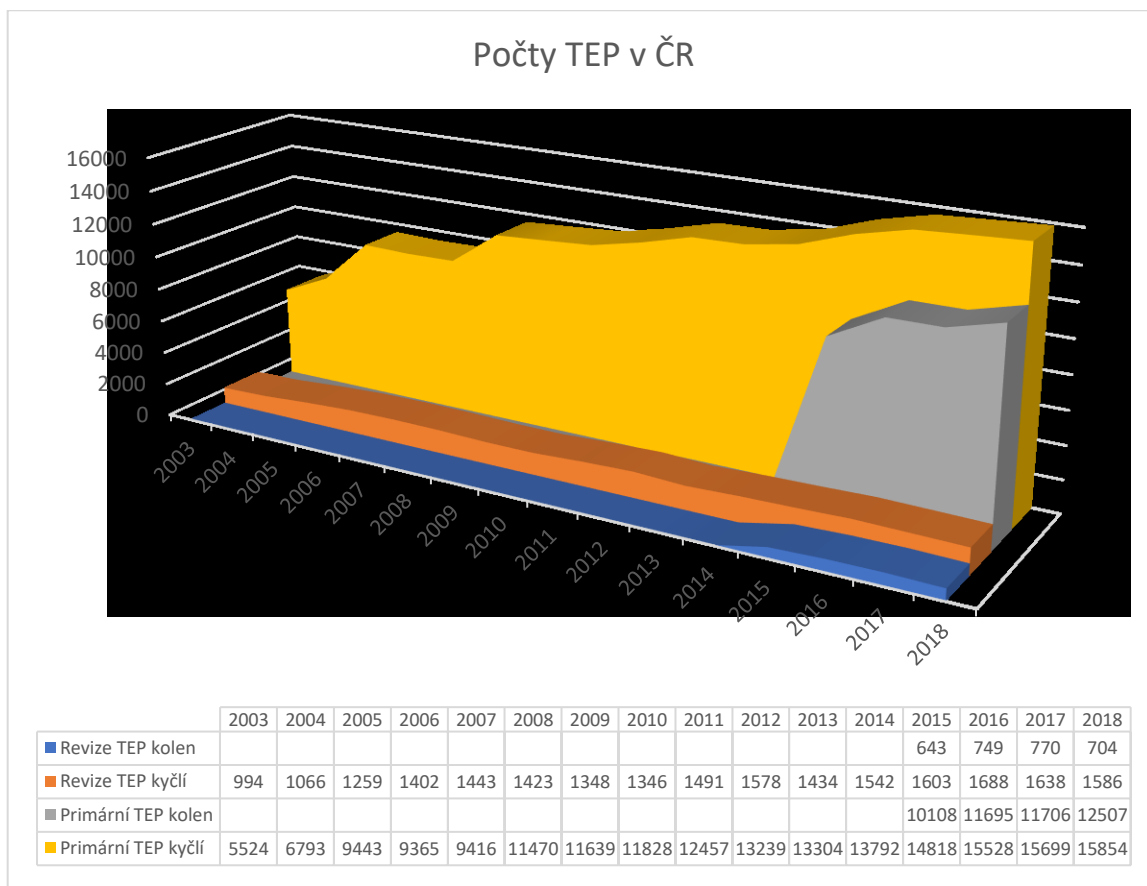
Zlatý stafylokok nejen podporuje resorpci kosti pomocí stimulace osteoklastů, ale svými působky snižuje aktivitu osteoblastů, v krajním případě indukuje jejich smrt [365]. Hlavními hybateli osteolýzy jsou makrofágy, které jsou přítomny jak u infekčního, tak u aseptického uvolnění implantátu, kde fagocytují otěrové částice a sekretují prozánětlivé mediátory, které jsou potom signálem k příchodu dalších makrofágů a aktivaci osteoklastů [233]. Makrofágy se spojují do mnohojaderných buněk, aby mohly fagocytovat velké otěrové částice. Na rozdíl od osteoklastů tyto obrovské buňky nemají schopnost resorbovat kostní matrix [366].

1.3. Epidemiologie infekcí kloubních náhrad

Počet implantovaných kloubních náhrad každoročně stoupá u nás i ve světě. Poptávka roste díky neutuchajícímu nadšení odborné i laické veřejnosti z pozitivního dopadu operace na kvalitu života pacienta a díky vyššímu věku dožití populace. Ortopedická pracoviště nabízí větší a větší kapacity pro endoprotetickou operativu. Úměrně vývoji počtu primárních implantací, ale s jistým zpožděním, musí zákonitě růst i počet revizních operací. Nepříjemným zjištěním je, že celosvětově sílí podíl infekcí kloubních náhrad na celkovém počtu indikací k revizním operacím.

1.3.1. Srovnání dat z vybraných národních registrů

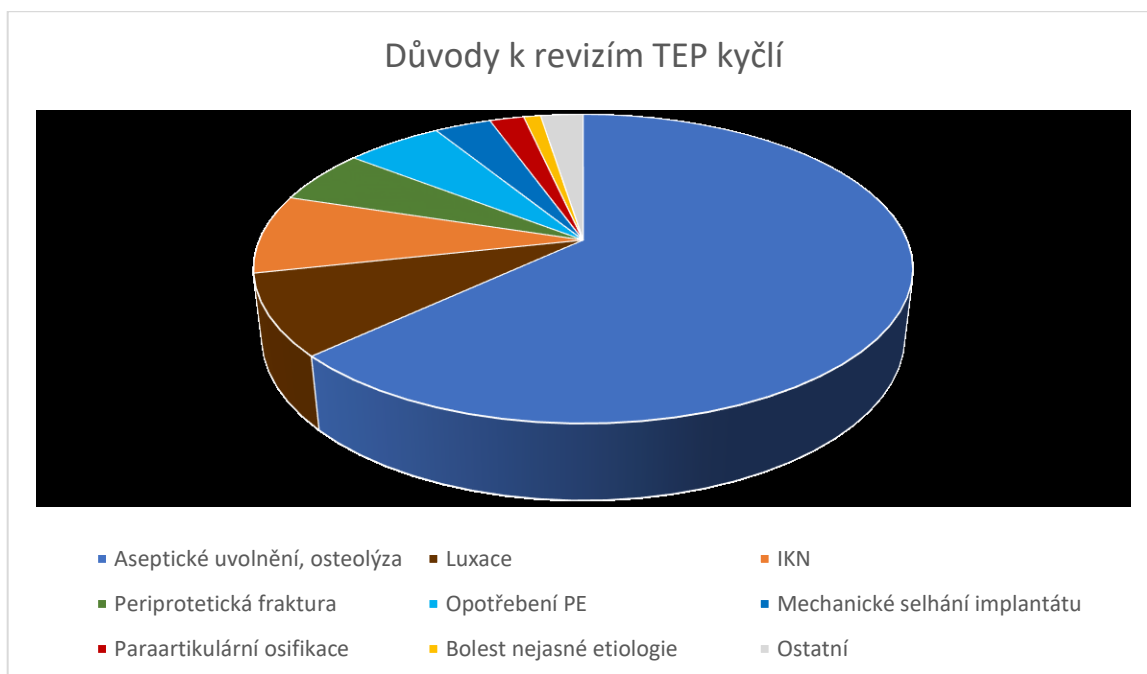
Do českého Národního registru kloubních náhrad bylo v roce 2003 registrováno 5524 TEP kyčlí implantovaných v českých nemocnicích. V současnosti se podle dat Národního registru kloubních náhrad v ČR implantuje kolem 16 tisíc TEP kyčlí (2018). V roce 2003 Národní registr zaznamenal 994 revizních TEP kyčlí, o patnáct let později potom 1586 revizí TEP kyčlí. To neznamená skokový nárůst reoperací, nýbrž se ukazuje, že registr pokrývá větší a větší počet pracovišť v ČR. TEP kolen se u nás implantuje lehce méně než TEP kyčlí. V roce 2018 proběhlo 12 507 primoimplantací a 704 revizí TEP kolen [389].



Graf 1.1: Počty primárních a revizních TEP kyčlí registrovaných do Národního registru kloubních náhrad České republiky v letech 2003 až 2018. TEP kolen se začaly registrovat v roce 2015 [389]

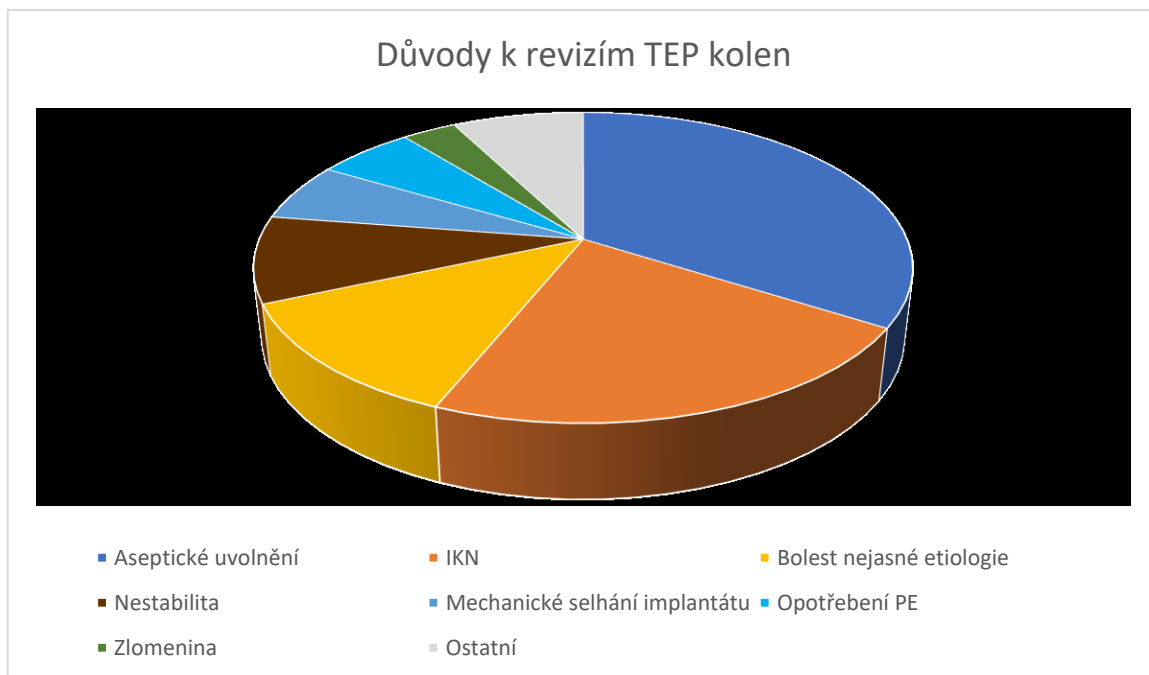
Indikace k revizní operaci. Revizní operace kloubních náhrad mají celou škálu možných indikací. Infekce kloubní náhrady zaujímá stále větší podíl mezi příčinami revizních operací kloubních náhrad. Tento trend má pravděpodobně několik příčin. Zaprvé je to samozřejmě pokrok v operační technice a vývoji implantátů, který vedl ke snížení incidence aseptického uvolnění a mechanického selhání implantátů. Na druhé straně k primární náhradě indikujeme stále rizikovější polymorbidní pacienty. Obezita a diabetes již dávno nejsou na seznamu kontraindikací, ovšem počet pacientů s těmito civilizačními chorobami roste. V neposlední řadě se rozšiřují infekce multirezistentními bakteriálními kmeny [169].

Český Národní registr kloubních náhrad nejčastěji eviduje následující důvody k revizím TEP kyčlí: Aseptické uvolnění, recidivující nebo zavřeně nereponibilní luxace, infekce kloubní náhrady, periprotetická fraktura, otěr polyethylenové vložky, osteolýza, mechanické selhání implantátu, paraartikulární osifikace, neřešitelná bolest kyčle, hematom. Graf 1.2. znázorňuje podíl jednotlivých příčin na celkovém počtu revizních TEP kyčlí [320].



Graf 1.2: Důvody k revizím TEP kyčle podle výstupu z Národního registru kloubních náhrad České republiky za léta 2003 – 2012 [320].

U TEP kolen jsou příčiny revizí mírně odlišné: V pořadí od nejčastější se jedná o aseptické uvolnění, infekci, nestabilitu, mechanické selhání implantátu, bolesti nejasné etiologie, opotřebení polyethylenu a kloubní ztuhlost. Ostatní příčiny jsou zastoupeny jen okrajově a jejich detailní soupis přináší tabulka 1.2. [389].



Graf 1.3: Důvody k revizím TEP kolen podle výstupu z Národního registru kloubních náhrad České republiky za léta 2015 – 2019 [389]

Ostatní národní registry hlásí podobná zjištění jako Národní registr kloubních náhrad ČR. Počet implantovaných TEP ve Velké Británii roste. V roce 2010 bylo implantováno 75 513 TEP kyčlí a 81 733 TEP kolen. V roce 2018 potom 97 792 TEP kyčlí a 102 944 TEP kolen [371]. Infekce kloubní náhrady byla příčinou 9,87 % revizních operací TEP kyčlí a 25 % TEP kolen. Podíl infekcí na všech indikacích má dlouhodobě pomalý vzestupný trend.

Švédsko je jednou ze zemí s největší incidencí primárních TEP. V roce 2017 bylo ve Švédsku implantováno 18 140 primárních TEP kyčlí, což odpovídá incidenci 353 TEP na 100 000 obyvatel starších 40 let. 3,4 % Švédů nosí alespoň jednu TEP kyčle. Incidence primárních TEP kolen je ve Švédsku srovnatelná: v roce 2018 implantovali 15 430 TEP kolen, tedy 151,6 TEP kolena na 100 000 obyvatel všech věkových kategorií. Kromě toho vede Švédsko vypracovaný registr kloubních náhrad, a proto se již tradičně odkazuje na švédská data při srovnávání výsledků. Příčina revizí TEP kyčlí byla v roce 2017 ve 22 % infekce kloubní náhrady, v případě kolen v roce 2018 dokonce 30 %. Pozorujeme výrazně rostoucí trend: v roce 1999 zaujímala IKN pouze 6 % [385][386].

Pro srovnání také poslouží data z amerického registru kloubních náhrad (AJRR, American Joint Replacement Registry). Tento registr je však mladší (byl založen teprve v roce 2012) a zatím do něj vkládá data menšina amerických ortopedických oddělení. V roce 2016 bylo do AJRR registrováno 102 901 TEP kyčlí, z toho 5056 při revizní operaci, a dále 150 455 TEP kolen, z toho 8047 při revizní operaci.

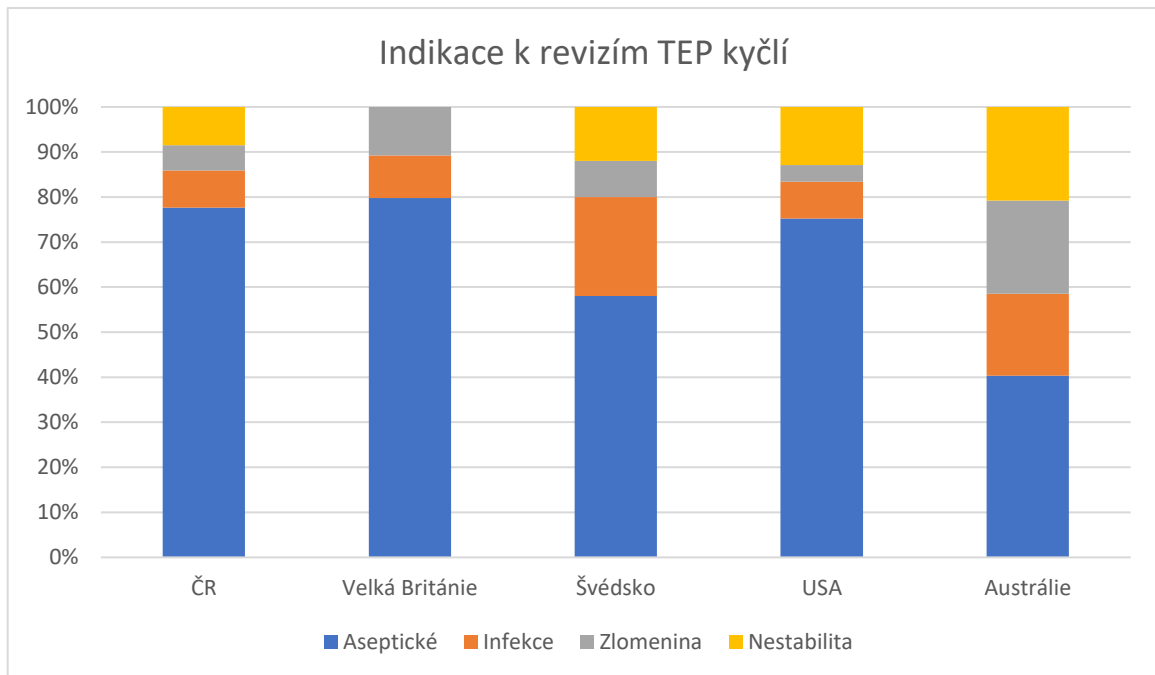
Důvod revize	Počet	Podíl
Uvolnění acetabulární komponenty aseptické	10 532	33,73 %
Uvolnění femorální komponenty aseptické	6 520	20,88 %
Hluboká infekce	2 497	8,00 %
Recidivující luxace	2 273	7,28 %
Periprotetická zlomenina	1 717	5,50 %
Opotřebením polyethylenové jamky	1 714	5,49 %
Osteolýza acetabula	1 157	3,71 %
Mechanické selhání implantátu	1 001	3,21 %
Druhá doba dvoudobé reimplantace	909	2,91 %
Femorální osteolýza	847	2,71 %
Ostatní	611	1,96 %
Paraartikulární osifikace	606	1,94 %
Nereponibilní luxace	296	0,95 %
Bolest bez jasného uvolnění	223	0,71 %
Hematom v ráně	184	0,59 %
Bolest a omezení rozsahu pohybu	59	0,19 %
Dehiscence či nekróza rány	37	0,12 %
Bolest nejasné etiologie nebo lokalizace	17	0,05 %
Pakloub velkého trochanteru	7	0,02 %
Recidivující hydroks bez zjištěné příčiny	4	0,01 %
Nelze zjistit	3	0,01 %
Cévní komplikace	2	0,01 %
Pouhé omezení rozsahu pohybu	2	0,01 %
Poškození nebo iritace nervu	2	0,01 %
Celkový počet registrovaných revizí	24 145	
Celkový počet registrovaných indikací (povoleno více indikací u jednoho kloubu)	31 220	100,00 %

Tabulka 1.1: Detailní rozpis jednotlivých indikací k revizi TEP kyčle a jejich poměrné zastoupení. Převzato z výstupu z Národního registru kloubních náhrad České republiky za léta 2003 – 2020 [389].

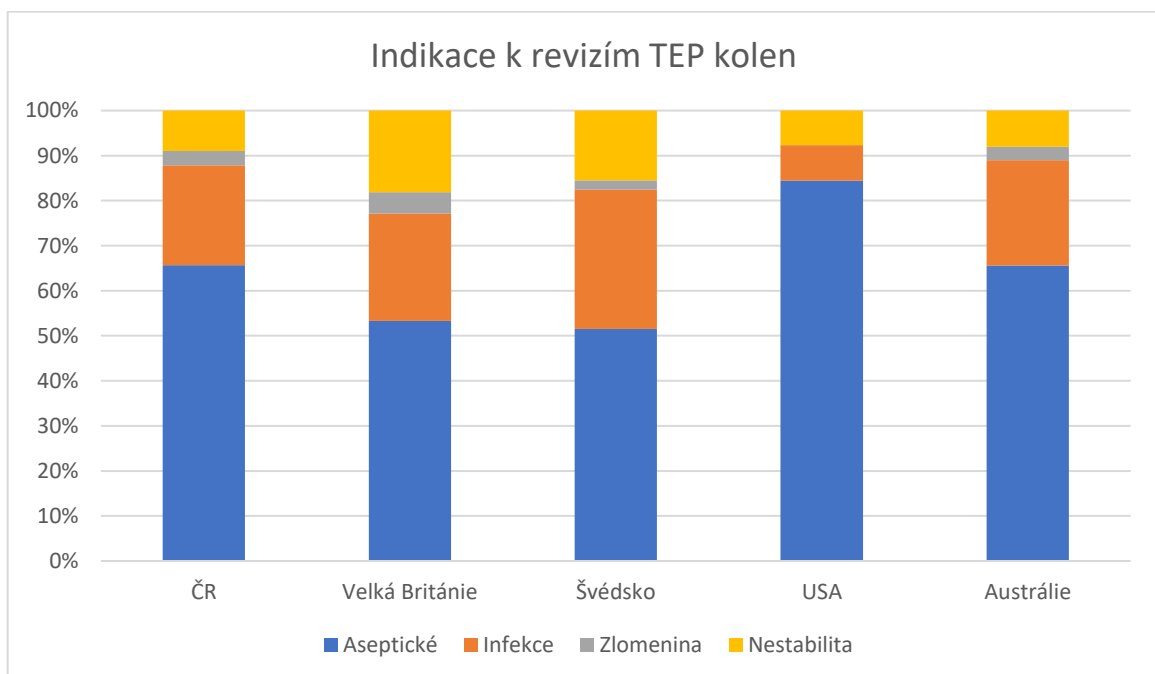
Odhaduje se, že skutečný počet primoimplantací v USA je čtyřikrát vyšší [276]. Pro účely epidemiologických a ekonomických studií a předpovědí dalšího vývoje se pracuje s odhady na základě dat o hospitalizacích z Nationwide Inpatient Sample (NIS). Dle těchto odhadů bylo v roce 1990 v USA implantováno 138 400 TEP kyčlí, v roce 2003 potom 202 500 primárních TEP kyčlí a 402 100 primárních TEP kolen [169]. V téže roce bylo v USA provedeno 36 000 revizních operací TEP kyčlí a 32 700 revizních operací TEP kolen [167]. V roce 2014 počty primoimplantací v USA vzrostly na 370 770 TEP kyčlí a 680 150 TEP kolen, tedy více než milion operací ročně [276]. Největší nárůst byl hlášen mezi lety 2000 – 2008, kdy měla křivka exponenciální tvar.

Důvod revize	Počet	Podíl
Hluboká infekce	915	20,67 %
Uvolnění tibiální komponenty aseptické	788	17,80 %
Uvolnění femorální komponenty aseptické	604	13,65 %
Instabilita	271	6,12 %
Mechanické selhání implantátu	249	5,63 %
Druhá doba dvoudobé reimplantace	239	5,40 %
Bolest bez zřetelného uvolnění	184	4,16 %
Anterior knee pain	172	3,89 %
Opotřebení a polyethylenový otěr femorotibiálně	154	3,48 %
Jiná příčina	122	2,76 %
Bolest a omezení rozsahu pohybu	113	2,55 %
Periprotetická zlomenina femuru	94	2,12 %
Opotřebení polyethylenové vložky	70	1,58 %
Pouhé omezení rozsahu pohybu	39	0,88 %
Bolest nejasné etiologie nebo lokalizace	38	0,86 %
Artrofibróza nebo osifikace	38	0,86 %
Luxace česky	38	0,86 %
Hematom v ráně	34	0,77 %
Recidivující hydrops bez zjištěné příčiny	34	0,77 %
Dehiscence či nekróza rány	33	0,75 %
Luxace femorotibiální	32	0,72 %
Desaxace femorotibiální	30	0,68 %
Periprotetická zlomenina tibie	28	0,63 %
Desaxace extenčního aparátu	22	0,50 %
Ruptura ligamentum patellae	12	0,27 %
Uvolnění patelární komponenty aseptické	11	0,25 %
Opotřebení a polyethylenový otěr patelárně	11	0,25 %
Ruptura m. quadriceps	11	0,25 %
Paraartikulární osifikace	9	0,20 %
Repozice nereponibilní luxace	9	0,20 %
Nelze zjistit	7	0,16 %
Zlomenina česky bez implantátu	6	0,14 %
Clunk syndrom	6	0,14 %
Periprotetická zlomenina náhrady pately	3	0,07 %
Celkový počet registrovaných revizí	3 468	
Celkový počet registrovaných indikací (povoleno více indikací u jednoho kloubu)	4 426	100,00 %

Tabulka 1.2: Detailní rozpis jednotlivých indikací k revizím TEP kolen a jejich poměrné zastoupení. Převzato z výstupu z Národního registru kloubních náhrad České republiky za léta 2015 – 2020 [389].



Graf 1.4: Srovnání zastoupení jednotlivých indikací k revizím TEP kyčlí v různých národních registrech. ČR = Výstup z Národního registru kloubních náhrad za období 2003 – 2020, Austrálie = Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry (výroční zpráva 2019), Švédsko = Swedish Hip Arthroplasty Register (výroční zpráva 2017), Velká Británie = National Joint Registry of England, Wales, Northern Ireland, and the Isle of Man (výroční zpráva 2018), USA = American Joint Replacement Registry (výroční zpráva 2019).



Graf 1.5: Srovnání zastoupení jednotlivých indikací k revizím TEP kolen v různých národních registrech. ČR = Výstup z Registru kloubních náhrad za období 2015 – 2020. Austrálie = Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry (výroční zpráva 2019), Švédsko = Swedish Knee Arthroplasty Register (výroční zpráva 2019), Velká Británie = National Joint Registry of England, Wales, Northern Ireland, and the Isle of Man (výroční zpráva 2018), USA = American Joint Replacement Registry (výroční zpráva 2019).

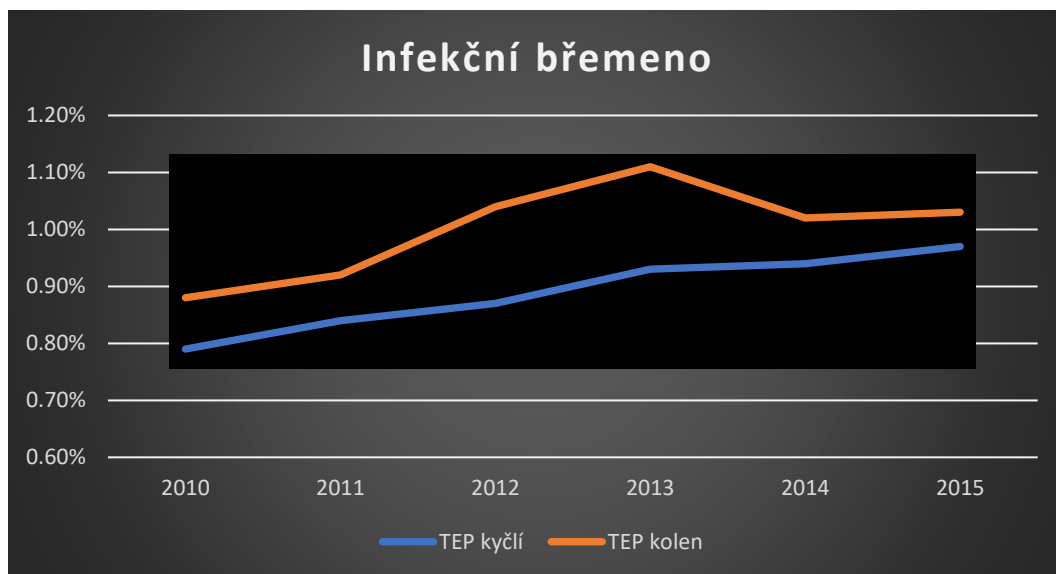
Infekční břemeno. Revizní břemeno je definováno jako poměr počtu revizních operací ku počtu všech primárních a revizních operací v dané zemi v daném roce. Podobně infekční břemeno znamená počet infekčních revizních operací vztážený k celkovému počtu všech primárních i revizních operací s kloubní náhradou v dané zemi a daném roce [200]. Je jasné, že při výpočtu dáváme do vztahu infekční komplikace jiných pacientů než těch, kteří byli operováni v běžném roce. Infekční a revizní břemeno slouží jako nástroje srovnání jednotlivých pracovišť nebo národních registrů. Největší infekční břemena pravidelně hlásí neuniverzitní nemocnice ve velkých městech. Univerzitní nemocnice mají infekční břemena nižší a nejnižší břemena vykazují okresní pracoviště. Je však třeba nezapomínat, že část pacientů je k revizní operaci referována „na vyšší pracoviště“, což statistika nezohledňuje. Na okresních pracovištích potom vycházejí nepravdivě milosrdnější výsledky [169]. Riziko, že jedna konkrétní kloubní náhrada bude postižena infekcí, je pravděpodobně na větších pracovištích menší, než na okresních odděleních [161].

Registr	Infekční břemeno 2015 – TEP kyčlí	Infekční břemeno 2015 – TEP kolen
Austrálie	0,76 %	0,88 %
Nový Zéland	1,00 %	1,20 %
Švédsko	1,24 %	1,28 %
Velká Británie	0,94 %	0,94 %
AJRR	0,91 %	0,85 %
Nevážený průměr	0,97 %	1,03 %

Tabulka 1.3: Infekční břemeno dle dat vybraných národních registrů kloubních náhrad. Vysvětlivky: Austrálie = Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry, Nový Zéland = New Zealand Joint Registry, Švédsko = Swedish Hip Arthroplasty Register, resp. Swedish Knee Arthroplasty Register, Velká Británie = National Joint Registry of England, Wales, Northern Ireland, and the Isle of Man, AJRR = American Joint Replacement Registry. Převzato z [283]

Ve Velké Británii je infekční břemeno TEP kolen a kyčlí menší než 1 %. V letech 2012 – 2017 měly primární TEP kyčlí incidenci IKN 0,6 %, primární TEP kolen 0,5 %. Revizní TEP kyčlí 1,3 %, revizní TEP kolen 1,4 %. Větší riziko (1,7 %) mají pacienti s avaskulární nekrózou hlavice femuru jako indikací k primární TEP kyčle. Infekcí nejvíce ohroženy jsou TEP revidované kvůli periprotetické fraktuře (5,1 %). [320]

Kumulativní incidence infekce kloubní náhrady je podíl pacientů určitého souboru, kteří za určitou dobu sledování utrpěli infekční komplikaci. Na rozdíl od infekčního břemene se nedá vypočítat z údajů běžného roku, ale vyžaduje delší sledování souboru konkrétních pacientů (obvykle 2 roky, 5 nebo 10 let). Čím delší sledování, tím vyšší kumulativní incidence IKN. V USA se udává kumulativní incidence IKN po 1. roce 0,5 %, po pěti letech 0,8 % a po deseti letech 1,4 %. Největší riziko IKN je v prvních 2 letech po implantaci [309]. Pacienti s větším počtem náhrad mají i úměrně vyšší riziko IKN. To se dá jednoduše kvantifikovat pomocí součinu počtu TEP a let, po které jsou implantovány: Riziko hematogenní IKN je v prvních dvou letech 5,9/1000 klouboroků, v dalších letech 2,3/1000 klouboroků po celý zbytek životnosti protézy [284].



Graf 1.6: Vývoj hodnoty infekčního břemene v letech 2010 – 2015. Nevážený průměr z národních registrů Austrálie, Nového Zélandu, Švédska, Velké Británie a USA. Převzato z [283]

Kumulativní incidence infekce TEP kolena po 2 letech ve Velké Británii je 3,2/1000 po primární náhradě a 14,4/1000 po revizní operaci [367]. Infekce kloubních náhrad jsou stále častější komplikací primárních i revizních operací. Od roku 2005 do roku 2013 vzrostla incidence časných infekcí po primoimplantacích 2,5krát a po revizních operacích až 7,5krát. Ve Velké Británii se v roce 2013 provedlo přes 1000 revizních operací kvůli IKN, což je 2,8násobný nárůst proti roku 2005. Ovšem počet primoimplantací ve stejném období vzrostl 2,1krát a počet aseptických revizí 2,9krát. Prevalence infekce primárních náhrad kolenních kloubů ve Velké Británii je 5,39/1000, prevalence infekce revizních náhrad 21,14/1000.

Odhaduje se, že roční incidence všech chronických onemocnění spojených s bakteriálním biofilmem v USA je 17 miliónů nových případů (zahrnutý mj. chronické rány, bércové vředy, katetrové infekce, endokarditidy, dekubity, peptické vředy, kolpitidy, cholecystitidy atd.), z toho 112 000 případů ročně postihuje ortopedické a traumatologické implantáty [334]. U TEP kyčlí bylo v roce 2017 v USA revizní břemeno 4 %, u TEP kolen 5 % [352]. Infekční břemena jsou v souladu s ostatními národními registry – 0,91 % pro TEP kyčlí a 0,85 % pro TEP kolen [283]. Z uvedeného můžeme odhadnout, že absolutní počet IKN v USA je kolem 8000 případů ročně.

Skutečná incidence infekcí kloubních náhrad je pravděpodobně vyšší než ta, kterou uvádí národní registry kloubních náhrad – uvádí se o 40 %. Pracoviště obvykle nekládají do registrů všechny revizní operace a málokdy změni diagnózu poté, co kulturační výsledky prokážou, že domnělá aseptická revize byla ve skutečnosti jednodobou léčbou mitigovaného infektu [131]. 27 % dvoudobých reimplantací registrovaných do Národního registru kloubních náhrad Anglie, Walesu, Severního Irsku a ostrova Man, má evidovanou pouze jednu ze dvou operací [367].

Pro srovnání: Incidence IKN po primární totální endoprotéze hlezna (tedy infekční břemeno) se uvádí 13 % [282].

Infekční břemeno revizních náhrad. Je všeobecně známo, že infekce kloubní náhrady má u revizních operací vyšší incidenci než u primárních náhrad. Revizní náhrady mají kratší dobu přežití než

primární náhrady [187]. Příčiny selhání revizních TEP kyčlí jsou infekce (30,2 %), nestabilita (25,1 %), aseptické uvolnění (19,4 %) a periprotetická fraktura (15 %). Pětileté přežití revizních TEP kyčlí je 84,8 %, pokud byla reimplantace kvůli aseptickému selhání. Pětileté přežití je však výrazně nižší, pouze 67 %, pokud reimplantace následovala po infekci kloubní náhrady [148]. Pro srovnání: 25leté přežití primárních TEP kolen je 82,3 % [88] a 25leté přežití primárních TEP kyčlí je 57,9 % [89].

1.3.2. Nejčastější původci infekcí kloubních náhrad

Většina infekcí kloubních náhrad je způsobena dvěma hlavními bakteriálními druhy: *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* [393]. Tyto dva druhy se v závislosti na geografické poloze střídají o první místo pomyslného žebříčku IKN. *S. aureus* je nejčastější v USA, *S. epidermidis* vítězí v kontinentální Evropě [11]. *Staphylococcus aureus* je vůbec nejrozšířenějším původcem infekčních komplikací v ortopedii a spondylochirurgii (33 %), u necementových TEP kyčlí ve Velké Británii vyvolává dokonce 44 % infekcí [384]. Další často zmiňovaní původci IKN jsou *Pseudomonas aeruginosa*, streptokoky, enterokoky, enterobakterie a *Cutibacterium acnes*. Vzácnější jsou potom *Staphylococcus lugdunensis*, kvasinky a mykobakteria.

Staphylococcus aureus se stal předmětem asi nejvíce studií zaměřených na infekce kloubní náhrady. Ze dvou nejčastějších původců IKN je ten virulentnější. Působí časně pooperační a akutní hematogenní infekce kloubních náhrad. Mezi jeho faktory virulence patří celá řada toxinů, schopnost tvořit biofilm, varianty malých kolonií, přežívání uvnitř savčích buněk, a samozřejmě stále se rozšiřující antibiotická rezistence. Zlatý stafylokok dokáže unikat fagocytóze a do jisté míry inaktivovat procesy buněčné i humorální imunity. Navzdory tomu, že je asi nejvíce prozkoumanou bakterií, stále nemáme spolehlivý způsob, jak vyléčit infekci kloubní náhrady způsobenou tímto druhem, obzvláště pokud čelíme kmenům rezistentním k oxacilinu.

Koaguláza-negativní stafylokoky (KNS) patří celosvětově k nejčastějším vyvolavatelům infekcí kloubních náhrad. Jejich společnou vlastností je široce rozšířená rezistence proti mnoha antibiotikům, včetně protistafylokokových antibiotik. Rezistence proti oxacilinu je běžným jevem a velkou hrozbou je stále se rozšiřující rezistence proti vankomycinu [73]. Koaguláza-negativní stafylokoky jsou schopni tvůrci biofilmů a často vyvolávají nosokomiální nákazy katetrů, chlopenních náhrad, ventrikulo-peritoneálních shuntů a ortopedických implantátů. Nejlépe adherují k povrchům tvořeným syntetickými polymery [326]. Infekce vyvolané KNS mají obvykle chronický mitigovaný průběh, případně zůstávají nepoznány a bývají mylně léčeny jako aseptické selhání implantátu.

Staphylococcus epidermidis žije jako komensál na pokožce člověka. Je typickým zástupcem skupiny KNS a odpovídá výše popsané charakteristice. Na rozdíl od zlatého stafylokoka vybaveného množstvím toxinů nedisponuje *S. epidermidis* mnoha patogenními mechanismy a jeho strategie je založená na schopnosti přežívání v nepříznivých podmínkách a na antibiotické rezistenci [353]. Jediný toxin *S. epidermidis* je modulin rozpustný ve fenolu (PSM). Ani ten není tvořen kmeny s defektem genu *agr* quorum-sensing systému [232]. Proto *S. epidermidis* nevyvolává bouřlivou imunitní reakci a může na povrchu implantátů dlouho skrytě přežívat.

Staphylococcus lugdunensis byl poprvé popsán v roce 1988 jako nový druh koaguláza-negativního stafylokoka, fenotypicky blízký *S. hominis* [99]. *S. lugdunensis* je běžný komensál inguinální krajiny člověka schopný infikovat operační rány, implantáty a cévní i močové katetry. *S. lugdunensis* bývá izolován i jako původce infekční endokarditidy [315]. Genetická analýza prokázala, že kmeny vyvolávající infekce operačních ran jsou totožné s běžnými kmeny kožní flóry [316]. Na rozdíl od jiných koaguláza-negativních stafylokoků není antibiotická rezistence u *S. lugdunensis* tolik rozšířená, avšak

průběh infekce bývá naopak fulminantní; v mnohém připomíná invazivní infekci *S. aureus*, a dokonce by se měla stejně i léčit. *S. lugdunensis* tedy obvykle způsobuje akutní pooperační infekci kloubní náhrady, ale jsou popsány i případy chronických mitigovalých infekcí diagnostikovaných až 10 let po implantaci. *S. lugdunensis* preferenčně infikuje TEP kolen, u kyčlí není tak častý [13]. Testy antibiotické citlivosti prokázaly, že různé kmeny *S. lugdunensis* získávají i rezistence založené na různých mechanismech [98]. Většina kmenů *S. lugdunensis* nedisponuje β -laktamázu, a proto jsou citlivé k penicilinům [292]. Některé kmeny *S. lugdunensis* produkují vázanou koagulázu (shlukovací faktor), a proto bývají v rychlém koagulázovém testu mylně identifikovány jako *S. aureus*. K omylu může přispět ještě tvorba žlutého pigmentu a DNázy. Narozdíl od *S. aureus* však nemají volnou koagulázu, takže mohou být odlišeny dlouhým koagulázovým testem [13]. Hlavními faktory virulence *S. lugdunensis* jsou fibrinogen vázající protein a von Willebrandův faktor vázající protein. Tyto faktory nesou hlavní podíl na schopnosti bakterie přilnout ke tkáním a umělým povrchům implantátů. Nejsou stabilně přítomny u všech kmenů *S. lugdunensis* [290][226].

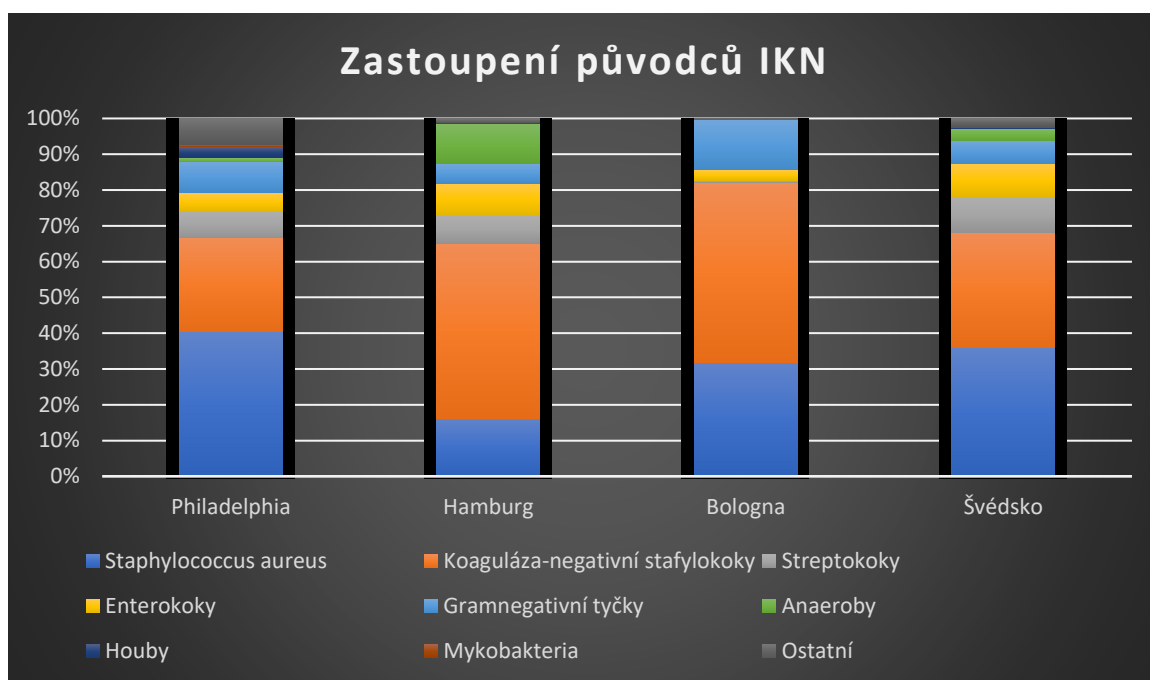
Další koaguláza-negativní stafylokoky, které se vyskytují v protetických kloubech, jsou *S. hominis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* a *S. cohnii*.

Původce	Počet pacientů v souboru:	
	Philadelphia 2000 – 2011	Hamburg 2000 – 2011
	772	898
<i>Staphylococcus aureus</i>	31,0 %	13,0 %
Koaguláza-negativní stafylokoky	20,2 %	39,3 %
Streptokoky	5,8 %	6,5 %
Enterokoky	3,9 %	7,0 %
Gramnegativní bakterie	6,6 %	4,3 %
Anaeroby	0,9 %	9,0 %
Houby	2,3 %	0,3 %
Mykobakterie	0,6 %	0,0 %
Ostatní	5,5 %	0,9 %
Polymikrobiální nález	7,4 %	3,4 %
Negativní	15,8 %	16,1 %

Tabulka 1.4: Četnost původců infekce kloubní náhrady v Německu a v USA. Převzato z [1]

Pseudomonas aeruginosa je gramnegativní tyčinka neschopná fermentovat glukózu. Díky své přizpůsobivosti je v přírodě velice rozšířená, nachází se například v odpadních vodách, na rostlinách a v půdě. Pro člověka není primárním, ale oportunním patogenem. Kolonizuje dýchací a močové cesty a u imunokompromitovaných pacientů způsobuje katetrové infekce a infikuje nejrůznější implantáty. Multirezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa* typicky způsobují nosokomiální nákazy. Pseudomonáda je zdatným tvůrcem silného biofilmu a snadno získává rezistenci k většině známých antibiotik, proto je obzvláště obávaná mezi pacienty s cystickou fibrózou nebo infekcí kloubních náhrad. Kloubní náhrady napadá spíše u starších polymorbidních pacientů, typicky po břišních nebo urologických operacích [268]. Výsledky léčby pseudomonádové IKN jsou špatné [348]. V našich podmínkách vyvolává *P. aeruginosa* infekce kloubních náhrad vzácně, ale v Itálii je po stafylokocích třetím nejčastějším původcem IKN [210].

Houby. Infekce kloubní náhrady způsobené houbami jsou v našich podmínkách extrémně vzácné. V USA zaujímají 2,3 % případů a v drtivé většině je původcem rod *Candida* [1]. Houby obvykle napadají pacienty s permanentní katetrizací nebo defektem buněčné imunity, způsobeným imunosupresivou, malignitou, HIV, tuberkulózou, a dále pacienty závislé na intravenózních drogách. Pacienti bez imunodeficitu jsou náchylnější k mykotické IKN, pokud implantaci protézy předcházelo mnoho výkonů nebo rozsáhlá rekonstrukce dotčeného kloubu. V prostředí se subinhibiční koncentrací antimykotik se sice zhoršuje schopnost kvasinek tvořit biofilm, ale zralý biofilm *Candidy* je téměř úplně rezistentní na jakoukoliv léčbu antimykotiky.



Graf 1.7: Zastoupení původců IKN v různých zemích. Převzato z [1][210][285]

Cutibacterium acnes (do roku 2016 nazývané *Propionibacterium acnes*) je aerotolerantní anaerobní pomalu rostoucí grampozitivní tyčinka působící jako nízké virulentní původce mitigovaných infekcí kloubních náhrad. Fyziologicky se vyskytuje jako komensál v sebaceózních žlázách obličeje, ramen, hrudníku a zad [313]. Z hlediska diagnostiky IKN je *C. acnes* důležité proto, že často uniká mnohým diagnostickým vyšetřením a infekce *C. acnes* jsou dlouho nepoznány a klasifikované jako aseptické selhání protézy pro negativitu všech předoperačních i peroperačních testů. Autoři všech souborů diagnostických kritérií varují, že nesplnění diagnostických kritérií pro infekci kloubní náhrady automaticky tuto diagnózu nevylučuje, a uvádějí právě *C. acnes* jako původce, který diagnostice uniká v případě falešně negativních předoperačních testů. Díky svému běžnému výskytu v oblasti ramen je *C. acnes* častěji nalezeno v TEP ramene než v TEP nosných kloubů. V našich podmínkách se vykultivuje velmi zřídka, ale v západní Evropě a USA je udáváno jako jeden z nejčastějších původců IKN [246]. 15 % všech předpokládaných aseptických revízií TEP ramen má pozitivní peroperační kultivaci nízké virulentního původce, z toho v 67 % případů *C. acnes*. Je chybou takový kultivační výsledek *a priori* považovat za pouhou kontaminaci [95]. *C. acnes* bylo dlouho přehlíženo, ale kromě mitigovaných chronických dlouho nepoznaných infekcí hraje ještě jednu podstatnou roli ve vícedruhových biofilmech: zvyšuje virulenci jiných bakteriálních druhů. *S. aureus* vykazuje výraznější β -hemolýzu, agregaci a tvorbu biofilmu v přítomnosti *C. acnes* než tam, kde je vykultivován samotný [189][390]. Společný biofilm *C. acnes* a *S. aureus* je silnější než biofilm každé bakterie samotné a zůstává viabilní

několik dní poté, co biofilm samotného *S. aureus* vyčerpá dostupné živiny a bakterie v něm uhynuly [313].

Vzácní původci. Na dolních příčkách v tabulkách četnosti původců najdeme rody *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Serratia*, *Aeromonas* a dále druhy *Listeria monocytogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Morganella morganii*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica* a *Finnegoldia magna* [1][210][285].

Zastoupení jednotlivých původců je výrazně proměnlivé v závislosti na geografické poloze a sledujeme též rychlé trendy v horizontu několika let. Zajímavostí je, že v USA je mnohem častější *S. aureus* než koaguláza-negativní stafylokoky, zatímco v Německu je poměr opačný. V USA je výrazně vyšší výskyt virulentnějších kmenů a antibiotických rezistencí. 48,1 % zlatých stafylokoků způsobujících IKN v USA je meticilin-rezistentních, zatímco v Německu je zastoupení MRSA mezi zlatými stafylokoky jen 12,8 %. Z toho vyplývá i postoj Němců k užití vankomycinu – považují ho za záložní ATB pouze pro případy prokázané rezistence k meticilinu. Naopak v USA se nasazuje vankomycin liberálně, např. při alergii na penicilin [1]. Tabulka 1.4 srovnává četnost původců IKN na dvou velkých pracovištích: Rothmanův institut, Philadelphia, USA, a HELIOS ENDO-Klinik Hamburg, Německo. Studie proběhly současně ve spolupráci německých i amerických autorů, pracují na podobně velkých souborech a se stejným obdobím. Pro srovnání přináší Graf 1.7 ještě dva menší soubory. Švédský soubor pracuje se 426 pacienty z období 1986-2000 [285] a v boloňském souboru je 164 pacientů z let 2007-2011 [210].

1.3.3. Rizikové faktory infekce kloubní náhrady

V průběhu posledních desetiletí bylo prokázáno několik desítek rizikových faktorů infekce kloubní náhrady. Pro klinika mají samozřejmě význam ovlivnitelné rizikové faktory.

Rizikové faktory na straně pacienta. Mezi rizikové faktory infekce kloubní náhrady patří například mužské pohlaví, věk, obezita, diabetes, demence, předchozí infekční artritida v místě implantátu a některé primární diagnózy indikující implantaci TEP – fraktura krčku femuru a avaskulární nekróza hlavice femuru [178].

Diabetes mellitus zvyšuje riziko infekce kloubní náhrady 2,28krát [203]. Obezita již není řazena mezi kontraindikace totální náhrady kloubu, protože obézní pacienti mají srovnatelný prospěch z operace a přežití implantátu jako pacienti s normální hmotností. Problémem je ovšem horší vaskularizace podkoží, nutnost širšího operačního přístupu, delší operační čas a insulinová rezistence, která zhoršuje funkci leukocytů – všechno rizikové faktory pro rozvoj IKN [5].

Nikotin způsobuje mikrovaskulární konstrikci a zhoršuje prokrvení tkání, čímž zpomaluje hojení po operaci. Vitamin D hraje klíčovou roli v hemostáze v kostních trámčích a jeho nedostatek vede k větším pooperačním hematomům, které mohou případně zavlečené bakterie využít jako své kultivační médium. Prevalence deficience vitamínu D v populaci USA je 41,6 % [94]. Systémová zánětlivá onemocnění zvyšují riziko infekce kloubní náhrady výrazně. U revmatoidní artritidy je relativní riziko 1,7. Zánětlivé artropatie však zůstávají jednou z hlavních indikací k implantaci kloubní náhrady a revmatiky kvůli zvýšenému riziku IKN kontraindikovat nelze. Pro peroperační období se tedy alespoň upravuje imunosupresivní léčba. Revmatici mají zvýšené riziko nejen IKN, ale i riziko jiných komplikací, jako jsou periprotetické fraktury, ztuhlost kloubu a patelofemorální poruchy [195].

Riziko infekce nové kloubní náhrady u pacientů, kteří již v minulosti prodělali IKN jiného kloubu, je trojnásobné v porovnání s pacienty, kteří nikdy IKN neměli (poměr rizik 3,3). Kumulativní incidence IKN po 10 letech vyšla 6,1 % u pacientů, kteří již měli IKN na jiném kloubu, a pouze 2,6 % u pacientů, kteří před implantací IKN neměli. U pacientů, kteří užívali dlouhodobou ATB supresi k léčbě předchozí

IKN, a kterým se přesto implantovala nová kloubní náhrada na jiný kloub, vyšel poměr rizik 15. Většina z těch, kterým se infikovala i druhá náhrada, měli podruhé jiného původce, než na kterého užívali ATB supresi [42].

Pokud po implantaci TEP kolena byla chirurgická revize podkoží pro poruchu hojení rány (débridement, sekundární sutura), vzrostla až desetinásobně pravděpodobnost následné infekce kloubní náhrady a nutnosti velké revizní operace [104].

Špatná dentální hygiena ohrožuje implantát hematogenní infekcí nejen v době implantace, ale po celou dobu jeho setrvání v těle pacienta. Každá významnější epizoda bakteriémie je pro ortopedické implantáty nebezpečná. Udává se, že fyziologická bakteriémie, která se vyskytne u zdravých lidí s dobrou dentální hygienou i několikrát denně, například po běžném čištění zubů, dosahuje hodnot kolem 50 CFU/ml. Hematogenní infekce kloubní náhrady může vzniknout při bakteriémii 1000 CFU/ml [347].

Rizikové faktory	
Ovlivnitelné	Neovlivnitelné
Permanentní katetrizace	Imunodeficit
Obezita	Dysplázie nebo novotvar imunitního systému
Malnutrice	Primární diagnóza – trauma, AVN
Diabetes mellitus	Předchozí infekční artritida v místě implantace
Chronická bakteriální infekce jinde v těle	Předchozí operace v místě implantace
Kouření	Předchozí ozáření v místě implantace
Alkoholismus	Porucha hojení rány po implantaci, hematoma
Abusus intravenózních drog	Předchozí IKN jiného kloubu
Užívání imunosupresiv	Zánětlivé artropatie
Nosičství <i>Staphylococcus aureus</i>	Demence
Deficit vitamínu D	Jaterní insuficience
Anémie	Chronická renální insuficience
Dlouhý operační čas	Plicní insuficience
Laterální operační přístup	Malignita
Cementovaná endoprotéza	Infekce HIV
Nadměrná antikoagulace	Mužské pohlaví
Cévní katetry a intravaskulární instrumentace	Věk

Tabulka 1.5: Souhrn nejdůležitějších rizikových faktorů infekce kloubní náhrady. Čerpáno z [5][208][244][242]

Vliv typu implantátu na riziko infekce. Incidence IKN u cementovaných TEP kyčlí je dle metaanalýzy na souboru 84 200 TEP kyčlí 0,5 %, zatímco u necementových TEP kyčlí jen 0,3 %, takže cementované TEP kyčle jsou pravděpodobně náchylnější k infekcím než necementové [341]. Vysvětluje se to tepelnou nekrózou tkání kolem polymerizujícího PMMA a inhibicí aktivace komplementu a práce polymorfonukleárních vlivem kontaktu s PMMA. Naopak slabinou necementových implantátů jsou častější hematomy a nerovný povrch, který usnadňuje adhezi bakterií [149].

In vitro bylo zjištěno, že adheze a tvorba biofilmu na keramickém povrchu je pro bakterie obtížnější než adheze k polyethylenu nebo slitině chromu, kobaltu a molybdenu [277]. Metaanalýza na souboru 193 378 pacientů však vyvrátila, že by tento fakt měl vliv na incidenci infekce TEP kyčle. Rozdíly mezi skupinami pacientů s různými artikulačními povrchy (keramický pár, keramika – polyetylen, kov – polyetylen) totiž nejsou statisticky signifikantní [139].

Rizikové faktory na straně lékařů. Délka operace má významný vliv na riziko infekce kloubní náhrady. Za každých 15 minut operačního času navíc roste riziko o 9 %. Na incidenci IKN nemá vliv zkušenost operátora, pokud se výrazně neprodlouží operační čas [178]. Protektivním faktorem je operace obou kolen současně (poměr rizik 0,51). Pacienti s celkovou anestézií mají IKN častěji než pacienti se spinální anestézií. Menší incidenci IKN měli pacienti, kterým byla rána irigována roztokem s antibiotiky [222]. Jakkoliv se to z vědeckého hlediska jeví jako nesmysl (antibiotika bez nosiče jsou ze tkání rychle odplavena a nemohou pokrýt celou rozhodující periodu), poslední bod dosáhl rovněž statistické významnosti. Antikoagulační prevenci hluboké žilní trombózy je třeba nastavit s ohledem na anamnézu a přidružené choroby pacienta tak, aby byla prevence účinná a zároveň nezpůsobila nadměrné krvácení a tvorbu hematomu, který je příznivým prostředím pro množení bakterií.

1.3.4. Epidemiologické předpovědi

Statistickí se zabývají analýzou vývoje počtu primoimplantací, revizí a infekcí kloubních náhrad v posledních letech, aby mohli vývojové křivky extrapolovat do blízké budoucnosti a předpovědět budoucí poptávku po konkrétních zdravotních službách. Tyto analýzy přicházejí z USA, kde mají vliv na zdravotní politiku státu.

Do roku 2030 se v USA očekává několikanásobný nárůst počtu primoimplantací na 635 000 TEP kyčlí a 935 000 TEP kolen ročně [276]. Nové odhady jsou střednější než práce z roku 2007 [167], která projekci budoucího vývoje založila na exponenciálním nárůstu počtu primoimplantací z počátku tisíciletí a předpovídala 572 000 primárních TEP kyčlí a 3,48 milionu primárních TEP kolen implantovaných v USA v roce 2030. Mezi lety 2008 a 2014 už se nárůst zpomalil v porovnání s nárůstem z let 2000 – 2008. Infekční břemeno vzroste na 6,5 % primárních TEP kyčlí a 6,8 % primárních TEP kolen. Infekce TEP kyčle bude v roce 2030 zaujímat podíl 47,5 % místo dnešních 8,4 % ze všech indikací k revizní operaci. U kolen bude nárůst ještě markantnější a 65,5 % všech revizních operací bude infekčních [168].

1.3.5. Náklady na léčbu

Náklady na léčbu infekce kloubní náhrady zahrnují cenu revizního implantátu, spotřebovaný operační materiál, cenu pobytu pacienta na nemocničním oddělení a na jednotce intenzivní péče, cenu lidské práce a cenu spotřebovaných léků. Variabilně lze také připočítat úslou mzdu pacienta během protrahované léčby a vyčíslit bolest a následné ztížení společenského uplatnění. Tyto položky se běžně používají v ekonomických analýzách v USA. Na výši celkových nákladů na léčbu IKN má vliv druh původce, imunitní stav a komorbidity pacienta, typ provedené operace a eventuální nutnost jejího opakování, druh použitých antibiotik a délka ATB protokolu. Výši nákladů je obtížné srovnávat mezi zeměmi kvůli rozdílné skladbě původců IKN, a hlavně kvůli rozdílné ceně lidské práce.

Průměrné náklady na léčbu infikované TEP kolena v ČR se udávají 405 864 Kč. Pokud je jako metoda léčby zvoleno DAIR, náklady klesají na 175 312 Kč; nejdražší variantou je přirozeně dvoudobá reimplantace s cenou 497 487 Kč [218]. V případě infikované TEP kyčle vychází průměrná cena léčby na 320 065 Kč [219].

Ekonomická analýza z USA dokládá průměrné náklady na léčbu infekce TEP kyčle 93 600 USD, v případě infikované TEP kolena 74 900 USD [170]. Zatímco revizní implantát v ceně statisíců Kč představuje v českých nemocnicích podstatnou položku celého účtu, v USA je jeho cena spíše okrajovou záležitostí.

1.4. Klasifikace infekcí kloubních náhrad

Pro klasifikaci infekcí kloubních náhrad se nabízí několik schémat. Smyslem každé klasifikace je mimo jiné poskytnutí vodítka, jak u konkrétního pacienta postupovat, aby se dosáhlo terapeuticky optimálního výsledku.

1.4.1. Coventry

Jako první navrhl rozdělení podle intervalu mezi implantací a nástupem prvních příznaků Mark B. Coventry v roce 1975 [54]. Z nástupu příznaků po operaci usuzoval na základní charakteristiku patogenního agens a typ infekce. Na tehdejší dobu šlo o geniální přístup. Ostatní klasifikace víceméně rozvíjejí tuto myšlenku a staví na ní.

1. **Akutní pooperační infekce** nastupující krátce po implantaci protézy. Bývají způsobeny zavlečením vysoce virulentního původce do operační rány v průběhu operačního výkonu nebo v pooperačním období.
2. **Opožděné infekce**, které se projevují více než 8 týdnů po operaci a mají mitigovaný průběh. Jejich původce je obvykle nízké virulentní a byl zřejmě taktéž zavlečen do operační rány během nebo krátce po operaci.
3. **Pozdní hematogenní infekce**, které mají rychlý nástup a fulminantní průběh podobně jako akutní pooperační infekce, ale přicházejí po různě dlouhém období bez obtíží vlivem hematogenního rozsevu vysoce virulentního původce z infekčního ložiska jinde v těle.

1.4.2. Tsukayama

Dean T. Tsukayama navrhl vlastní klasifikaci, která má jasný klinický význam, protože autor ve své práci [311] dále vysvětluje, jak se kterým typem infekce terapeuticky postupoval. Klasifikace dle Tsukayamy má čtyři typy infekce kloubní náhrady:

1. **Pozitivní peroperační kultivace**. Revize kloubní náhrady byla považována za infekční, pokud byl alespoň ze dvou z pěti peroperačně odebraných vzorků tkání vykultivován tentýž původce. Před operací byl však pacient považován za neinfekčního a ani během operace nebyly shledány žádné makroskopické známky infekčně změněných tkání. Tsukayama v těchto případech neprováděl další operace – pouze nasadil 6týdenní intravenózní antibiotickou terapii.
2. **Časná pooperační infekce** se vyvinula dříve než 1 měsíc po implantaci kloubní náhrady. Zde autor indikoval DAIR a nasadil 4týdenní intravenózní antibiotickou terapii.
3. **Pozdní chronická infekce** nastupuje pomalu více než 1 měsíc po implantaci a má plíživý průběh. U těchto případů Tsukayama prováděl dvoudobé reimplantace s různě dlouhou intravenózní ATB terapií.
4. **Akutní hematogenní infekce** následuje po potvrzené nebo předpokládané bakteriémii a je charakterizovaná akutním nástupem příznaků v místě protetického kloubu. Autor tyto případy řešil operací DAIR a 6týdenní intravenózní ATB terapií.

Tsukayama v pozdější práci rozdělil typ 2 na dva podtypy: infekce povrchová a hluboká [312]. Mnohými jinými autory je však důrazně nedoporučena klasifikace na povrchové a hluboké infekce, která může být pro další terapii zavádějící [347]. Vede totiž k pokusům vyléčit pacienta pouhou revizí prostoru nad hlubokou fascií (ev. nad kloubním pouzdem kolenního kloubu) ve snaze nezavléci domnělého původce z vyšších vrstev do hloubky k implantátu. Výsledkem může a nemusí být nepoznaná perzistující infekce v hlubších vrstvách a na implantátu, která se projeví později jako akutní,

subakutní nebo chronický infekt [227]. Tento postup některé pacienty připraví o možnost podstoupit méně náročnou operaci DAIR a zařadí je mezi pacienty, kteří mají dlouhodobou infekci kloubní náhrady, a musejí se tedy podrobit dvoudobé reimplantaci.

1.4.3. Trampuz a Zimmerli

Autory jednoho z nejoblíbenějších rozdělení jsou Andrej Trampuz a Werner Zimmerli [307], kteří jen lehce upravili klasifikaci Coventryho:

1. **Časné infekce** jsou definované jako infekce, jejichž první příznaky v místě implantace nastupují do uplynutí 3 měsíců od operace. Etiologie je exogenní, infekce je převážně způsobena vysoce virulentními mikroorganismy, např. *Staphylococcus aureus*.
2. **Opožděné („low-grade“) infekce** se manifestují od ukončeného 3. do ukončeného 24. měsíce po implantaci. Jsou způsobené exogenním (tedy peroperačním) zavlečením níže virulentního agens, např. některých koaguláza-negativních stafylokoků nebo *Cutibacterium acnes*.
3. **Pozdní infekce** jsou definované jako infekce začínající více než 24 měsíců po implantaci. Většina z nich je způsobena hematogenním rozsevem ze vzdáleného infekčního ložiska, např. kožních zánětlivých afekcí (*S. aureus*), zánětů dolních cest dýchacích (pneumokoky), trávicího ústrojí (*Salmonella*) nebo močových cest (*E. coli*)

1.4.4. McPherson

Hematogenní infekce kloubní náhrady může teoreticky nastoupit v jakémkoliv období po implantaci. V lepším případě je možné ji rozpoznat podle akutního hnisavého onemocnění jinde v těle, které jí předcházelo [231]. Je nasnadě, že infekce kloubní náhrady, jejíž příznaky nastoupily kolem 24. měsíce po implantaci, může být podle zatím zmíněných schémat v neurčitých případech klasifikována jako hematogenní nebo jako opožděná. V takových případech by chybná klasifikace vedla zcela jistě i k chybné volbě terapeutického postupu: u hematogenní infekce s akutním nástupem je indikováno DAIR, zatímco u opožděné infekce dvoudobá reimplantace. Proto Edward J. McPherson navrhuje další klasifikační schéma, které zohledňuje prudkost nástupu příznaků a stává se tak lepším vodítkem v podobných případech [208]:

- I. Časná pooperační infekce nastupující do ukončených 4 týdnů po implantaci.
- II. Hematogenní infekce, jejíž příznaky trvají méně než 4 týdny.
- III. Pozdní chronické infekce s příznaky trvajících déle než 4 týdny.

Součástí McPhersonovy klasifikace je dále i grading celkové morbidity pacienta a lokálního stavu. Celkový systémový stav pacienta po interní a imunologické stránce se hodnotí třemi stupni:

- A. Nekompromitovaný (tzn. u pacienta nebyly shledány žádné kompromitující faktory)
- B. Kompromitovaný (nalezen 1 nebo 2 kompromitující faktory)
- C. Těžce kompromitovaný (nalezeny více než 2 kompromitující faktory nebo jeden těžce kompromitující faktor)

Lokální stav končetiny se rovněž hodnotí třemi stupni:

1. Nekompromitovaný (tzn. u pacienta nebyly shledány žádné kompromitující faktory)
2. Kompromitovaný (nalezen 1 nebo 2 kompromitující faktory)
3. Těžce kompromitovaný (nalezeny více než 2 kompromitující faktory)

Seznam těžce kompromitujících faktorů
Absolutní počet neutrofilů menší než 1000/μl
Absolutní počet CD4 T lymfocytů menší než 100/μl
Abusus intravenózních drog
Chronická aktivní infekce na jiném místě v těle
Dysplázie nebo novotvar imunitního systému
Seznam kompromitujících faktorů
Věk nad 80 let
Alkoholismus
Chronická aktivní dermatitida nebo celulitida
Permanentní katetrizace
Malnutrice (tj. albumin pod 30 g/l)
Nikotinismus
Diabetes (vyžadující PAD nebo insulin)
Jaterní insuficience (cirhóza)
Užívání imunosupresiv (metotrexát, prednison, cyklosporin)
Malignita (aktivní, v remisi nebo vyléčená)
Plicní insuficience (parciální arteriální tlak kyslíku menší než 60 % normy)
Selhání ledvin vyžadující dialýzu
Systémové zánětlivé onemocnění (revmatoidní artritida, systémový lupus erythematodes)
Infekce HIV

Tabulka 1.6: Celkové kompromitující faktory pacienta podle McPhersona

Seznam lokálních kompromitujících faktorů
Přítomnost aktivní infekce v místě TEP déle než 3 měsíce
Více incizí (tvořící kostní mosty)
Ztráty měkkých tkání při předchozím traumatu
Podkožní absces větší než 8 cm²
Synoviální píštěl otevřená na povrch
Předchozí periartikulární zlomenina nebo kolemkloubní trauma (obzvláště drtivá poranění)
Předchozí ozáření oblasti operační rány
Cévní nedostatečnost končetiny (absence pulzu na končetině, chronická žilní insuficience, kalcifikující arteriální skleróza)

Tabulka 1.7: Lokální kompromitující faktory pacienta podle McPhersona

Tato klasifikace má už velký klinický význam. McPherson ve zmíněné práci dokládá, že pacienti s celkovými kompromitujícími faktory měli častěji pooperační komplikace a méně často se u nich podařilo úplně eradikovat infekci. U některých bylo nutné provést amputaci končetiny. Naopak pacienti v dobrém celkovém stavu se mnohem častěji dočkali vyléčení infekce a reimplantace protézy. Pacienti s lokálními kompromitujícími faktory potřebovali častěji lalokové operace ke krytí defektů měkkých tkání.

McPhersonovu klasifikaci kompromitujících faktorů pacienta jsme použili v řadě našich studií [111][289][359].

1.4.5. Další klasifikace

Na pracovišti autora disertační práce se používá modifikovaná klasifikace infekce kloubní náhrady Trampuze a Zimmerliho a původní klasifikace celkového stavu pacienta a lokálního stavu končetiny McPhersona. Infekce kloubní náhrady jsou rozděleny do sedmi skupin:

1. Časně infekce nastupující do 3 měsíců od implantace.
2. Opožděné („low-grade“) od ukončeného 3. do ukončeného 24. měsíce po implantaci.
3. Pozdní infekce začínající více než 24 měsíců po implantaci, pravděpodobně hematogenní.
4. Pozitivní peroperační kultivace u pacienta, jehož kloubní náhrada byla revidována pro předpokládané aseptické selhání.
5. Recidiva infekce kloubní náhrady v lokalizaci, kde již proběhla infekce kloubní náhrady. Izolován stejný původce jako při předchozím onemocnění.
6. Reinfekce kloubní náhrady v lokalizaci, kde již proběhla infekce kloubní náhrady. Izolován původce různý od původce předchozího onemocnění.
7. Šíření infekce *per continuitatem*, například z pánevního abscesu, abscesu m. iliopsoas nebo ze spondylodiscitidy do TEP kyčle, nebo infekce TEP kolena po erysipelu bérce

1.5. Prevence infekce kloubní náhrady

Infekce kloubní náhrady je závažnou komplikací endoprotetiky, která může v závislosti na virulenci původce, zvolené terapii a kondici pacienta končit úplným vyléčením, ale i mutilujícím výkonem, ztrátou končetiny, v krajním případě až úmrtím pacienta. Proto zde více než kde jinde platí anglické rčení, že unce prevence má cenu libry léku. Preventivní opatření jsou zaměřená na optimalizaci rizikových faktorů pacienta, minimalizaci nebezpečí zavlečení původce do rány během operace a antibakteriální úpravy implantátů. Ve výzkumu jsou i antibakteriální vakcíny.

1.5.1. Optimalizace rizikových faktorů pacienta

Modifikovatelných rizikových faktorů na straně pacienta byla popsána celá řada (kapitola 1.3.3.). U většiny pacientů se dá najít alespoň jeden rizikový faktor, který můžeme eliminovat nebo při nejmenším kompenzovat. Pouze 20 % pacientů před primární TEP a 7 % pacientů před revizní operací je připraveno k operaci tak dobře, že u nich žádný ovlivnitelný rizikový faktor není vyjádřen [251].

Diabetes mellitus. Před implantací TEP se doporučuje kompenzovat diabetes. Hyperglykémie sama zlepšuje podmínky pro pomnožení bakterií a špatná dlouhodobá kompenzace narušuje funkci imunitního systému. Ukazatelem dlouhodobé kompenzace diabetu je hladina glykovaného hemoglobinu. Ještě přesnějším prediktorem budoucí IKN než glykovaný hemoglobin je ovšem peroperační stresová glykémie, a to i u pacientů bez diabetu. Důsledná kontrola a korekce glykémie během operace a v časném pooperačním období snižuje riziko IKN [5]. Implantace kloubní náhrady se u diabetiků indikuje podle stejných principů jako u pacientů bez diabetu. Nicméně zvýšené riziko je třeba mít na paměti. Vhodné je prodloužení peroperační ATB profylaxe, použití antibiotického kostního cementu a nasazení ATB profylaxe u pozdějších chirurgických výkonů, které mohou být spojeny s bakteriemií. Samozřejmostí je šetrná operační technika a pečlivá sutura [290].

Malnutrice vede k horšímu hojení operační rány, tedy riziku zavlečení infekce v pooperačním období. V našich podmínkách je malnutrice vzácná a pojí se většinou se základním onemocněním (alkoholismus, malignita, onemocnění gastrointestinálního traktu). Je třeba nezapomínat na paradoxní malnutrici obézních pacientů, jejichž jídelníček je bohatý kaloricky, ale chudý na proteiny, vitaminy a esenciální mastné kyseliny. Indikátory paradoxní malnutrice jsou absolutní počet lymfocytů menší než 1500/μl, sérový albumin pod 35 g/l a transferin pod 2000 mg/l. Pacienti, kteří splňují alespoň jedno z těchto kritérií, by měli konzultovat výživovou poradkyni a odložit plánovanou operaci [84].

Kouření není silným rizikovým faktorem, nicméně jeho neblahý vliv na hojení operační rány lze eliminovat tím, že pacient zanechá kouření 4 týdny před plánovanou operací [188]. Dodržování zákazu kouření lze snadno ověřit stanovením sérové hladiny kotininu, metabolitu nikotinu.

Anémie patří k častějším rizikovým faktorům infekce kloubní náhrady. Pooperační anémie se často řeší alogenní transfuzí, která je ovšem spjata s vyšším rizikem infekce kloubní náhrady [294]. Je tedy vhodné korigovat anémii již předoperačně podáváním železa nebo erythropoetinu [251].

Infekce HIV se v poslední době přesouvá ze skupiny neovlivnitelných do skupiny modifikovatelných rizikových faktorů. HIV-pozitivní pacienti jsou sice v české endoprotetice raritou, ale zahraniční zdroje s nimi počítají jako s nezanedbatelnou menšinou [251]. Doporučuje se předoperační korekce počtu CD4 lymfocytů a virové nálože pomocí moderní vysoce aktivní antiretrovirové terapie. Pacienti s počtem CD4 lymfocytů vyšším než 200/μl a virovou náloží pod 10 000 částic v 1 ml krve mají riziko pooperační infekční komplikace srovnatelné s HIV-negativní populací [62].

Nosičství zlatého stafylokoka. Kolonizace nosní sliznice *S. aureus* je známým rizikovým faktorem IKN. Molekulární analýza prokázala, že IKN bývají způsobeny tímtež kmenem, který předoperačně kolonizoval nosní sliznici [275]. Naše populace se dělí z hlediska nosičství na 3 skupiny. Perzistentní přenašeči zlatého stafylokoka tvoří 20 % populace a jsou kolonizováni stále stejným kmenem *S. aureus*. 60 % populace patří do skupiny intermitentních přenašečů, kteří jsou kolonizováni postupně různými kmeny. Zbýlých 20 % populace není kolonizováno zlatým stafylokokem nikdy. V nemocničním prostředí profitují perzistentní přenašeči z toho, že již kolonizováni jsou, a jsou tedy chráněni před osídlením virulentnějším a rezistentnějším nemocničním kmenem [164]. Jejich nevýhodou je naopak skutečnost, že mají 3x větší riziko pooperační bakteriémie *S. aureus* [329]. Pacienty přijímáme na oddělení co nejkratší dobu před plánovanou operací, aby se nekolonizovali rezistentními nemocničními kmeny. K vyhledávání pacientů s kolonizovanou nosní dutinou je vhodný prostý stěr nosního vchodu a vestibula a PCR vyšetření. V případě nálezu *S. aureus* se k dekolonizaci doporučuje mast s mupirocinem aplikovaná do nosního vchodu a vestibula 2x denně a chlorhexidinová koupel jednou denně po dobu 5 dní před operací. Zajímavostí je, že po úspěšné eliminaci nosní kolonizace *S. aureus* většinou zmizí i z ostatních kolonizovaných částí těla [164]. Pacientům s prokázaným MRSA se k běžné pooperační antibiotické profylaxi přidává ještě jedna dávka vankomycinu [5].

Další kroky v eliminaci rizikových faktorů jsou suplementace vitamínu D u pacientů s prokázanou deficiencí, redukce tělesné hmotnosti obézních pacientů, eliminace infekčních fokusů po celém těle (s důrazem na dutinu ústní, nos, krk a gynekologickou oblast) a dočasná úprava imunosupresivní medikace. Metotrexát se vysazovat před operací nemusí. Další imunosupresiva a biologická léčba mají přesně dané doporučení American College of Rheumatology, jak dlouho před operací se mají vysadit [125].

1.5.2. Prevence zavlečení bakterií do operační rány

Bakterie se do operační rány dostávají vzdušnou cestou, na operačních nástrojích nebo na rukou personálu. Exogenní bakterie však působí méně infekcí operačních ran než endogenní rozsev původců z kůže, sliznic dutých orgánů a preexistujících infekčních ložisek pacienta [12]. Na konci operace je možné vykultivovat invazivní bakterie z 90 % původně sterilních ran [220]. Během prvních 4 hodin po kontaktu bakterií s tkáněmi pacienta imunitní systém pacienta eliminuje většinu bakterií v operační ráně; jejich počet redukuje až o 6 řádů. Případná infekce operační rány je potom vyvolaná buňkami původce, které tuto iniciační redukci přežijí [247].

Stavební úpravy operačního sálu. Základním předpokladem pro minimalizaci incidence infekcí v místě chirurgického výkonu jsou odpovídající stavební parametry operačního sálu. Prostory sálového traktu musí být uspořádány od míst s větší kontaminací k místům sterilnějším tak, aby umožnily pohyb personálu v takových směrech, které nekontaminují samotný operační sál [106]. Povrchy musí být snadno omyvatelné a odolné k desinfekčním prostředkům. Odstraňují se zbytečné kouty a lišty. Ventilační systémy udržují požadovanou teplotu a vlhkost vzduchu. Na sálech všeobecné chirurgie většinou stačí ventilace s turbulentním prouděním, ovšem v ortopedické endoprotetice je laminární proudění dnes již nepodkročitelným minimem. Ve vzduchu se rozptylují prachové částice, textilní vlákna z oblečení, deskvamovaná kůže personálu a aerosoly z dýchacích cest – všechno přenáší malá množství bakterií, které mohou kontaminovat operační nástroje nebo samotnou ránu. Doporučuje se laminární proudění vzduchu čištěného HEPA filtrem směřující na operační ránu a dále pokračující od rány směrem ven ze sálu. Na sále je lehký atmosférický přetlak a celý objem vzduchu na sále by se měl

vyměnit 15 až 20krát za hodinu [279]. Sir John Charnley snížil po zavedení laminárního proudění a operačních skafandrů incidenci infekce kloubní náhrady ze 7,0 % na 0,5 % [43].

Antibiotická profylaxe je nejúčinnějším opatřením v prevenci infekce kloubní náhrady [149]. Má největší efekt, je-li zahájena před incizí [37]. Efektivní perioda profylaktických antibiotik trvá 3 hodiny od počátku incize. Po uplynutí této rozhodující periody nemají profylaktická antibiotika vliv na pravděpodobnost vzniku stafylokokové infekce v operační ráně, protože už je pravděpodobně rozhodnuto, zda bakterie kontaminující ránu budou zničeny nebo se v ráně etablojí. Chirurgické rány, kde byl použitý chirurgický materiál, jsou k usazení bakterií mnohem náchylnější. Přítomnost byť jediného stehu snižuje počet bakterií nutných k vyvolání infekce operační rány o čtyři řády [152], přítomnost implantátu až o 6 řádů [345]. Kolonizace povrchu implantátu bakteriemi trvá pouhých 5 hodin [360].

U dlouhých operačních výkonů nebo po větší krevní ztrátě se doporučuje podání doplňující dávky profylaktického antibiotika ještě během operace [135]. Antibiotickou profylaxi není třeba neúměrně prodlužovat, protože 24hodinové podávání má stejný účinek na redukci incidence IKN jako sedmidenní režim, ale delší podávání vede k nárůstu bakteriální rezistence a nákladů na léčbu [149]. Zřejmě však bude nutné i toto opatření individualizovat. Podle jedné velké recentní studie se ukázalo, že u rizikových pacientů by mohlo mít smysl delší podávání antibiotik. Sedmidenní podávání perorálních ATB po primoiplantaci TEP kolena nebo kyčle u pacientů s vyšší mírou rizika IKN snižuje toto riziko čtyřnásobně [146].

Během revizní operace musí operatér řešit dilema, zda podat profylaktické ATB před incizí a tím si zvýšit falešnou negativitu kultivačních vyšetření nebo zda s antibiotiky vyčkat až do doby po odběru vzorků tkání na kultivaci. Odborníci se shodují, že před revizní operací je třeba podat profylaktická ATB podle standardního protokolu, pouze v případech s důvodným podezřením na IKN a neznámým původcem vyčkat na odběr vzorků [350].

Profylaktická antibiotika se podávají vždy v intravenózní formě, aby byly tkáně kolem operační rány antibiotikem nasyceny po celou rozhodující periodu. Lokální aplikace antibiotik výplachem pravděpodobně nemají v prevenci infekce chirurgické rány ani v prevenci tvorby biofilmu na implantátech signifikantní účinek, protože tkáně jsou neustále promývány tkáňovým mokem a volné antibiotikum je rychle odplaveno. Pokud bychom chtěli podat antibiotikum lokálně, musí být do okolí implantátu uvolňováno postupně z antibiotického nosiče, a to v dostatečné koncentraci alespoň 6 hodin od implantace – tedy mělo by pokrýt celou rozhodující periodu [12]. Plošné užívání antibiotického cementu k fixaci všech endoprotéz není žádoucí, protože vede k indukci bakteriální rezistence, nepředchází povrchovým pooperačním infekcím a antibiotický cement má horší mechanické vlastnosti než prostý PMMA [149]. Cementování TEP kolena antibiotickým cementem je paradoxně spjata s nárůstem rizika IKN v porovnání s prostým cementem. Analýza na 56 216 TEP kolen dokládá poměr rizik 1,53 a statistickou významnost [222].

Stále diskutovanou otázkou je výběr antibiotika. Cílem je pokrytí stafylokoků, kteří působí valnou většinu časných a opožděných IKN, eventuálně streptokoků. Peroperační profylaxe ignoruje původce pozdní hematogenní infekce. V endoprotetice jsou ATB první volby cefazolin a cefuroxim. Výhodou cefuroximu je výrazně vyšší účinnost, stabilita vůči účinkům stafylokokové beta-laktamázy a širší spektrum zahrnující i některé enterobakterie [207]. Tyto výhody a navíc účinek na anaeroby vykazují i aminopeniciliny. V případě alergie na peniciliny se jako alternativa připouští klindamycin nebo vankomycin. Aktivita vankomycinu proti grampozitivním bakteriím je však horší než aktivita β -laktamů, a tak by vankomycin neměl být antibiotikem první volby. Nástup účinku glykopeptidů je pozvolný, na což by se nemělo zapomínat. Podání předoperační profylaxe vankomycinem tak musí začít 2 hodiny před incizí [149].

Příprava operačního pole začíná už doma před příjmem k hospitalizaci. Celonoční obklad s 2% chlorhexidinem prokazatelně snižuje míru bakteriální kolonizace kůže pacienta a následně i incidenci infekce v místě chirurgického výkonu, a to z 2,9 % na 0,4 % (poměr rizik 8,15) [157]. Někteří autoři doporučují i opakovaný obklad po několik nocí před operací. Chlorhexidin je účinnější než povidon-jód nebo mýdlová voda. Problém domácí přípravy je nízká adherence většiny pacientů. 78 % nedodrží instrukce a obklad s chlorhexidinem neaplikuje [156].

Za hospitalizace se provádí další opatření. Operační pole se holí strojkem, tedy bez poranění pokožky. Drobná poranění způsobená holítkem nebo břitvou se stávají zdrojem povrchové infekce. Povoleny jsou i depilační krémy; ty však u některých pacientů vyvolají iritaci kůže. Doporučuje se holit operační pole co nejkratší dobu před operací. Samozřejmostí je pečlivá desinfekce operačního pole a rouškování před incizí. V této fázi není rozdíl mezi použitím chlorhexidinu nebo povidon-jódu: redukce bakteriální kolonizace je v obou případech stejná. Je vhodné natřít desinfekcí celou končetinu, aby se předešlo opětovné kontaminaci operačního pole při neopatrném rouškování, a po rouškování desinfikovat operační pole ještě jednou. Při rouškování se totiž víří vzduch kolem pacienta a pravděpodobně se zvýší usazování volných částic ze vzduchu na operační pole [14]. Reziduální bakteriální kolonizaci kůže je možné „uzamknout“ na povrchu kůže pomocí kyanoakrylátu, který minimalizuje migraci bakterií do operační rány. Další možnosti jsou jódované incizní fólie.

Opatření na operačním sále a při operaci. Povinností operačního týmu i sálového personálu je podniknout všechna možná opatření k zabránění bakteriální kontaminace operační rány vzdušnou cestou nebo přenosem na ruku personálu. Patří sem například sterilizace sálu ultrafialovým zářením, omezení pohybu osob ze sálu a na sál během operace, omezení rozhovorů na sále, používání ústenek, používání operačních skafandrů s odsáváním vydechnutého vzduchu, důkladná chirurgická desinfekce rukou, krátce střižené nehty. Personál nachlazený nebo nemocný jinou infekční chorobou se neúčastní operace. Na konci dvouhodinové operace má 35 % sterilních rukavic mikroskopické trhliny a 80 % jejich nositelů si neuvědomuje, kdy se rukavice mohly porušit. Proto je stěžejním bodem důkladná chirurgická desinfekce rukou a nošení dvou párů rukavic [279].

Pacient se nesmí během operace podchladiť a musí být zajištěna dobrá oxygenace tkání, protože hypoxémie a hypotermie jsou též rizikové faktory pooperační infekční komplikace. Je vhodné, aby si operátor před vlastní implantací vyměnil rukavice. Asistenti by se neměli dotýkat implantátu, není-li to nezbytně nutné. Samozřejmostí je průběžná hemostáza jako prevence vzniku pooperačního hematomu, který je příznivým médiem pro pomnožení bakterií. Před uzavřením operační rány se doporučuje irigace rány roztokem povidon-jódu, což výrazně snižuje riziko infekční komplikace [5]. Pokud se používá drén, musí být vyveden přes zdravou kůži daleko od operační rány.

Pooperační péče. Operační rána musí být převazována vždy za sterilních podmínek a ne častěji než 1x za 24 hodin. I na pooperačním pokoji hrozí bakteriální kontaminace rány vzdušnou cestou. Drén se musí extrahovat co nejdříve, aby se zabránilo ascendentní infekci bakteriemi z okolí drénu. Pokud přes veškerou péči dojde k dehiscenci operační rány, je třeba užívat moderní antibakteriální převazové materiály, aby se minimalizovalo riziko pooperační infekce v místě chirurgického výkonu a maximálně urychlilo zhojení rány. Vytipovaným pacientům se zvláště velkým rizikem poruchy hojení rány (diabetici, revmatici, malnutrice) je možné aplikovat preventivní podtlakovou terapii (Prevena™), která odvádí z rány sekret, udržuje okraje rány u sebe a stimuluje hojení.

Prevence pozdní hematogenní infekce. Základním principem prevence pozdní hematogenní infekce kloubní náhrady je aktivní předcházení vzniku infekčních ložisek, která by sekundárně mohla metastazovat na povrch kloubní náhrady. Příkladem je kvalitní dentální hygiena a důsledné zaléčení každého bakteriálního onemocnění antibiotiky. Hematogenní infekce kloubní náhrady může vzniknout při bakteriémii 1000 CFU/ml [347]. Antibiotická profylaxe u nehnisavých stomatologických výkonů

nutná není, protože bakteriémie vyvolaná při stomatologickém výkonu je srovnatelná s fyziologickou bakteriémií. ATB profylaxe při stomatologických výkonech nesnižuje riziko hematogenní IKN. Z podobných důvodů nemá smysl přeléčovat asymptomatickou bakteriurii, protože se nejedná o infekci močových cest [22]. ATB profylaxe chirurgických výkonů spjatých s bakteriémií se doporučuje u rizikových skupin pacientů, jako jsou diabetici nebo revmatici, v prvních dvou letech po implantaci kloubní náhrady, u pacientů s imunodeficitem potom celoživotně. Urologické, gynekologické, břišní chirurgické operační výkony spjaté s masivnější bakteriémií, ale i intermitentní katetrizace močového měchýře pacientů s bakteriurii a zavádění piercingu je doporučeno pokrýt profylaktickými antibiotiky [150].

1.5.3. Vakcíny

Vakcíny se v průběhu tří století své doložené existence staly neúspěšnější metodou boje s infekčními nemocemi. V praxi se k prevenci IKN vakcíny zatím neužívají, protože žádná z vakcín zatím neprošla fází III klinického testování [27]. Antibakteriální vakcíny jsou mířené proti jednotlivým konkrétním antigenům, což vede k jejich příliš úzké specifitě. Vhodný cílový antigen neexprimují ani všechny mutanty jednoho bakteriálního druhu. Širokospektrá vakcína zabraňující obecně tvorbě biofilmu zatím nebyla objevena. *In vivo* byly zatím na zvířeti testované vakcíny proti pouzdrovým antigenům, složkám buněčné stěny, Panton-Valentinově leukocidinu nebo složkám quorum-sensing systému. Vakcína sama IKN nevyléčí ani nepředejde jejímu vzniku. Role vakcín spočívá v doplnění léčby antibiotiky. Na animálních pokusech byla prokázána účinnost kombinace antibiotika a monoklonální protilátky proti bakteriální glukosaminidáze [340], monoklonální protilátky proti bakteriálnímu DNA-vázajícímu proteinu [86] nebo tetravalentní vakcíny proti antigenům biofilmu [33].

1.5.4. Povrchové úpravy implantátů

Všechny implantáty v ortopedii, ať už jsou tvořeny slitinami titanu, nerezové oceli, chromu a kobaltu, hydroxyapatitem, polyethylenem nebo kostním cementem, jsou velmi náchylné k bakteriální kolonizaci, ovšem různé povrchy a různé materiály rozdílnou měrou [259]. Experimentálně bylo prokázáno, že bakterie adherují k titanovým implantátům a ocelovým K-drátům stejně silně, ale PMMA vykázal za stejných podmínek výrazně vyšší bakteriální nálož [23]. Největší bakteriální nálože byly nalezeny na polyethylenových vložkách a hlavičkách TEP kyčlí [173]. Naopak na chrom-kobaltových komponentách rostou biofilmy nejpomaleji díky toxickému působení kobaltu na bakteriální (i lidské) buňky [160][355]. Výsledná míra adherence k povrchům ovšem závisí více na bakteriálním kmeni než na typu povrchu [123].

Imunitní látky a buňky mají k povrchu implantátu omezený přístup. Strana přivrácená ke kosti je v lepším případě integrována do kosti, v horším případě oddělena fibrózní vrstvou, která má kompromitované cévní zásobení. Pro rozvoj časně nebo opožděné infekce kloubní náhrady je naprosto esenciálním rozhodujícím faktorem to, jestli povrch implantátu pokryje dříve bakteriální biofilm nebo imunokompetentní buňky pacienta. Rozhodnuto je již 6 hodin po operaci a imunitní buňky s bakteriemi svádějí „závod o povrch“, aby povrch implantátu ovládly jako první [128].

Ideální implantát, který maximálně znemožňuje adhezi bakterií, je naprosto hladký na nanometrové úrovni, prostý mikropórů, hydrofilní a bez elektrického náboje [41]. Ideální potahová vrstva implantátu by měla být biokompatibilní s pacientem, odolná proti otěru při implantaci i v pooperačním období, mít silnou a trvanlivou účinnost proti bakteriím prokázanou *in vitro* a *in vivo* a

neměla by interagovat s ukotvením implantátu, tedy s cementem nebo osteointegrací [110]. Ať už je na povrch implantátu aplikovaná jakákoliv látka, nesmí vyvolat bakteriální rezistenci [379].

Povrchové úpravy implantátu dělíme do tří kategorií: Pasivní povrchové úpravy, aktivní povrchové úpravy a lokální nosiče [379].

Pasivní povrchové úpravy. Cílem pasivních povrchových úprav implantátů je maximálně bakteriím ztížit adhezi k povrchu implantátu. K vysoce smáčivým nebo naopak superhydrofobním [394] povrchům hůře adherují hostitelské proteiny, což sekundárně ztěžuje i adhezi bakterií. Smáčivost implantátu z oxidu titaničitého lze zvýšit pomocí ultrafialového záření [105]. Potažení implantátu polyethylenglykolem nebo polyethylenoxidem přilnutí sérových proteinů k povrchu implantátu znemožňuje [223]. Další možností je potažení titanu zesíťovaným albuminem, čímž se vytvoří hladký povrch [8]. Moderní technologie mohou vytvarovat nanostrukturu povrchu implantátu do drobných hrotů nebo kapes, které ztěžují bakteriím adhezi, a dokonce působí poškození bakteriálních buněk, až jejich smrt [354]. Obecně platí, že povrchové úpravy snižující adhezi nelze použít na straně implantátu přivrácené ke kosti, aby se nenarušila osteointegrace.

Aktivní povrchová úprava implantátu zahrnuje kontaktní baktericidy a baktericidní nebo bakteriostatické látky uvolňující se do okolí implantátu.

Stříbro se z povrchu implantátu uvolňuje do okolí ve formě stříbrných kationtů a po kontaktu s bakterií mění propustnost její plasmatické membrány a interferuje s jejím buněčným metabolismem. Stříbro reaguje za vzniku reaktivních sloučenin kyslíku, a tím vyvíjí na bakterie oxidační stres. Výhodami stříbra jsou široké antibakteriální spektrum, dlouhodobý protibakteriální účinek a nízká pravděpodobnost vzniku rezistence. Stříbro neovlivňuje aktivitu osteoblastů [124] a pro pacienta není toxické [136]. Postříbřené implantáty mají vyšší úspěšnost DAIR v případech IKN [328]. Kromě stříbra byly testované i jiné prvky vhodné pro povrchovou úpravu: zinek, měď, selen, uhlík, chlór, jód a kyslík [379].

Antibiotika kovalentně navázaná k povrchu implantátu prokázala účinnost v pokusech na zvířatech. Testovány byly vankomycin, kaspofungin [166], gentamicin [6] nebo kombinace minocyklinu s rifampicinem [59]. Problémem antibiotických povrchů je riziko indukce antibiotické rezistence v případě dlouhodobého uvolňování subinhibičních koncentrací antibiotika. Kromě antibiotik je *in vivo* účinný i sfingosin. Jeho bezpečnost se však musí prokázat v následujících studiích na zvířatech [23].

Účinek antibiotik proti biofilmu by mohl být potencován současným užitím enzymů degradujících složky bakteriálního biofilmu. Disperzin B je enzym schopný rozptýlit PIA a úplně eradikovat biofilmy bakterií produkujících PIA [159]. DNáza1L2 štěpí extracelulární DNA bakterií, což destabilizuje biofilm a znemožňuje jeho nárůst [80]. Proti zralému biofilmu však neúčinkuje, takže DNáza1L2 je použitelná pouze v povrchové úpravě implantátu jako prevence vzniku biofilmu [159].

Nosiče antibakteriálních látek regulují rychlost eluce antibakteriálních látek do okolí implantátu. Základním nosičem je polymethylmetakrylát (PMMA), který se používá k ukotvení implantátů již více než 60 let. Jako nosiče se též používají kolagenové sítky, hydrogely nebo kostní tkáň. PMMA lze impregnovat antibiotiky i jinými antibakteriálními látkami.

Chitosan je přírodní biokompatibilní kationický polysacharid interagující s plasmatickou membránou bakterií, což způsobuje její lýzu [10]. Chitosan sám a ještě výrazněji jeho derivát hydroxypropyltrimethyl amonium chlorid chitosan (HACC) je účinný v prevenci tvorby biofilmu na kostním cementu, a proto se hodí jako aditivum do PMMA cementu. HACC má navíc schopnost inhibovat expresi genů virulence u rezistentních kmenů stafylokoků [291].

Příkladem biodegradabilního nosiče antibiotika je rychle vstřebatelný hydrogel z hyaluronanu a poly-D,L-laktidu. Při implantaci se nestírá z povrchu implantátu a vstřebá se do 96 hodin, tedy antibiotikum uvolňuje rychle a zároveň pokrývá celou rozhodující periodu, kdy probíhá „závod o

povrch“ [77]. Dále jmenujme fosfatidylcholin, který uvolňuje amikacin nebo vankomycin nejméně 6 dní [153].

Antimikrobiální peptidy jsou složky vrozené imunity, které interagují s plasmatickou membránou bakterií a zvyšují její permeabilitu pro další antibakteriální látky nebo samy útočí na nitrobuněčné struktury bakterií [114]. Antimikrobiální peptidy jsou navíc plně biokompatibilní a nemají toxický vliv na osteoblasty [113]. Příkladem je širokospektrý peptid *Tet 123* uvnitř kalciumfosfátového nosiče [162].

1.6. Definice infekce kloubní náhrady

Rozhodnutí, zda je konkrétní protetický kloub infikován, nemusí být vždy snadné. Infekce kloubní náhrady se může projevit typickými příznaky infekce, které samy určují správnou diagnózu. V podstatné části případů jsou však symptomy jen naznačené, průběh je vleklý a onemocnění pak imituje aseptické selhání implantátu [217]. Problematické jsou low-grade infekty, stavy po předchozím podání antibiotik, negativní laboratorní nálezy u pacientů s klinickými příznaky infekce, pozitivní peroperační kultivace u pacientů s předpokládaným aseptickým selháním implantátu, imunokompromitovaní pacienti a další speciální případy. V těchto situacích se nemůžeme opřít o jednoduchou definici infekce kloubní náhrady, kterou je prokázána přítomnost původce onemocnění v protetickém kloubu, protože spolehlivý a přesný průkaz původce neexistuje. Diagnostika se potom stává velmi náročnou disciplínou. Špatné rozhodnutí vede k neúměrnému prodloužení léčby, opakované operační zátěži pacienta a v neposlední řadě k nárůstu nákladů na léčbu.

Základním předpokladem diagnostiky je znalost kritérií nemoci, kterou hledáme. Diagnostika i definice infekce kloubní náhrady se neustále vyvíjí a v jednu dobu může být současně platných několik doporučení. Z toho plyne, že stejný pacient by mohl dostat diagnózu jednou infekční a jednou aseptickou v závislosti na tom, ve které zemi by se zúčastnil diagnostické studie. Tento fakt je potom zdrojem heterogenity jak diagnostických, tak i terapeutických studií, které hodnotí účinek různých terapeutických přístupů. Současný referenční standard diagnostiky infekce kloubní náhrady je soubor diagnostických kritérií přijatý Mezinárodním konsenzem ve Philadelphii v roce 2018, který vychází ze staršího souboru navrženého v roce 2011 Společností pro muskuloskeletální infekce (Musculoskeletal Infection Society, MSIS). Jedná se o druhou revizi souboru diagnostických kritérií.

1.6.1. IDSA 2012

Nezávisle na aktivitě MSIS vydala v roce 2012 svůj diagnostický algoritmus a definici infekce kloubní náhrady Americká společnost pro infekční nemoci (IDSA, Infectious Diseases Society of America). IDSA definuje infekci kloubní náhrady takto [231]:

1. Přítomnost pěstěle komunikující s kloubem – IKN jistá
2. Hnis v kloubní dutině bez jiné možné příčiny – IKN jistá.
3. Kultivace téhož původce alespoň ze dvou vzorků, z nichž alespoň jeden je peroperační – IKN jistá.
4. Znamky akutního zánětu na histologickém preparátu – IKN vysoce pravděpodobná
5. Kultivace virulentního původce alespoň z jednoho vzorku – IKN možná
6. Kultivace nízcě virulentního původce alespoň z jednoho vzorku – zvážit IKN i kontaminaci
7. IKN může být přítomna, i když pacient nesplňuje žádné z výše zmíněných kritérií.

Autoři připouštějí, že na histologickém preparátu nemusí být známky akutního zánětu, pokud je IKN způsobena nízcě virulentním kmenem. Úskalím definice IDSA je skutečnost, že hnisavý výpotek nemusí být způsoben jen přítomností bakterií na implantátu. Pro správnou diagnózu na základě purulence musíme nejprve vyloučit jiné možné příčiny vzniku hnisavého výpotku, například nepříznivou lokální tkáňovou reakci na kovové částice (adverse local tissue reaction – ALTR) [293]. Cytologické parametry přímo v definici IKN nenacházíme, nicméně IDSA cytologické vyšetření doporučuje a uvádí následující rozdělovací hodnoty:

- TEP kolen nejméně 6 měsíců po implantaci, bez systémového zánětlivého onemocnění:
- leukocyty ve výpotku 1700/ μ l
 - podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku 65 % [302]
- TEP kyčlí nejméně 6 měsíců po implantaci:
- leukocyty ve výpotku 4200/ μ l
 - podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku 80 % [264]
- TEP kolen v časném pooperačním období:
- leukocyty ve výpotku 27 800/ μ l
 - podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku 89 % [24]

1.6.2. Kritéria MSIS 2011

Americká Společnost pro muskuloskeletální infekce (Musculoskeletal Infection Society, MSIS) v roce 2011 vydala soubor velkých a malých diagnostických kritérií [238]. Infekce kloubní náhrady je přítomna, pokud je splněno alespoň jedno velké nebo alespoň čtyři ze šesti malých kritérií. Rozdělující hodnoty některých testů nebyly ještě pevně dané. Autoři připouštějí, že IKN může být přítomna, i když není splněno žádné velké a méně než čtyři malá kritéria. MSIS si je vědoma, že běží intenzivní výzkum mnoha dalších diagnostických metod a prohlašuje, že diagnostická kritéria bude aktualizovat, pokud se nějaká nová metoda ukáže jako vysoce přesná.

Infekce kloubní náhrady je přítomna, pokud je splněno alespoň jedno velké nebo alespoň čtyři malá kritéria	
Velká kritéria	<ol style="list-style-type: none"> 1. Píštěl komunikující s kloubní dutinou 2. Původce onemocnění je vykultivován alespoň ze dvou vzorků periprotetické tkáně nebo výpotku
Malá kritéria	<ol style="list-style-type: none"> 1. Elevace sérového CRP <u>a zároveň</u> zvýšená sedimentace erytrocytů 2. Zvýšený počet leukocytů ve výpotku 3. Zvýšený podíl neutrofilních granulocytů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku 4. Přítomnost hnisu v kloubní dutině 5. Kultivační izolace původce z výpotku nebo periprotetické tkáně 6. Více než 5 neutrofilů na zorné pole v pěti zorných polích při histologické analýze periprotetické tkáně při 400násobném zvětšení

Tabulka 1.8: Diagnostická kritéria MSIS z roku 2011

1.6.3. Mezinárodní konsenzus 2013

V roce 2013 se ve Philadelphii konalo Mezinárodní konsenzuální setkání na téma infekce kloubní náhrady, kterého se zúčastnilo na 400 expertů z 52 zemí a 130 odborných společností. Konsenzus s drobnými úpravami schválil definici infekce kloubní náhrady navrženou MSIS v roce 2011 a ta byla potom přijata více než 130 světovými odbornými společnostmi [241]. Konsenzus vyloučil z malých kritérií hnisavý charakter výpotku. Výpotek připomínající hnis totiž může být přítomen např. i u neinfekční exacerbace revmatoidní artritidy nebo v rámci nepříznivé lokální tkáňové reakce na kovové částice (ALTR). Označení výpotku za hnisavý nebo nehnisavý se odvíjí od subjektivního posouzení a cílem konsenzu je diagnostiku maximálně objektivizovat [350]. Konsenzus jako alternativu k celkovému počtu leukocytů ve výpotku přidal pozitivitu leukocytové esterázy na detekčním papírku na ++ při ponoření do kloubního výpotku. Konsenzus připouští, že ani takto upravená kritéria nejsou 100% spolehlivá a v případě, že pacient kritéria nesplňuje a přetrvává důvodné klinické podezření na IKN, diagnóza IKN může být stanovena. Jako příklad autoři uvádějí infekci nízce virulentním kmenem, např. *Cutibacterium acnes*.

Infekce kloubní náhrady je přítomna, pokud je splněno alespoň jedno velké nebo alespoň tři malá kritéria	
Velká kritéria	<ol style="list-style-type: none">1. Dvě pozitivní periprotetické kultivace s fenotypicky identickým organismem2. Píštěl komunikující s kloubní dutinou
Malá kritéria	<ol style="list-style-type: none">1. Elevace sérového CRP <u>a zároveň</u> zvýšená sedimentace erytrocytů2. Zvýšený počet leukocytů ve výpotku <u>nebo</u> ++ pozitivní test leukocytové esterázy na proužku3. Zvýšený podíl polymorfonukleárních leukocytů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku4. Pozitivní histologická analýza periprotetické tkáně5. Jediná pozitivní kultivace

Tabulka 1.9: Diagnostická kritéria Mezinárodního konsenzu ve Philadelphii z roku 2013

Kritérium	Akutní IKN (do 90 dní od implantace)	Opožděná IKN (nad 90 dní od implantace)
Sedimentace erytrocytů [mm/hod]	Hranice nebyla stanovena	30
CRP [mg/l]	100	10
Počet leukocytů ve výpotku [na 1 μl]	10 000	3000
Podíl polymorfonukleárů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku	90 %	80 %
Leukocytová esteráza	+ nebo ++	+ nebo ++
Histologická analýza	>5 PMN v 1 zorném poli při 400x zvětšení a zhlédnutí 5 zorných polí	>5 PMN v 1 zorném poli při 400x zvětšení a zhlédnutí 5 zorných polí

Tabulka 1.10: Rozdělovací hodnoty k posouzení výsledků vyšetření zahrnutých do kritérií Mezinárodního konsenzu ve Philadelphii z roku 2013

1.6.4. Současný referenční standard

Současný referenční standard diagnostiky infekce kloubní náhrady je soubor diagnostických kritérií přijatý Mezinárodním konsenzem ve Philadelphii v roce 2018. Oproti předchozímu souboru kritérií zavádí rutinní testování synoviálního α -defensinu a synoviálního CRP a dále krevních D-dimerů. Testování diagnózy je rozděleno do tří kroků a v každém je možné obdržet nerozhodný výsledek. Pokud jsou velká kritéria negativní, testujeme předoperační malá kritéria. Pokud je předoperační punkce suchá nebo výsledek nerozhodný, testujeme peroperační kritéria. Malá kritéria mají rozdílnou váhu hodnocenou jedním, dvěma nebo třemi body [243].

Velká kritéria			Rozhodnutí	
Píštěl			Splněno alespoň jedno: Infekce	
2 pozitivní kultivace se stejným původcem				
Předoperační	Malá kritéria		Score	Rozhodnutí
	Krevní	CRP nebo D-dimery	2	
		FW	1	
	Synoviální	LE nebo leukocyty	3	
		α -defensin	3	
		% PMN	2	
		CRP	1	
Peroperační	V případě nerozhodného předoperačního výsledku		Score	Rozhodnutí
	Součet předoperačního score		-	
	Pozitivní histologie		3	
	Viditelná purulence		3	
Jediná pozitivní kultivace		2		

Tabulka 1.11: Diagnostická kritéria Mezinárodního konsenzu ve Philadelphii z roku 2018

V roce 2018 bylo též provedeno zhodnocení diagnostických vlastností současného i předchozích souborů na validačních skupinách pacientů s infekčním, resp. aseptickým selháním. Validační skupiny byly určeny retrospektivně z pacientů, kteří byli dlouhodobě sledováni, a tak u nich bylo možné téměř s jistotou říci, jestli byli infekční nebo neinfekční v době operace. Nová kritéria z roku 2018 mají oproti předchozím vynikající senzitivitu a zachovalou vynikající specifitu [243].

Metoda	Senzitivita	Specifita
MSIS 2011	79,3 %	99,5 %
Konsenzus 2013	86,9 %	99,5 %
Konsenzus 2018	97,7 %	99,5 %

Tabulka 1.12: Diagnostické vlastnosti různých referenčních standardů

Ani nejnovější soubor diagnostických kritérií není 100% přesným zlatým standardem. Správné diagnóze stále malé procento pacientů uniká. V riziku stanovení špatné diagnózy jsou pacienti s krystalovými artropatiemi, nepříznivou lokální tkáňovou reakcí, exacerbací revmatoidní artritidy nebo IKN způsobenou níže virulentními původci. Diagnostická kritéria 2018 jsou každopádně nejpresnějším nástrojem diagnostiky infekce kloubní náhrady a budou výborně sloužit jako referenční standard pro testování nových diagnostických metod.

Kritérium	Akutní IKN (do 90 dní od implantace)	Opožděná IKN (nad 90 dní od implantace)
Sérový CRP [mg/l]	100	10
Sérové D dimery [ng/ml]	860	860
Sedimentace erytrocytů [mm/hod]	Hranice nebyla stanovena	30
Počet leukocytů ve výpotku [na 1 μ l]	10 000	3000
Podíl polymorfonukleárů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku	90 %	80 %
Synoviální CRP [mg/l]	6,9	6,9
Synoviální α -defensin [mg/l]	5,2	5,2
Leukocytová esteráza	++	++
Histologická analýza	>5 PMN v 1 zorném poli při 400x zvětšení a zhlédnutí 5 zorných polí	>5 PMN v 1 zorném poli při 400x zvětšení a zhlédnutí 5 zorných polí

Tabulka 1.13: Rozdělovací hodnoty k posouzení výsledků vyšetření zahrnutých do kritérií Mezinárodního konsenzu ve Philadelphii z roku 2018

1.7. Diagnostický algoritmus

Neexistuje jediný stoprocentně senzitivní a stoprocentně specifický test, kterým bychom jednoznačně potvrdili nebo vyvrátili podezření na infekci kloubní náhrady. Diagnóza se opírá o celou paletu různě závažných diagnostických metod uspořádaných do souboru diagnostických kritérií. Výsledky všech vyšetření, které potřebujeme ke stanovení nebo vyloučení diagnózy IKN, nejsou na začátku k dispozici. Všechna potřebná vyšetření nemůžeme indikovat kvůli sebemenšímu podezření na IKN, protože jsou v různé míře invazivní. Metody nukleární medicíny vystavují pacienta nezanedbatelné dávce ionizujícího záření. Při kloubní punkci hrozí zavlečení bakterií z prostředí nebo z kožní flóry do neinfekčního kloubu a následné vyvolání iatrogenní infekce kloubní náhrady. Konečně, neindikujeme k revizní operaci každého suspektního pacienta jenom kvůli získání peroperačních vzorků. Odborné společnosti navrhnou diagnostické algoritmy tak, aby co nejdříve a nejspolehlivěji byly odhaleny případy infekce kloubní náhrady, a zároveň aseptičtí pacienti nebyli vystaveni zbytečné zátěži a rizikům spojeným s vyšetřováním. Schémata 1.1 a 1.2 shrnují dva uznávané diagnostické algoritmy. Mezinárodní konsenzus 2018 sice zkomplikoval systém hodnocení výsledků vyšetření, ale zjednodušil diagnostický algoritmus v porovnání s algoritmem konsenzu z roku 2013, protože seřadil vyšetření do tří jasných kroků.

Na základě anamnézy a klinického vyšetření vznikne podezření na infekci kloubní náhrady. potom provádíme testy první linie. Mezi testy první linie patří prostý rentgenový snímek, sedimentace erytrocytů a stanovení sérových parametrů CRP, IL-6 a D-dimerů. Tyto testy jsou téměř neinvazivní a po zhodnocení jejich výsledků se rozhodneme, jestli budeme pokračovat ve vyšetřování nebo infekci kloubní náhrady označíme za nepravděpodobnou. Pokud jsou všechny krevní testy negativní a na RTG nenacházíme známky uvolnění implantátu, ve vyšetřování nepokračujeme [231]. Pokud je některý z testů pozitivní, následuje kloubní punkce s aspirací kloubního výpotku.

Dlouho jsme se spoléhali na to, že negativní CRP a sedimentace erytrocytů téměř vylučuje infekci kloubní náhrady [280], a tento názor sdílí i Americká asociace ortopedů (AAOS), která doporučuje neprovádět kloubní punkci, pokud je CRP i sedimentace erytrocytů negativní a není podezření na IKN. Kyčle se nepunktují ani tehdy, když je jeden z ukazatelů (CRP nebo sedimentace) pozitivní a není podezření na IKN. Tito pacienti ale musí mít po 3 měsících kontrolní krevní testy. Pacienty s podezřením na IKN, pacienty plánované k aseptické revizi a pacienty s pozitivním CRP i sedimentací samozřejmě punktovat musíme. Dnes už je širší povědomí o low-grade infektech, které mívají CRP i sedimentaci často v normě. Při podezření na chronickou infekci kloubní náhrady nízké virulentním kmenem doporučují někteří autoři provádět kloubní punkci již v první linii [4]. Až 32 % všech IKN může uniknout diagnóze, pokud zastavíme vyšetřování po obdržení normálního sérového CRP. 23 % prokázaných IKN má normální hladinu sérového CRP a sedimentaci erytrocytů. Jedná se samozřejmě o low-grade infekty způsobené nízké virulentními organismy [245].

Při rozhodování o dalším vyšetřovacím postupu je třeba zohlednit anamnézu a komorbiditu pacienta. Samotná elevace CRP a sedimentace nevyvolávají nutně podezření na infekci kloubní náhrady, pokud je zřejmá její příčina, např. koexistence systémového zánětlivého onemocnění, nespecifického střevního zánětu nebo nádorového onemocnění. V takových případech musí klinik zvážit, zda kloubní punkcí a možným zavlečením exogenní bakterie neohrozí aseptický kloub.

Kloubní výpotek je nejlepším zdrojem informací, protože je v přímém kontaktu s implantátem a eventuálně přítomnými bakteriemi. Punkrát odesíláme rutinně k mikrobiologickému a cytologickému vyšetření. Mezinárodní konsenzus 2018 nově vyžaduje i biochemickou analýzu výpotku. Na výpotek se zaměřují i inovativní a experimentální metody, např. imunogenetika.

Do standardního diagnostického algoritmu nejsou zařazeny pokročilé zobrazovací metody, tedy magnetická resonance, CT, třífázová scintigrafie kostí, scintigrafie značenými leukocyty ani PET/CT. Třífázová scintigrafie kostí a scintigrafie značenými leukocyty jsou nám pomocí, když není k dispozici kloubní výpotek a ostatní vyšetření dopadají nerozhodně.

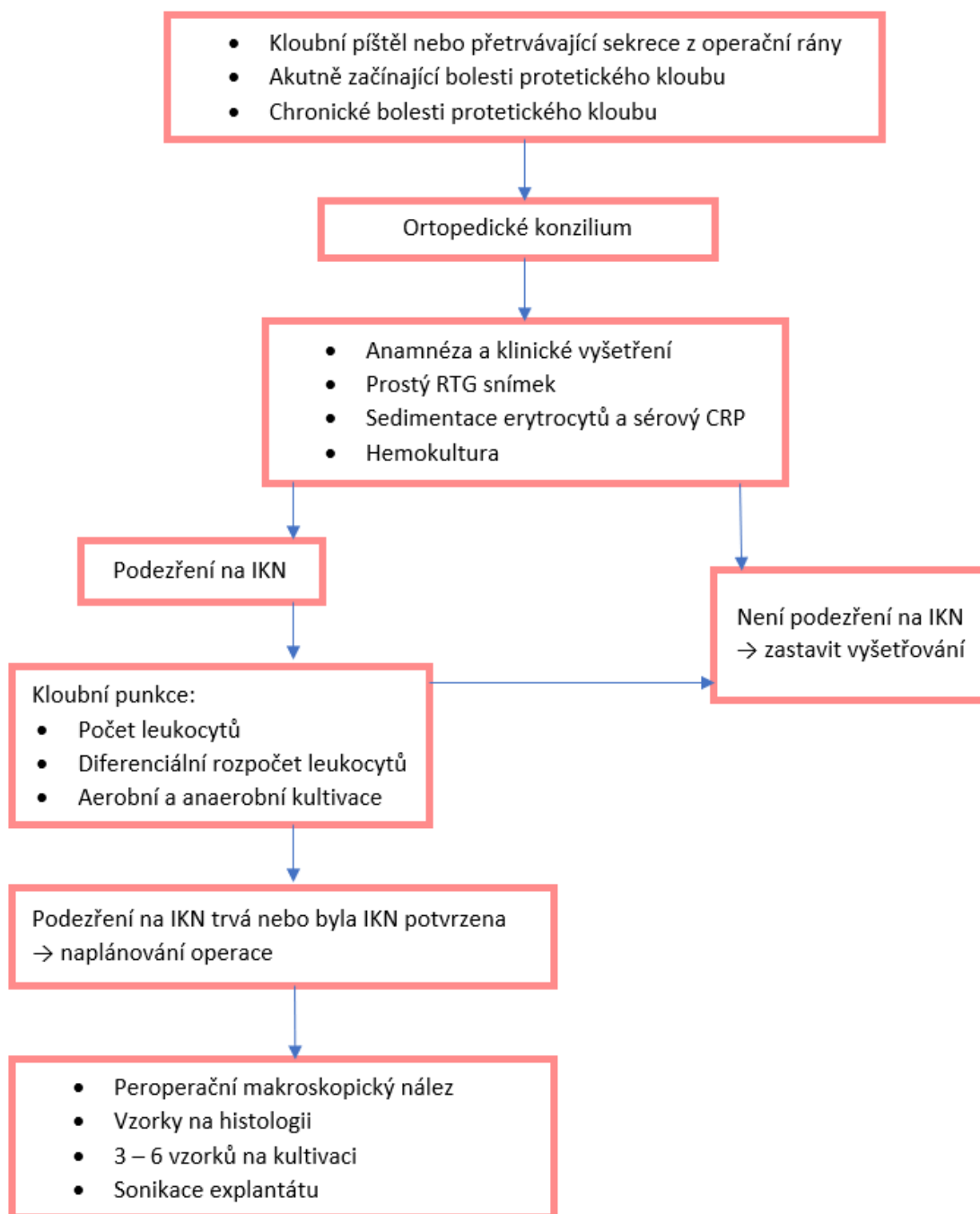


Schéma 1.1: Diagnostický algoritmus IDSA z roku 2012. V případě negativní sedimentace, CRP, hemokultury, prostého RTG snímku a absence podezření na IKN je doporučeno dále nevyšetřovat.

Pokud je pacient stabilní a nepotřebuje urgentní ošetření, před plánovanou aspirací výpotku na ambulanci 2 týdny nepodáváme antibiotika, abychom minimalizovali pravděpodobnost falešně negativního kultivačního výsledku [231]. Znalost původce onemocnění je naprosto esenciální v plánování další léčby. Pokud pacient antibiotika užívá a jeví příznaky počínající sepse, čekat samozřejmě nemůžeme. Odebíráme krev na hemokulturu a plánujeme operační řešení.

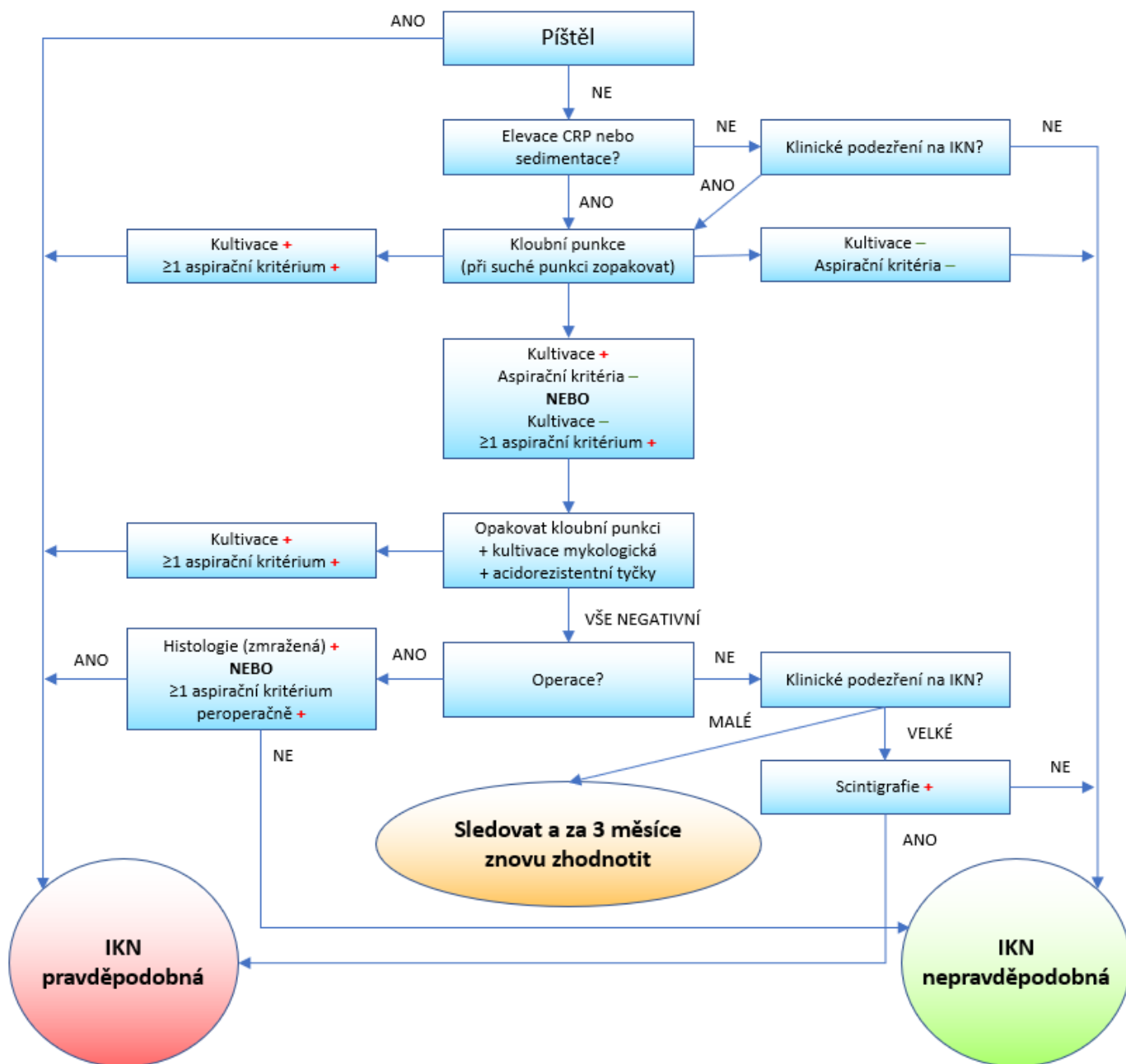


Schéma 1.2: Diagnostický algoritmus Mezinárodního konsenzu z roku 2013. Některá z malých kritérií lze posoudit předoperačně, jiná až peroperačně, proto je třeba přesně stanovit, v jakém pořadí se budou vyšetření provádět. + pozitivní, - negativní, aspirační kritéria = kritéria posouditelná jen po aspiraci kloubního výpotku, tedy počet leukocytů, podíl polymorfonukleárů a test leukocytové esterázy

1.8. Základní pravidla pro testování vlastností diagnostických testů

V diagnostice infekce kloubní náhrady neexistuje zlatý standard, tedy jediný 100% senzitivní a 100% specifický test. Současný výzkum je mimo jiné zaměřen na hledání takového testu. Každý nově objevený ukazatel IKN je podroben zkoumání přesnosti, tedy určení senzitivity, specificity a dalších vlastností. Protože většina testů nabývá spojitých hodnot (koncentrace biochemického markeru ve výpotku, počet leukocytů ve výpotku apod.), je třeba také správně určit rozdělovací hodnotu (diskriminační hranici, referenční mez), která rozděluje pozitivní a negativní výsledky, aby byl test snadno využitelný v klinické praxi. Stanovení diagnostických vlastností testu se dělá pomocí srovnání jeho dichotomických výsledků se skutečnou přítomností nebo absencí nemoci. V případě IKN ovšem u některých pacientů během výzkumu nezjistíme, zda IKN měli nebo neměli. Proto srovnáváme nový test s testem starším, o kterém se domníváme, že se (téměř nikdy) nemýlí. Tomuto nejpřesnějšímu dostupnému testu ke srovnání říkáme referenční standard a v případě IKN se jako referenční standard používá soubor diagnostických kritérií Mezinárodního konsenzu z roku 2018.

1.8.1. Diagnostické vlastnosti testu

Základem pro výpočet diagnostických vlastností testu je kontingenční tabulka.

a – počet pacientů, kteří mají sledovanou nemoc a test je označil za nemocné (test správně pozitivní)

b – počet pacientů, kteří nemoc nemají a test je označil za nemocné (test falešně pozitivní)

c – počet pacientů, kteří mají sledovanou nemoc a test je označil za zdravé (test falešně negativní)

d – počet pacientů, kteří nemoc nemají a test je označil za zdravé (test správně negativní)

	Nemoc skutečně přítomna	Nemoc skutečně nepřítomna	Celkem
Test pozitivní	a	b	a + b
Test negativní	c	d	c + d
Celkem	a + c	b + d	a + b + c + d

Tabulka 1.14: Obecná kontingenční tabulka

Senzitivita testu je podíl pacientů s pozitivním výsledkem testu mezi všemi skutečně nemocnými.

Senzitivita testu je pravděpodobnost, že test přiřadí nemocnému pozitivní výsledek.

$$SE = \frac{a}{a+c}$$

Specificita testu je podíl pacientů s negativním výsledkem testu mezi všemi skutečně zdravými.

Specificita testu je pravděpodobnost, že test přiřadí zdravému negativní výsledek.

$$SP = \frac{d}{b+d}$$

Přesnost testu je pravděpodobnost, že test poskytne správné výsledky.

$$AC = \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

Falešná pozitivita je podíl pacientů s pozitivním výsledkem testu mezi všemi skutečně zdravými.

Falešná pozitivita testu je pravděpodobnost, že test přiřadí zdravému pozitivní výsledek.

$$FP = \frac{b}{b+d}$$

Falešná negativita je podíl pacientů s negativním výsledkem testu mezi všemi skutečně nemocnými.

Falešná negativita testu je pravděpodobnost, že test přiřadí nemocnému negativní výsledek.

$$FN = \frac{c}{a+c}$$

Prediktivní hodnota pozitivního výsledku je podíl nemocných mezi všemi s pozitivním výsledkem. Prediktivní hodnota pozitivního výsledku je pravděpodobnost, že pacienti s pozitivním výsledkem jsou skutečně nemocní.

$$PPV = \frac{a}{a+b}$$

Prediktivní hodnota negativního výsledku je podíl zdravých mezi všemi s negativním výsledkem. Prediktivní hodnota negativního výsledku je pravděpodobnost, že pacienti s negativním výsledkem jsou skutečně zdraví.

$$NPV = \frac{d}{c+d}$$

Pozitivní věrohodnostní poměr udává, kolikrát je pravděpodobnost pozitivního výsledku testu vyšší u nemocných než u zdravých pacientů.

$$LR+ = \frac{SE}{FP} = \frac{\frac{a}{a+c}}{\frac{b}{b+d}} = \frac{a(b+d)}{b(a+c)}$$

Negativní věrohodnostní poměr udává, kolikrát je pravděpodobnost negativního výsledku testu nižší u nemocných než u zdravých pacientů.

$$LR- = \frac{FN}{SP} = \frac{\frac{c}{a+c}}{\frac{d}{b+d}} = \frac{c(b+d)}{d(a+c)}$$

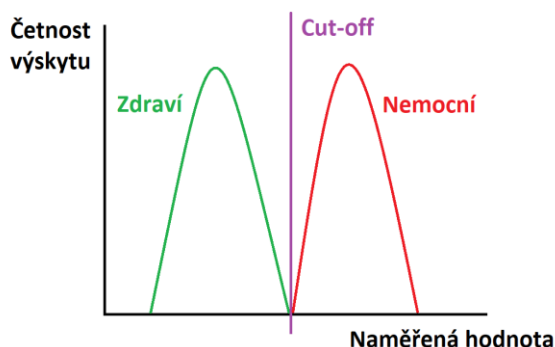
Hypotetický kvalitní diagnostický test by měl mít takové hodnoty věrohodnostních poměrů, aby jeho pozitivní výsledek přetvořil počáteční pravděpodobnost nemoci 50 % na alespoň 95 % a jeho negativní výsledek úplně vyloučil nemoc [112].

Diagnostický poměr šancí měří celkovou efektivitu testu. Je definován jako poměr šance, že test bude pozitivní, když pacient trpí nemocí, ku šanci, že test bude pozitivní, když pacient nemocí netrpí.

$$DOR = \frac{LR+}{LR-} = \frac{\frac{SE}{FP}}{\frac{FN}{SP}} = \frac{\frac{a}{a+c}}{\frac{c}{a+c}} \cdot \frac{\frac{d}{b+d}}{\frac{b}{b+d}} = \frac{a(b+d)}{b(a+c)} \cdot \frac{c(b+d)}{d(a+c)} = \frac{ad}{bc}$$

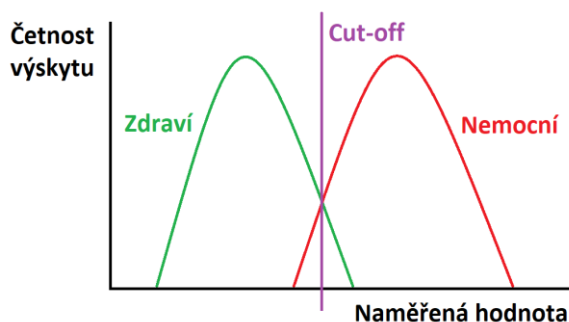
1.8.2. Určení optimální rozdělovací hodnoty

V ideálním případě se nemocní a zdraví pacienti ve sledovaném znaku liší tak výrazně, že výsledky testu u všech nemocných pacientů jsou nad rozdělovací hodnotou a výsledky testu všech zdravých kontrol jsou pod rozdělovací hodnotou.



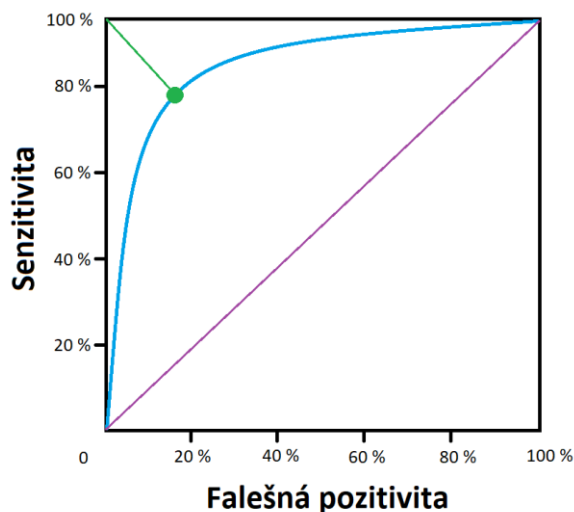
Graf 1.8: Ideální rozložení naměřených hodnot ve zdravé a nemocné populaci

Ve skutečnosti ale existují nemocní, kteří mají naměřenou hodnotu sledovaného parametru nižší než někteří zdraví. Rozdělovací hodnota se potom dá určit pouze tak, že výsledky několika málo nemocných se ocitnou pod ní a výsledky několika málo zdravých nad ní.



Graf 1.9: Rozložení naměřených hodnot ve zdravé a nemocné populaci v praxi

V závislosti na zvolené rozdělovací hodnotě se potom mění senzitivita a specifita testu. Receiver operating curve (ROC křivka) vzniká vynesemím závislosti senzitivity a falešné pozitivity na zvolené rozdělovací hodnotě do grafu. Plocha pod ROC křivkou (AUC) vypovídá o celkové schopnosti testu rozlišit nemocné a zdravé pacienty. Čím větší plocha pod křivkou, tím větší diskriminační schopnost testu. Testy, které nejsou schopny rozlišit zdravé od nemocných, mají ROC křivku blížící se diagonále a AUC 0,5 nebo jen lehce větší.



Graf 1.10: Receiver operating curve a hledání ideální rozdělovací hodnoty

Nejvýhodnější rozdělovací hodnota se určí pomocí Youdenova indexu J. Rozdělovací hodnota musí mít Youdenův index pokud možno co nejvyšší. Cílem je vybrat takovou rozdělovací hodnotu, jejíž obraz na grafu má co možná nejmenší vzdálenost od obrazu 100% senzitivity a 0% falešné pozitivity.

$$J = \text{maximum} \{SE + SP - 1\}$$

1.9. Předoperační diagnostika

Základem každého diagnostického algoritmu je klinické podezření na infekci kloubní náhrady [351]. Teprve potom se spouští kaskáda nejrůznějších vyšetření tak, jak byla popsána výše. Každý test má určitou vypovídající hodnotu, vyjádřenou nejčastěji jeho senzitivitou a specificitou. Tyto vlastnosti byly stanoveny na souborech pacientů, kteří měli na základě klinického podezření určitou nenulovou předtestovou pravděpodobnost infekce kloubní náhrady.

Nejsenzitivnější ukazatel infekce kloubní náhrady je sérový interleukin 6 se senzitivitou 97 %, následovaný podílem neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku (senzitivita 90 %), celkovým počtem leukocytů ve výpotku a synoviálním CRP (oba 88 %). Tyto parametry jsou vhodné pro vyloučení diagnózy infekce kloubní náhrady. Nejvyšší specificitu má bakteriální kultivace (95 %). Sonikace implantátu má nejvyšší pozitivní věrohodnostní poměr (17,2). Tedy pokud je pouze malé podezření na infekci kloubní náhrady, pozitivní kultivace sonikačního roztoku toto podezření promění v jistou diagnózu. Vysoké pozitivní věrohodnostní poměry mají také klasická bakteriální kultivace a cytologická analýza kloubního výpotku. Nejlepší negativní věrohodnostní poměr má sérový interleukin 6 (0,03). Negativní výsledek tohoto testu tedy dokáže podezření na IKN spolehlivě rozptýlit. Sérový IL-6 je jediný ze všech testů používaných v diagnostice infekce kloubní náhrady, který má soubornou senzitivitu i specificitu prokázanou v metaanalýze vyšší než 90 %, což z něj dělá nejpřesnější test. Ostatní testy jsou vhodné spíše na potvrzení nebo spíše na vyvrácení diagnózy IKN a musíme tedy pracovat s jejich kombinacemi. Ani sérový IL-6 není dokonalým ukazatelem IKN: nelze ho použít například u infekce TEP ramen, kde má senzitivitu pouze 12 % [2].

Na ambulanci máme k dispozici krevní testy a zobrazovací metody. Pokud se již předoperačně podaří aspirovat výpotek, s největší pravděpodobností dostaneme dost výsledků pro stanovení správné diagnózy.

1.9.1. Anamnéza

Na začátku celého komplexu vyšetření s cílem potvrzení nebo vyloučení infekce kloubní náhrady stojí pečlivý odběr anamnézy. Podezření na IKN vzniká, když pacient udává sekreci z operovaného kloubu nebo máme zprávy o prodlouženém hojení operační rány s výtokem jakéhokoliv druhu nebo dokumentaci o potvrzené povrchové nebo hluboké infekci operační rány z minulých operací. Riziková je bakteriémie v krátké době před nástupem symptomů, opakované předchozí operace na dotčeném kloubu a anamnéza předchozí infekce kloubní náhrady na jakémkoliv kloubu. Součástí anamnézy je obecně zhodnocení všech možných rizikových faktorů pacienta, hlavně komorbidit, jako je diabetes, systémová zánětlivá onemocnění a imunodeficience, a dále farmakologická anamnéza s důrazem na imunosupresi. Nezapomínáme na údaje o abusu alkoholu, nikotinu i drog.

Symptomy mohou nastoupit zhoršením ne úplně ideálního pooperačního průběhu, typicky v případě akutní pooperační IKN. Jindy obtíže přijdou náhle z plného zdraví po období nebolestivého fungování protetického kloubu a spokojenosti s výsledkem operace. Takový začátek je obvyklý u akutní hematogenní IKN. Jiný možný scénář je trvalé pobolívání po celou dobu od implantace bez období úlevy, zpomalená rehabilitace a ztuhlost operovaného kloubu – obraz opožděné pooperační IKN. I hematogenní infekce může být způsobena nízcí virulentním kmenem a nabývat obrazu low-grade infekce. V tom případě pacient udává postupný nárůst bolestivosti a zhoršení rozsahu pohyblivosti dříve bezproblémového protetického kloubu, kterému může a nemusí předcházet horečnaté nebo lokální infekční onemocnění [319].

Anamnéza musí obsahovat celou historii onemocnění, tedy primární diagnózu a předchozí úrazy a operace na kloubu, průběh operace a pooperačního období včetně rehabilitace a eventuálních komplikací, typ protézy, komorbidity, seznam užívaných léků, lékové alergie a antibiotickou epikrízu, tedy druh antibiotika, cestu podání, dávkování a datum nasazení a ukončení antibiotické léčby.

1.9.2. Klinický nález

Typickými příznaky akutní pooperační nebo akutní hematogenní infekce kloubní náhrady jsou silná bolest kloubu a nemožnost zátěže končetiny, lokální horkost, otok a zarudnutí, u kolena často s výpotkem. Akutně probíhající infekce mohou být doprovázeny celkovými příznaky bakteriémie, jako jsou febrilie, dušnost, schvácenost a slabost. Poměrně rychle se může vyvinout septický stav. Akutní průběh se septickými projevy je přítomný u 1/3 pacientů s infekcí kloubní náhrady, obvykle u hematogenního rozsevu. Příznaky sepse se vyjadří jen u desetiny pacientů s časnou pooperační infekcí. Pouze čtvrtina pacientů s časnou pooperační infekcí kloubní náhrady má teplotu nad 38,3 °C [267]. Daleko větší procento pacientů spadá do kategorie nejasných případů. Samotná subfebrilie nebo nízké febrilie nemusí nutně znamenat rozvoj infekce kloubní náhrady. Během prvních 5 dnů po implantaci se přípouští tělesná teplota až 38 °C [298]. Nejspecifičtějším klinickým příznakem IKN je provalení kloubní píštěle navenek. Potom je diagnóza IKN jistá. Píštěl se ovšem vyskytuje jenom v 5 % případů IKN [244].



Obrázek 1.3: Typický klinický projev infekce kloubní náhrady. Zarudnutí, horkost, bolest, otok, výpotek, nemožnost zátěže končetiny. Archiv ortopedické kliniky FNOL a UPOL.

Příznaky IKN nemusí být vyjádřeny markantně hned od začátku, ale mohou se vyvíjet postupně. Infekce kloubních náhrad způsobené nízkou virulentními kmeny neboli low-grade infekce často postrádají klasické příznaky infekčního zánětu. Místo toho si pacienti stěžují na přetrvávající pobolívání po operaci a při rehabilitaci dělají pomalejší pokroky než jejich vrstevníci. Pomalá osteolýza způsobí uvolnění implantátu, a to potom může být mylně interpretováno jako primární příčina obtíží. Samotná bolest protetického kloubu je nejsenzitivnějším příznakem infekce, protože každá IKN alespoň trochu bolí. Bolest má však ze všech příznaků nejnižší specifitu, protože většina ostatních poruch protetického kloubu je rovněž bolestivá [22]. Díky tomu, že infekce kloubní náhrady často imituje příznaky aseptického uvolnění, je její diagnostika obtížná. Pouze 25 % pacientů s IKN můžeme snadno diagnostikovat podle typických příznaků infekce [237]. Tabulka 1.15. shrnuje výskyt nejčastějších příznaků mezi pacienty s infekcí kloubní náhrady.

Příznak	Výskyt mezi pacienty s IKN
Porucha hojení operační rány s hnisavou sekrecí	72 %
Nesnesitelná bolest protetického kloubu	42 %
Erytém	42 %
Teploty nad 37,5 °C	38 %
Otok protetického kloubu	25 %
Systolická hypotenze < 90 mmHg	6 %
Kloubní píštěl provalená navenek	5 %

Tabulka 1.15: Četnost výskytu nejčastějších klinických příznaků mezi pacienty s infekcí kloubní náhrady. Převzato z [244]



Obrázek 1.4: Fulminantní průběh infekce MRSA v revizním kloubu provázený rychle se rozvíjející nekrózou kůže a podkoží bérce. Jedná se o ojedinělý případ. Archiv Ortopedické kliniky FNOL a UPOL.

1.9.3. Krevní testy

Do souboru vyšetření k diagnostice IKN patří tradiční metody, jako jsou sedimentace erytrocytů, krevní obraz a sérový CRP, ale i velmi moderní technologie, jako například sekvenování příští generace. K vyloučení low-grade infekce vyvolané nízkou virulentním původcem bylo navrženo několik postupů. Žádný z nich se však neukázal jako zcela spolehlivý. V žádném případě se nemůžeme spoléhat na výsledek jednoho testu, byť by byl sebecitlivější a 100% specifický.

Krevní leukocyty nejsou přesným ukazatelem toho, co se děje uvnitř kloubu, nicméně díky dostupnosti vyšetření a pro úplnost je rutinně stanovujeme. Senzitivita vyšetření je 45 % a specifická 87 % [25].

Předoperační **sedimentace erytrocytů** vyšší než 30 mm za hodinu má senzitivitu 75 % a specifickou 70 %. Sedimentace se po prodělaném zánětu nebo operaci vrací do normálních hodnot i několik měsíců, proto se nepoužívá k vyloučení časné pooperační infekce kloubní náhrady.

CRP je obecně lepším ukazatelem zánětu než sedimentace erytrocytů, protože je senzitivnější i specifičtější a po odeznění zánětu se rychleji vrací do normálních hodnot [270]. Předoperační sérový CRP má senzitivitu 88 % a specifickou 74 %. Rozdělovací hodnoty se u různých autorů pohybovaly v rozmezí 3 až 135 mg/l, ale nejčastěji doporučovaná rozdělovací hladina je 10 mg/l. U akutně probíhajících IKN je diagnóza snadná, CRP bývá obvykle vyšší než 75 mg/l [267].

V diagnostických algoritmech se často vyskytují CRP a sedimentace erytrocytů společně jako jeden ukazatel. Pokud považujeme za pozitivní výsledek to, že CRP je vyšší než 10 mg/l a zároveň sedimentace je vyšší než 30 mm/hod, tento kombinovaný test má senzitivitu 96 % a je vhodný k vyloučení infekce kloubní náhrady. Specifická je pouze 56 % [17]. Doporučení IDSA, že při negativě CRP i sedimentace nemáme pokračovat ve vyšetřování, tedy je ospravedlnitelné.

Interleukin 6 (IL-6) je produkován aktivovanými monocyty a makrofágy a jeho koncentrace v séru i v kloubním výpotku je vysoce senzitivní i specifická pro infekci kloubní náhrady. Jeho biologický poločas je pouze 15 hodin v porovnání s poločasem CRP 62 hodin. IL-6 je vhodný i k detekci časné infekce kloubní náhrady již několik dní po operaci, protože po odeznění zánětu se jeho hladina rychle vrací k normální hodnotě [332]. Senzitivita sérového IL-6 je 97 % a specifická 91 %. Rozdělovací hodnota se uvádí 10 – 12 ng/l [25].

D-dimery v některých studiích vykazují výborné výsledky, tedy vyšší přesnost než sedimentace erytrocytů nebo CRP [269], v jiných dosahují srovnatelných hodnot u IKN i pacientů s aseptickým uvolněním, takže se zdají být nepoužitelné [362]. První metaanalýza udává senzitivitu 75 % a specifickou 69 %. Metaanalýza pracuje s relativně malým počtem heterogenních původních prací a budeme tedy čekat na metaanalýzy z větších souborů z více zemí. D-dimery lze stanovit ze séra nebo z plasmy. V případě stanovení ze séra je senzitivita 86 % a specifická 84 % [369].

Prokalcitonin se užívá v diagnostice jiných infekcí a o jeho vztahu k IKN máme omezená data. Prokalcitonin má k IKN senzitivitu pouze 53 %, ale díky specifické 96 % by se dal využít k vyloučení IKN při podezření na elevaci CRP a sedimentace z neinfekční příčiny [338].

Podobné vlastnosti jako prokalcitonin má i tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) se senzitivitou 43 % a specifickou 94 % [32].

1.9.4. Zobrazovací metody

Prostý RTG snímek patří do souboru základních vyšetření první linie i při podezření na infekci kloubní náhrady. Díky snadné dostupnosti a zanedbatelné dávce záření se zhotovuje prostý snímek téměř vždy při primárním vyšetření v ortopedické ambulanci. Ostatní zobrazovací metody, tedy ultrazvuk, výpočetní tomografie a magnetická resonance, hrají v diagnostice IKN pouze marginální roli.



Obrázek 1.5: Osteolýza a heterotopické osifikace u TEP kyčle. Laskavě poskytl Radiologická klinika FNOL a UPOL.

velmi rychle (tj. migrace komponenty více než 2 mm za 6 měsíců), vyvolává to důvodné podezření na IKN [71].

Výpočetní tomografie (CT) je už relativně senzitivní (83 %) i specifická (96 %) metoda. Nasazuje se u nejasných nálezů na prostém RTG snímku. Její výhodou je přesné zobrazení anatomických poměrů v kostech i měkkých tkáních, přesná lokalizace a určení rozsahu periprotetické osteolýzy. Osteolýza je ovšem přítomna i u aseptického uvolnění. Na CT je možné objevit sekvestr, denzní fragment izolovaný od okolní kosti. To je patognomický nález pro IKN, ovšem vyskytuje se jen v 8 % případů [55]. Akumulace měkkých tkání kolem zóny osteolýzy nebo periostální reakce vyvolávají rovněž podezření na IKN [158]. Otázkou je, zda CT přináší proti prostému snímku něco nového, co zvrátí diagnostickou rozvahu. Vyšetření CT je navíc ovlivněno metalickými artefakty, pokud není k dispozici speciální korigující program.

CT lze použít k navigaci při punkci kyčelního kloubu, i když většina ortopedů používá raději ultrazvuk.

Hlavním smyslem **prostého RTG snímku** je vyloučení neinfekčních příčin symptomatického protetického kloubu, jako je například periprotetická fraktura, fraktura nebo dislokace komponenty, protože IKN má v prvních měsících až letech normální nález na RTG. IKN se může a nemusí projevit radiolucenční linií, osteolýzou, sklerózou, uvolněním komponenty, frakturou cementového pláště, masivními ektopickými osifikacemi, viditelným výpotkem nebo přítomností plynu v přilehlých tkáních. Plyn se obvykle vyskytuje u infekcí anaerobními mikroorganismy. Pokročilé onemocnění může mít na snímku i subperiostální elevaci nebo transkortikální píštěl [350]. Zmíněné známky ovšem nejsou senzitivní ani specifické. Přítomnost radiolucenční linie nebo nové periostální apozice kosti má senzitivitu 75 %, ale specificitu jen 28 %. Samotná periostální apozice má specificitu 100 %, ale vyskytuje se jen v 16 % případů IKN [293].

Prostý RTG snímek má své místo při sledování vývoje nálezů v průběhu času a při plánování eventuální operace [293]. Osteolýza i migrace komponenty jsou spojovány s aseptickým uvolněním. Pokud se však vyvíjí

Magnetická resonance poskytuje v okolí kovů nekvalitní obraz ovlivněný metalickými artefakty, nicméně v detekci purulentní infekce a periprotetické osteolýzy kolem paramagnetických implantátů (např. z titanu nebo tantalu) může být relativně přesná [158]. Pokrokem jsou nepochybně programy umožňující digitální korekci metalických artefaktů. Magnetická resonance je rozhodně přesnější než RTG nebo CT v zobrazení otoku, píštělí nebo tekutinových kolekcí v měkkých tkáních. MRI indikujeme místo CT v případech alergie na jódovou kontrastní látku.

Ultrazvuk zobrazí otok kloubního pseudopouzdra a kloubní výpotek. Používáme ho k přesně mířené punkci kyčelního kloubu.

Arthrografie je mnohými již považována za zastaralou a neúčinnou metodu, nicméně v literatuře najdeme zmínky o užití arthrografie k zobrazení píštělí a tekutinových kolekcí navazujících na kloubní dutinu [18].

1.9.5. Nukleární medicína

Scintigrafie ani PET/CT nebyly zařazeny do standardního algoritmu diagnostiky infekce kloubní náhrady. Domníváme se, že hlavním důvodem je cena těchto vyšetření v USA. Scintigrafie může v určitých situacích přinést cenné informace, zvláště v nejasných případech, kde nemůžeme postupovat podle standardního diagnostického algoritmu, na příklad kvůli suché kloubní punkci nebo protichůdným výsledkům ostatních vyšetření. V praxi používáme dvě radionuklidové diagnostické metody: třífázovou kostní scintigrafii a scintigrafii značenými leukocyty.

Třífázová scintigrafie kostí je založena na vychytávání methylenidifosfonátu značeného metastabilním techneciem ($^{99m}\text{Tc-MDP}$) v místech zvýšené kostní přestavby. Tato metoda je velmi citlivá, ovšem nespecifická (udává se specifická 18 %). Dokáže odhalit uvolnění implantátu od kosti, ale nerozlišuje uvolnění infekční od aseptického [193]. Zvýšené vychytávání radiofarmaka na rozhraní kosti a implantátu v blood pool fázi a v pozdní fázi může vyvolat podezření na IKN. Potom se doporučuje doplnit scintigrafii značenými leukocyty [293]. Normální nálezy na třífázové scintigrafii vylučují uvolnění komponenty, ale neznamená, že infekce není přítomna [319]. Naopak, low-grade infekce nízkou virulentním kmenem může probíhat dlouho bez známek uvolnění implantátu. Pozitivní nálezy na třífázové scintigrafii je běžný první jeden až dva roky po implantaci, kdy probíhá intenzivní osteointegrace implantátu, takže třífázovou kostní scintigrafii indikujeme až po dvou letech od implantace při podezření na pozdní hematogenní infekci. Existují ojedinělé studie na souborech pozdních infekcí TEP kyčlí [221], které dokládají relativně vysokou senzitivitu (88 %) a specifitu (90 %) vyšetření.

Scintigrafie značenými leukocyty detekuje místa většího hromadění leukocytů, tedy zánětlivá ložiska, pomocí značení pacientových autologních leukocytů $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ (komplex hexamethylpropylenaminoximu a metastabilního technecia). Senzitivita metody pro infekci TEP kolena je 84 %, pro TEP kyčle jen 57 %. Specifita metody pro TEP kolena je 52 % a pro TEP kyčle 75 % [28]. Leukocyty je možné značit eventuálně radioaktivním izotopem indiumu ^{111}In . Zprávy o přesnosti této metody se značně rozcházejí. Senzitivita nabývá hodnot 64 % až 100 % a specifita bývá 70 % až 91 % [293]. Metoda tedy není příliš přesná, ale může nám být nápomocná, když nemáme k dispozici kloubní výpotek. Pokud je negativní nálezy na třífázové scintigrafii kostí a pozitivní nálezy na scintigrafii značenými leukocyty, IKN je pravděpodobná.

Pozitronová emisní tomografie (PET) je založená na vychytávání fluorodeoxyglukózy v metabolicky aktivních tkáních a následném zobrazení fotonů gama, které vznikají radioaktivním rozpadem izotopu ^{18}F . Je široce využívaná v zobrazení nádorů a metastáz. V zobrazení infekce kloubní

náhrady má senzitivitu 82,1 % a specificitu 86,6 %. S ohledem na vysokou finanční náročnost a nepříliš přesvědčivou přesnost toto vyšetření v diagnostice IKN vhodné není.

1.9.6. Analýza kloubního punktátu

Punkci protetických kloubů na ambulanci neprovádíme rutinně při základním vyšetření, ale pouze při důvodném podezření na infekci kloubní náhrady, které se opírá o anamnézu, klinický nález, prostý RTG snímek a výsledky krevních testů. Při punkci samotné totiž existuje nezanedbatelné riziko, že i po dodržení všech zásad antiseptického postupu zavlečeme k implantátu bakterie kožní flóry. Většina vlivných ortopedů doporučuje provádět punkci u všech kloubních náhrad bez ohledu na míru podezření na infekci kloubní náhrady. Svou strategii odůvodňují obavou, aby jim neunikly infekce způsobené nízké virulentními kmeny [4]. Punkce by se optimálně měla provádět na speciálním sálku.

Punkce nativního i protetického kolena je poměrně jednoduchým úkonem a kolem TEP kolena bývá výpotek přítomen velice často. Pro odběr tekutiny z okolí TEP kyčle je výhodná pomoc ultrazvuku. Výpotek kolem TEP kyčle často nebývá přítomen.

Výpotek se standardně odesílá na mikroskopii a kultivaci, stanovení počtu leukocytů a diferenciálního rozpočtu leukocytů. Nově do standardu přibyla i biochemická analýza. Na výpotek je zaměřena i řada nových experimentálních metod.

Cytologická analýza kloubního punktátu. Počet leukocytů v kloubním punktátu a podíl neutrofilů v jejich diferenciálním rozpočtu jsou dva stěžejní parametry, které mají rozhodující roli v předoperační diagnostice infekce kloubní náhrady. Mezinárodní konsenzus 2018 doporučuje jako rozdělovací hodnoty 3000 leukocytů/ μ l výpotku a 80 % neutrofilů. Během prvních 90 dní po operaci doporučuje použít vyšší rozdělovací hodnoty, 10 000 leukocytů/ μ l a 90 % neutrofilů. Metaanalýza 15 cytologických studií udává u počtu leukocytů ve výpotku soubornou senzitivitu 88 % a specificitu 93 %, u podílu neutrofilů potom senzitivitu 90 % a specificitu 88 % [376]. Mezinárodní konsenzus 2013 i 2018 dovoluje nahradit test počtu leukocytů ve výpotku testem **leukocytové esterázy**. Leukocytová esteráza se stanovuje detekčním papírkem, který byl původně navržen pro detekci leukocyturie. Za pozitivní se považuje nález ++. Senzitivita testu je 93 % a specificita 77 % [293].

Biochemická analýza kloubního punktátu. V posledních letech bylo v kloubním výpotku objeveno několik zánětlivých ukazatelů, které mají výrazně vyšší koncentraci v infikovaných protetických kloubech než v aseptických. Tyto látky jsou součástí vrozené antibakteriální imunity. Výhodou biochemických markerů je, že mají vysokou senzitivitu a specificitu k infekci kloubní náhrady. Bohužel není možné je stanovit, pokud se výpotek zbarví krví. Diagnosticky nejpřínosnější jsou α -defensiny, interleukin 6, CRP a NGAL. Od roku 2018 jsou α -defensin a CRP součástí diagnostického algoritmu a rutinně se stanovují.

Alfa-defensin je antimikrobiální peptid, secernovaný do kloubního výpotku lokálními neutrofily v reakci na přítomnost bakterií, nezávisle na typu nebo virulenci bakterie. Jeho senzitivita pro IKN je 95 % a specificita 97 %. Výsledky stanovení synoviálního α -defensinu vycházejí falešně negativní, pokud je IKN způsobena nízké virulentním kmenem [70].

Synoviální CRP vykazuje vyšší senzitivitu i specificitu než jeho sérový protějšek. Mezinárodní konsenzus 2018 udává rozdělovací hladinu 6,9 mg/l s poznámkou, že se hodnota bude zpřesňovat po uveřejnění dalších diagnostických studií. Senzitivita synoviálního CRP se pohybuje dle různých autorů v rozmezí 85 – 87,5 %, specificita má větší rozptyl: 71 – 98 %.

1.9.7. Předoperační bakteriologie

Klasická kultivace

Ambulantně odebrané vzorky výpotku z protetického kloubu mají obecně nízkou kultivační výtěžnost, obzvláště v porovnání s peroperačními vzorky periprotetických tkání. Není pravidlem, že v době odběru výpotku na ambulanci obsahuje výpotek dost početnou frakci volně plovoucích reprodukčně aktivních bakterií, aby běžná kultivace přinesla požadovaný výsledek. Senzitivita kultivace ambulantně odebraného punktátu se uvádí 45 – 100 % [301], specificita 88 – 97 % [293]. Vyšší senzitivity i specificity lze dosáhnout, pokud se výpotek inokuluje do lahvičky na hemokulturu. Tím se minimalizuje šance usmrcení původce při transportu do laboratoře, ale také riziko kontaminace vzorku. Při použití lahviček na hemokultury se uvádí senzitivita 66 – 87 % a specificita 95 - 100 %. Souhrnnou senzitivitu a specificitu předoperační kultivace výpotku stanovila metaanalýza na 72 %, resp. 95 % [254].

Naprostou nutností je vysadit antibiotika 14 dní před plánovaným odběrem na kultivaci. Ovšem ne vždy nám to dovoluje celkový stav pacienta. Akutní stavy je třeba řešit ihned a na ortopedickou kliniku se pacienti často dostávají již s antibiotiky nasazenými empiricky praktickým lékařem. Akutně probíhající infekce kloubních náhrad mají naštěstí vyšší senzitivitu kultivace kloubního punktátu, protože se u nich větší frakce bakterií vyskytuje v planktonické formě [293].



Obrázek 1.6: *Staphylococcus epidermidis* na krevním agaru. Laskavě poskytl Mgr. Renata Večeřová, Ph.D., Ústav mikrobiologie FNOL a UPOL

Obzvláště při podezření na low-grade infekci je třeba kultivaci výpotku provést za aerobních i anaerobních podmínek, na půdách pro bakterie, mykobakterie i pro houby. Low-grade infekce totiž bývají způsobené koaguláza-negativními stafylokoky, anaeroby nebo kvasinkami. Ačkoliv je původce *Mycobacterium tuberculosis* u infekcí kloubních náhrad extrémně vzácný, musíme na něj myslet u opakovaně negativních kultivací a podezření na low-grade infekci. Pokud je první kultivace negativní a naše podezření trvá, je na místě aspirovat výpotek ke kultivaci ještě alespoň dvakrát s časovým odstupem [312]. Někteří autoři doporučují aspirát rozdělit do více zkumavek a kultivovat každý vzorek

zvláště pro odlišení kontaminace od původce onemocnění. Pokud se vykultivuje stejná bakterie ve více vzorcích stejného punktátu, pak se pravděpodobně jedná o původce [224].

Provádět stěry ze zevních ústí pístělí je zavádějící, protože pístěle se postupně kolonizují okolní kožní flórou [346]. Shoda mezi výsledkem stěru z pístěle a následnou kultivací periprotetických tkání je pouze 53 % [295].

V případě suché punkce je možné aplikovat do kloubní dutiny sterilní fyziologický roztok a re-aspirovat ho. Takto lze získat vzorek pro kultivaci i u pacientů bez kloubního výpotku. Senzitivita re-aspirovaného roztoku je podle jedné práce větší než senzitivita kultivace z výpotku [236].

Molekulární metody

Bakterie vázané v biofilmech často unikají detekci pomocí běžného kultivačního vyšetření, a proto bývají stále častěji doporučovány molekulární metody detekce bakteriální DNA nebo RNA [53]. Uvnitř biofilmu totiž bakterie exprimují jiné geny než v planktonické formě a tyto bakterie nejsou schopny vytvořit sledovatelné kolonie na běžných agarových plotnách. **Polymerázová řetězová reakce (PCR)** je velmi citlivá metoda, která současně vyhledává více než 3000 bakteriálních druhů a zároveň je schopna geneticky přesně určit původce. Je rychlá, levná, automatizovaná a poskytuje i semikvantitativní údaj o bakteriální náloži.

Uvádí se, že nevýhodou PCR je vysoká míra falešné positivity způsobená kontaminací vzorku zavlčenou DNA i určitý stupeň falešné negativity způsobený kontaminací vzorku inhibitory replikace DNA nebo nedostatečnou extrakcí DNA z bakteriálních buněk. Extrakce DNA je důležitým krokem k úspěšnému provedení PCR, který se musí provést podle přesně stanoveného protokolu. Bakteriální DNA přetrvává uvnitř těla pacienta ještě měsíce až roky po vyléčení známé nemoci, tedy po tuto dobu bude PCR přinášet falešně pozitivní výsledky nehledě na fyzickou nepřítomnost viabilních bakterií v kloubu pacienta [185]. PCR není ovlivněna předchozím podáním antibiotik, které způsobuje falešnou negativitu běžných kultivačních vyšetření [319]. Senzitivita PCR se uvádí 71 %, specificita 97 % [107]. Pokud se vyšetřuje 1 vzorek od každého pacienta, studie poskytují poněkud různorodé výsledky. Panousis udává senzitivitu 92 % a specificitu 74 % [234]. PCR může být senzitivní i specifická metoda, pokud se odebere z každého kloubu 5 vzorků a za pozitivní nález se označí jen nález stejného původce ve dvou a více vzorcích z téhož kloubu. Takto bylo dosaženo senzitivity 94 % a specificity 100 % [204].

Viabilita nalezených bakterií se prokazuje pomocí PCR s reverzní transkriptázou, která detekuje přítomnost mRNA „housekeeping genů“, která má extrémně krátký biologický poločas, a její nález tedy znamená, že vznikla v živé bakteriální buňce v posledních minutách před vyšetřením [288].

Existuje několik protokolů extrakce DNA. Doporučený postup je naložení kostních a kloubních vzorků přes noc do pufru s proteinázou K. To výrazně prodlužuje časovou náročnost vyšetření. Výhledově bude možné proces zkrátit tak, aby PCR přinesla výsledky již za 6 hodin po odběru vzorku (v porovnání s 24hodinovou kultivací v běžné praxi) a redukovala dobu stanovení citlivosti původce k antibiotikům ze 3 dní na 1 den [288].

Pro detekci bakteriální DNA se užívají primery komplementární s konzervovanými geny přítomnými ve většině bakteriálních genomů, a zároveň chybějícími v lidském genomu nebo v genomech virů nebo hub, např. gen pro 16S ribosomální RNA [346]. Tento přístup neodhalí polymikrobiální nález ani neidentifikuje původce. K identifikaci původce je třeba ve druhém kroku použít restriční analýzu nebo sekvenování. Druhou možností je použití druhově specifických primerů, které amplifikují pouze DNA jednoho specifického původce. Tento postup odhalí v polymikrobiálních

vzorcích i tu bakterii, která by na běžné kultivační plotně byla přerostlá rychle rostoucím kmenem, a tedy snadno přehlédnutelná [185].

Molekulární metody stanovení původce se neužívají v diagnostice rutinně, ale jsou rezervovány pro případy s negativní kultivací, kterých dle různých zdrojů bývá 5 – 15 %. PCR je schopna detekovat SCV zlatého stafylokoka, pomalu rostoucí kmeny, anaeroby a metabolicky inaktivní kmeny. PCR indikujeme tam, kde předpokládáme polymikrobiální flóru, abychom identifikovali i pomaleji rostoucího původce – tedy u otevřených ran a píštělí [185].

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je nástroj současné detekce i identifikace bakterií. FISH umožňuje i zobrazení prostorové organizace bakterií uvnitř biofilmu [30]. Praktické použití má jako potvrzovací metoda při nálezu bakterií pomocí PCR [288].

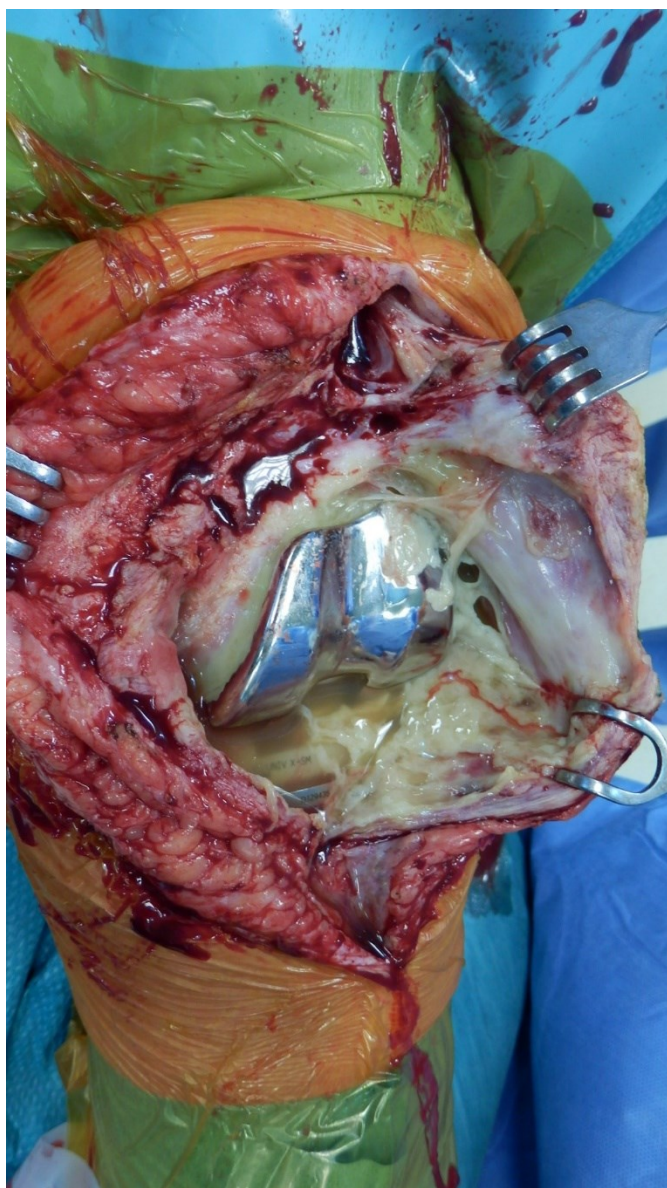
Hitem poslední doby je **sekvenování příští generace (NGS)**, které prezentuje polymikrobiální charakter infekce kloubní náhrady a často identifikuje i velmi netypické původce. Metody NGS jsou rychlé a automatizované a v blízké budoucnosti umožní i stanovení transkripční aktivity, a tedy i antibiotické rezistence nalezeného mikroorganismu. Není však jasné, jak bychom měli v těchto případech klinicky postupovat. Nalezený mikroorganismus totiž nemusí být nutně zapojený do patogeneze infekčního onemocnění [126].

1.10. Peroperační diagnostika

Pro pacienta i ortopeda je nejuvhodnější, jestliže je diagnóza infekce kloubní náhrady známa již před začátkem operace. Někdy je však nutné s definitivním stanovením diagnózy počkat na výsledky peroperačních odběrů. Je třeba mít na paměti, že každá aseptická revize je ve skutečnosti potenciální low-grade infekce kloubní náhrady, která se může prozradit až pozitivní peroperační kultivací nebo histologií.

1.10.1. Peroperační makroskopický nález

Protetický kloub postižený infekcí má výrazně změněné tkáně v porovnání se zdravým kloubem. Měkké kolemkloubní tkáně mohou a nemusí být kompromitované. Mezi svaly a v podkoží se mohou tvořit abscesové dutiny a píštěle.



Kloubní pouzdro bývá tlustší, fibrotizované, synovialis silně prosáklá a lividní, dosahující řádově až centimetrové tloušťky. Kloubní struktury bývají povleklé bělavou kašovitou zánětlivou hmotou a v kloubu bývá přítomen výpotek. Výpotek není pravidlem, obzvláště u kyčlí se setkáváme se suchými infikovanými protetickými klouby. Charakter výpotku je obvykle hnisavý. Může nabývat různých barev z celého spektra od lehce zkaleného nažloutlého přes hustý žlutavý výpotek s vločkami (fibrinovými koaguly), hustý smetanový až k barvě kávy s mlékem. V případě metalózy a nepříznivé lokální tkáňové reakce je výpotek zbarven do tmavě modra až do černa, stejně jako všechny tkáně kloubu. Komponenty někdy zůstávají pevně ukotveny v kosti nebo jsou uvolněné. Pod volnými komponentami pravidelně nacházíme zóny osteolýzy, které vypadají jako defekty, kavity obklopené měkkou neplnohodnotnou kostí. Mezi komponentou a kostí se tvoří pablány (SLIM) různé tloušťky. SLIM je přítomna vždy, i u asepticky uvolněných, i u stabilních protetických kloubů. U volných implantátů bývá pablána širší. Pablány rovněž vidáme mezi součástmi implantátu, např. mezi tibiální komponentou a polyethylenovou vložkou TEP kolena.

Obrázek 1.7: Peroperační makroskopický nález při revizi infikované TEP kolena. Rozbředlá synovialis, zánětlivě změněné pouzdro, destruovaný vazivový aparát, hnis v kloubní dutině, uvolněný implantát. Archiv Ortopedické kliniky FNOL a UPOL.

1.10.2. Vyšetření s rychlými výsledky

V některých případech nemusí být definitivní diagnóza selhání implantátu stanovená předoperačně. Předpokládá se aseptické uvolnění implantátu, ale existuje určité podezření na infekci kloubní náhrady, které předoperačně nešlo jednoznačně vyloučit. Operatér může peroperačně využít několika rychlých metod, které mu pomohou s rozhodnutím, zda provést jednodobou reimplantaci asepticky uvolněného implantátu nebo první dobu dvoudobé reimplantace u IKN. Tato vyšetření jsou přímá mikroskopie tkáňových vzorků obarvených dle Grama, histologická analýza zmražených vzorků, stanovení leukocytové esterázy, interleukinu 6, α -defensinu či kalprotektinu ve výpotku.

Barvení peroperačních tkáňových vzorků nebo výpotku dle Grama je hrubou orientační metodou, která má dle různých zdrojů velmi variabilní senzitivitu 14,7 – 92 % a v klinické praxi se nepoužívá. Při eventuelním nalezení bakterií je ovšem diagnóza infekce téměř jistá a specificita se uvádí 98 – 100 % [298]. AAOS ve své směrnicí z roku 2010 doporučuje nepoužívat přímou mikroskopii k detekci bakterií v peroperačních vzorcích [68].

Histologická analýza zmražených peroperačních vzorků je považována za pozitivní, pokud se najde 5 nebo více polymorfonukleárních leukocytů na jednom zorném poli při 400násobném zvětšení a prohlédnutí 5 zorných polí. Tato metoda má dle různých zdrojů velmi variabilní senzitivitu 43 – 100 %. Závisí totiž jak na virulenci vyvolávajícího agens, tak na erudici odečítajícího patologa, a proto není považována za přesnou [22]. Specificita se udává 94 – 100 % [298]. Zmražené vzorky mají pozitivní věrohodnostní poměr 12, dle některých zdrojů až 23 [68], ale negativní věrohodnostní poměr 0,23, což již není tak skvělé [310]. Pozitivní zmražené vzorky potvrdí diagnózu IKN, pokud na ni bylo i jen lehké podezření před operací. Negativní nález však není schopen diagnózu IKN vyvrátit, leda u pacienta, který měl i před operací nízkou předtestovou pravděpodobnost IKN.

Leukocytová esteráza je dle doporučení Mezinárodního konsenzu z let 2013 i 2018 test, který může nahradit stanovení počtu leukocytů ve výpotku. Peroperačně toto rychlé a snadné vyšetření můžeme nasadit u pacientů, kteří z jakýchkoliv důvodů neměli předoperačně počet synoviálních leukocytů stanoven. Senzitivita testu je 93 %, specificita 77 % [293].

Alfa-defensin se používá jako biomarker zánětu, který je vysoce senzitivní i specifický pro infekci kloubní náhrady. Stanovit ho můžeme ze vzorku kloubního punktátu v laboratoři metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) nebo přímo na sále pomocí rychlého imunotestu na bázi laterálního proudu (Synovasure®). ELISA v metaanalýze obstála se senzitivitou 95 % a specificitou 97 %. Rychlý imunotest vykázal senzitivitu pouze 85 % a specificitu pouze 90 %, takže spolehlivým nástrojem v diagnostice IKN rozhodně není. Detekční papírek na leukocytovou esterázu (LE) je levnější a má srovnatelnou přesnost [205]. Oba tyto testy (tj. Synovasure® a LE) můžeme provádět i předoperačně na ambulanci.

Alternativou ke stanovení alfa-defensinu je peroperační stanovení **interleukinu 6** pomocí rychlého imunotestu na bázi laterálního proudu (Milenia® QuickLine IL-6 Test). Imunotest je nastaven na rozdělovací hodnotu 10 000 ng/l, a je stejně přesný jako laboratorní stanovení metodou ELISA, tedy má senzitivitu 46,88 % a specificitu 97,62 %. Rychlý imunotest ani ELISA nemohou stanovit IL-6 ve výpotku při metalóze, nebo pokud je výpotek příliš viskózní nebo obsahuje fibrinová koagula [331]. Přesnost rychlého imunotestu IL-6 musí stanovit více nezávislých studií.

Podobně je dnes k dispozici rychlotest **kalprotektinu** ve výpotku (Lyfstone®, CALPRO AS, Norsko), který poskytuje výsledek do 15 minut s pravděpodobnostním zařazením případu. V literatuře však zatím stejně jako u rychlotestu synoviálního IL-6 chybí věrohodné důkazy pro jeho klinické nasazení [336].

1.10.3. Kultivace peroperačních vzorků

Peroperační vzorky mají vyšší senzitivitu než ambulantně punktovaný výpotek, jednak proto, že uvnitř tkání je pravděpodobně větší bakteriální nálož, jednak proto, že už při odběru vzorků se určitá proporce bakterií mechanicky odloučí od zbytku biofilmu [288]. Senzitivita vyšetření se odvíjí od počtu odebraných vzorků a také od toho, jestli pacient užil antibiotika v posledních 14 dnech předcházejících odběru.

Podání antibiotik před odběrem vzorků zvyšuje falešnou negativitu. Senzitivita kultivace peroperačních vzorků tkání po podání antibiotik se uvádí pouze 41 % [224]. Někteří autoři tvrdí, že podání ATB před odběrem vzorků vliv na falešnou negativitu nemá [115]. Falešnou negativitu peroperační kultivace dále způsobuje nízká bakteriální nálož, kultivačně náročný mikroorganismus, nevhodné transportní nebo kultivační médium nebo příliš dlouhý transport do laboratoře. Mezinárodní konsenzus doporučuje ATB předoperačně nepodat jen pacientům, u kterých očekáváme IKN a neznáme původce. V ostatních případech ATB profylaxi podat a falešnou negativitu kultivace peroperačních vzorků obejít použitím sonikace. Oddalovat ATB profylaxi u aseptických revizí konsenzus považuje za ohrožení pacienta vznikem nové IKN [350].

Je známo že peroperační stěry mají nižší výtěžnost než vzorky excidované tkáně [346]. Senzitivita peroperačních stěrů je průměrně 68 %, v krajním případě u chronických infekcí nízké virulentním kmenem jenom 40 % [293].

Správně odebrané vzorky ke kultivaci mají senzitivitu 65 – 94 % [301], průměrně 78 % [293]. Kultivace vzorků peroperačně odebraných periprotetických tkání má vyšší senzitivitu, pokud se provede v lahvičce na hemokulturu, v porovnání s klasickou agarovou plotnou. Metaanalýza udává 70% senzitivitu a 97% specifitu [368]. Spangehl udává senzitivitu kultivace peroperačních tkáňových vzorků 94 % a specifitu 97 %, ale vyloučil ze souboru pacienty, kteří před odběrem užívali antibiotika [280].

Mezinárodní konsenzus doporučuje běžnou kultivaci prodloužit na 14 dní, aby se zachytily i anaeroby a pomalu rostoucí kmeny. Tím se minimalizuje falešná negativita, zatímco riziko zachycení kontaminujícího kmene neroste vůbec nebo jen velmi málo [350].

Doporučuje se odebrat 3 – 6 vzorků tkáně, a to jak z pseudopouzdra, tak z membrány na rozhraní kosti a implantátu (pokud se provádí explantace). Samozřejmostí je odebrat každý vzorek novou sterilní čepelkou [350]. Jediná pozitivní peroperační kultivace nízké virulentním kmenem je považována za kontaminaci. Pokud je tentýž kmen vykultivován ve dvou vzorcích, z nichž ten druhý nemusí být peroperační, považujeme ho za původce onemocnění [22]. Pokud je z jediného vzorku vykultivován vysoce virulentní původce, považujeme to za patognomický nález.

1.10.4. Sonikace

Sonikace je označení pro uvolnění bakterií z biofilmu pokrývajícího povrch implantátu pomocí ultrazvuku. Implantát se nejprve ponoří do Ringerova roztoku a třepe se na třepačce Vortex. Potom následuje aplikace samotného ultrazvuku, znovu třepačka Vortex a nakonec centrifugace, která zkoncentruje bakterie uvolněné do roztoku. Ty se potom inokulují na kultivační půdy nebo do bujónu.

Nízkofrekvenční ultrazvuk (tedy v řádu kHz) tvoří uvnitř biofilmu mikroskopické kavitace, které posléze implodují a oddělují bakterie od povrchu implantátu [300]. Bakterie uvolněné z biofilmu pomocí ultrazvuku zůstávají životaschopné a tvoří na agaru kolonie. Účinnost sonikace při uvolnění

bakterií z biofilmu závisí na bakteriálním druhu, velikosti a tvaru implantátu a stádiu vyžívání biofilmu. Uvádí se, že pomocí sonikace lze z povrchu implantátu odstranit až 99,9 % biofilmu [160]. Senzitivita kultivace periprotetické tkáně se uvádí 60,8 %, zatímco senzitivita sonikace explantovaných komponent až 78,5 %. Tento rozdíl je ještě významnější u pacientů, kteří v době odběru materiálu již užívali antibiotika: 45 % u kultivace tkáně a 75 % u sonikace [305]. Významně vyšší výtěžnost sonikace proti kultivaci periprotetické tkáně vyšla ve skupině pacientů, u kterých se infekce nepředpokládala, tedy ve skupině low-grade mitigovaných infektů (100 % oproti 48,5 %) a ve skupině opožděných infekcí (88 % oproti 58 %) [253].

Specifická vyšetření je výrazně ovlivněna způsobem transportu do laboratoře a manipulace s explantátem. Pokud se použije pevná kádinka s uzávěrem, minimalizuje se riziko kontaminace a specifická vychází 81 – 100 %. Pokud transportujeme a sonikujeme explantát ve sterilním sáčku, specifická bude jenom 43 – 87 %, protože sáček je propustný a vystavuje explantát riziku vnější kontaminace [293][303].

Různé práce si stanovily různou rozdělovací hodnotu pro pozitivitu vyšetření sonikačního média, a to v rozsahu 1-200 CFU, z čehož opět plyne velký rozptyl senzitivity a specificity mezi jednotlivými studii. CFU lze spočítat na kultivačních plotnách. Není doporučeno sonikační médium kultivovat v bujónu, protože potom nejde kvantifikovat výsledek – vyjde dichotomicky pozitivní nebo negativní bez údaje o počtu uvolněných CFU.

Vyšetření sonikačního média pomocí PCR místo klasické kultivace nepřináší statisticky významnou změnu senzitivity nebo specifity vyšetření [122]. Teoreticky by mohlo dávat smysl v případě podání antibiotik před explantací.

Vysokofrekvenční ultrazvuk se k sonikaci nepoužívá. Ničí biofilm a bakterie usmrcuje. Předpokládá se, že vysokofrekvenční ultrazvuk aplikovaný na cementový spacer urychluje eluci antibiotika z kostního cementu [82].

Alternativou k sonikaci je použití samotné třepačky Vortex, které také zvyšuje senzitivitu kultivačního vyšetření, ovšem ne v takové míře jako sonikace. Vortex je vhodný jako metoda přípravy vzorku před vlastní sonikací, protože vytváří v biofilmu mikrobublínky a usnadňuje oddělení biofilmu od povrchu implantátu při následné sonikaci [373]. Při rozdělovací hodnotě 50 CFU je senzitivita samotného vortexování 40 %, zatímco sonikace má senzitivitu 60 % [248]. Samotné vortexování je tedy přijatelné pouze na menších pracovištích, kde není sonikace k dispozici.

Další alternativou k sonikaci je uvolnění bakterií z biofilmu v roztoku **dithiothreitolu** (DTT), redukčního činidla, které pravděpodobně rozpouští biofilm stejně účinně jako sonikace, ale je levnější [262].

Mezinárodní konsenzus 2013 doporučuje sonikovat explantáty pouze v případě suspektních nebo potvrzených IKN s negativní kultivací a při odběru peroperačních vzorků pod ATB clonou. Plošné využití sonikace by bylo příliš nákladné [350].

1.10.5. Histologie

Klasické histologické preparáty se zhotovují z peroperačně získaných vzorků tkání. Výhodou je, že výsledek není ovlivněn předchozím podáním antibiotik. Za pozitivní výsledek považují různí autoři různé nálezy, od 1 do 10 polymorfonukleárních neutrofilů v 1 zorném poli při 400násobném zvětšení. Často zmiňovaná rozdělovací hodnota je 23 PMN na 10 zorných polích [212][242]. Ze skutečnosti, že se

v historii na různých pracovištích rozdílně definoval pozitivní nález, plyne i velký rozptyl údajů o senzitivě a specifitě diagnostických studií. Hodnocení histologických preparátů vyžaduje po patologovi velkou zkušenost a odhodlání. I tak jsou výsledky stejných vzorků interindividuálně velmi variabilní. Navíc se výrazně liší míra buněčné infiltrace různých vzorků tkání ze stejného kloubu [346]. Mezinárodní konsenzus doporučuje jako hranici pro diagnózu infekce kloubní náhrady nález více než 5 neutrofilů v každém zorném poli při 400násobném zvětšení a prohlédnutí 5 zorných polí [241].

Neutrofilly zachycené v povrchovém fibrinu nejsou prediktory infekce, nicméně jejich přítomnost vede k falešně pozitivnímu odečtení preparátu. Pro zamezení vzniku falešně pozitivních výsledků je třeba vzorky na histologii odebírat ostrým nožem, nikoliv kauterem [350]. Falešně negativní histologické výsledky vznikají při infekci *Cutibacterium acnes*, která nemusí vždy vyvolat neutrofilní infiltraci tkání [344].

Kolem implantátu, stejně jako kolem ostatních cizích těles, se může v různé míře vyjádřit nežádoucí odpověď organismu zvaná **reakce kolem cizích těles**. Ta má 4 stádia [9]:

1. poranění tkání zavedením implantátu
2. povlečení implantátu sérovými proteiny a vytvoření dočasné matrix
3. akutní zánět
4. chronický zánět

Mezi implantátem a okolní kostní tkání nacházíme u jednoho pacienta současně zóny osteointegrace i zóny fibrotizace [308] a postupně se zde vytváří i membrána zvaná **SLIM** (synovium-like interface membrane). Zatím není jasné, jestli její původ vychází z reakce kolem cizích těles nebo je její vznik způsoben mikropohybem implantátu či fagocytózou otěrových částic [366]. Membrána bývá přítomna u infekčních i asepticky uvolněných implantátů a v menší míře dokonce i u stabilních endoprotéz [119]. Tato membrána je místem buněčné a enzymatické aktivity a produkce prozánětlivých mediátorů, které způsobují postupnou osteolýzu kolem implantátu [141]. Morawietz navrhl klasifikaci SLIM do čtyř základních typů [211]:

- I. SLIM indukovaná otěrovými částicemi
- II. Infekční typ SLIM
- III. Kombinovaný typ SLIM
- IV. Intermediární typ SLIM

Typ	Název	Charakteristika	Výskyt	Přežití TEP
I.	Indukovaná otěrovými částicemi	otěrové částice, makrofágy a obrovské mnohjaderné buňky zaujímají více než 20 % oblasti	54,3 %	10,1 roku
II.	Infekční typ	granulační tkáň infiltrovaná neutrofilními granulocyty, plasmatickými buňkami; otěrové částice nepřítomny nebo pouze v malém množství	19,7 %	3,2 roku
III.	Kombinovaný typ	znaky typů I a II přítomny současně	5,4 %	4,5 roku
IV.	Intermediární typ	Pojivová tkáň nesplňující kritéria typů I ani II	15,4 %	5,4 roku
		Nelze posoudit	5,1 %	

Tabulka 1.16: Klasifikace periprotetické membrány (SLIM). Převzato z [211]

SLIM je z histologického hlediska nejreprezentativnější tkání ke stanovení diagnózy aseptického nebo infekčního uvolnění endoprotézy. Má senzitivitu 83 %, zatímco vzorky pseudopouzdra pouze 42 %. Specificita obou typů tkání je 98 % [31]. Infekční typ SLIM se vyskytuje stejně často u cementovaných i necementovaných protéz. Typ I. se nachází výrazně častěji u cementovaných TEP než u necementovaných TEP, protože z cementu se oddělují drobné částice, které indukují tvorbu SLIM I. typu. Naopak IV. typ je u cementových TEP vzácnější. IV. typ SLIM je vyvolán mikropohybem implantátu [211].

Mykotické infekce. Diagnostika mykotických infekcí kloubních náhrad je náročnou disciplínou, protože tyto infekce nemají typické projevy ani laboratorní parametry. Často probíhají pod obrazem low-grade infekce, tedy nástup je plíživý a příznaky jsou pouze chronické pobolívání a otok postiženého kloubu. Horečka nebývá přítomna nikdy. Sedimentace erytrocytů a CRP jsou zvýšeny jen lehce a ani cytologická analýza punktátu nemusí překračovat obvyklé fyziologické hranice. Mykotická infekce může koexistovat s low-grade bakteriální infekcí. Cytologické ani biochemické parametry se však neliší od nálezů u samotné bakteriální infekce a kultivace výpotku ani tkání nemusí houby odhalit. Hlavním důkazem přítomnosti hub je potom jejich nález na histologickém preparátu [19].

1.11. Inovativní a experimentální metody

Imunogenetika. Za přítomnosti bakterií v kloubní dutině vylučují tkáně i imunitní buňky do svého okolí markery zánětu, které je možné biochemicky detekovat. V dnešní době lze přesně stanovit míru exprese genů, které za tuto sekreci zodpovídají, jakož i míru exprese genů, které zodpovídají za změnu fenotypu některých buněk. K tomu se používá PCR s reverzní transkriptázou (RT-PCR). Nález zvýšené exprese genu *TLR* je vysoce senzitivní a specifický pro IKN [46].

V praxi se stává, že diagnózu IKN nelze předoperačně potvrdit ani vyloučit, protože předoperačně byla opakovaně suchá punkce a ostatní testy nebyly přesvědčivé. Operatér potom čeká na výsledky peroperačních vyšetření, aby se rozhodl, zda provede jednodobou nebo dvoudobou reimplantaci. Expresse genů ve tkáních se stanovuje rovněž peroperačně ze tkání. Pomocí RT-PCR je možné obdržet genový profil včetně interpretace již do 45 minut od odebrání vzorku.

Pro dosažení nejvyšší možné přesnosti se vývoj zaměřil na stanovení exprese mnoha kandidátních genů a následný výpočet pravděpodobnosti IKN pomocí výpočetní techniky, konkrétně metodou umělé neuronové sítě, která se sama učí, který gen má na pravděpodobnost IKN větší váhu. Trojice genů *DEFA1-IL1B-LTF* má senzitivitu 94,5 % a specifitu 95,7 % [91].

Imunogenetika může také pomoci s odhadem rizika infekce kloubní náhrady u konkrétního pacienta. Vyšší pravděpodobnost budoucí infekce kloubní náhrady mají na příklad pacienti s některými genetickými variantami genu pro interleukin 1 β . Tyto varianty se liší v jednonukleotidovém polymorfismu a je možné je odhalit vyšetřením krevního vzorku [383].

Mikroskopie. Biofilm může nabývat různých rozměrů. Na hladkých površích může tvořit vrstvu viditelnou pouhým okem. Anton van Leeuwenhoek jako první mikroskopoval bakteriální biofilm, když jako vzorek použil svůj vlastní zubní plak. Na měkkých tkáních nebo šicím materiálu je vrstvička biofilmu nepatrná a je třeba použít sofistikovaných metod k jeho průkazu. Rastrovací elektronová mikroskopie, transmisní elektronová mikroskopie, imunofluorescenční mikroskopie a rastrovací konfokální mikroskopie (CLSM) mohou zobrazit uspořádání bakterií v biofilmu na explantovaných komponentách nebo ve vzorcích seškrábnutých z komponent [30].

V běžné klinické praxi se pokročilé mikroskopovací metody rutinně neužívají. Pro výzkumné účely ale poskytují vynikající zobrazení bakterií v biofilmech na explantovaných komponentách i ve tkáních. Rastrovací elektronová mikroskopie zobrazí bakteriální kolonie, ovšem méně často extracelulární matrix, protože ta bývá z velké části odplavena během přípravy preparátu k mikroskopování (Obrázek 1.2). Existují metody přípravy vzorků, které glykokalyx zachovávají [90]. Rastrovací konfokální mikroskopie zobrazí živé bakteriální buňky, jejich prostorové rozložení a celou architekturu biofilmu [175].

Mikrokalorimetrie je založená na detekci tepla uvolněného z množících se mikroorganismů. V praxi se používá ke kontrole bakteriální kontaminace trombocytových koncentrátů jako prevence potransfuzní sepse. Mikrokalorimetrie detekuje bakterie již po několika hodinách, je citlivější než běžná kultivace a zachytí i koncentrace 1 – 10 CFU/ml. Mikrokalorimetrii lze použít i ke stanovení antibiotické rezistence izolovaného kmene [30].

Hmotnostní spektrometrie je rychlá, spolehlivá, jednoduchá a levná metoda identifikace bakterií. Klasická mikrobiologická identifikace zahrnuje kultivaci na různých půdách, morfologii kolonií, mikroskopování a biochemické testy. Kultivace může být falešně negativní v případě SCV, pomalu rostoucích a metabolicky inaktivních kmenů. MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) hmotnostní spektrometrie může identifikovat původce rovnou ze vzorku, bez kultivace. Kombinace hmotnostní spektrometrie a mikrokalorimetrie nám dává možnost původce detekovat a identifikovat již za 3 hodiny od odběru vzorku [30].

Genotypizace původce. Low-grade infekce kloubních náhrad bývají někdy vyvolány nízkě virulentními kmeny bakterií, které se za běžných okolností vyskytují jako komensálové na kůži člověka. V případě kultivačního nálezu takového kmene v jednom ze vzorků výpotku nebo periprotetických tkání váháme, zda se jedná o kontaminaci nebo nález původce onemocnění. Experimentálně je možná genotypizace *S. epidermidis* podle povrchových proteinů (Ses – *Staphylococcus epidermidis* surface proteins), stanovených pulsní elektroforézou, a dalších genů stanovených PCR. Zatímco s běžnými komensály se pojí exprese některých Ses proteinů, s původci IKN jsou spjaty geny kódující tvorbu biofilmu a rezistenci k antibiotikům. Určení genetického profilu izolátu *S. epidermidis* by pomohlo rozhodování v případě jediného pozitivního kultivačního výsledku u předpokládaných aseptických operací, zda se jedná o kontaminaci nebo nález původce skrytého onemocnění [230].

Moderní cytologické metody. Zatím na experimentální úrovni je stanovení infiltrace periprotetických tkání granulocytárními myeloidními supresorovými buňkami. Přítomnost granulocytárních MDSC (G-MDSC) v periprotetických tkáních při IKN je nesporná. Při aseptickém uvolnění však přítomny nejsou. Proto by infiltrace tkání G-MDSC mohla být použita jako marker infekce kloubní náhrady [361]. Pokud by se podařilo omezit příliv MDSC do periprotetické tkáně, mohla by to být nová strategie léčby IKN [127].

1.12. Terapie infekcí kloubních náhrad

Infekce kloubní náhrady je komplexním onemocněním postihujícím kosti i měkké tkáně, vyvolaným často bakteriálními původci, kteří mají k dispozici nejrůznější mechanismy úniku před imunitním systémem i účinky antibiotik. Léčba takového onemocnění musí být tedy zákonitě také komplexní a zahrnuje chirurgické zákroky, antibiotické protokoly a doplňující modalities. Použití jediné léčebné metody bez kombinace s ostatními formami léčby vede k vyléčení zřídka. Infekce kloubní náhrady se nikdy nevyléčí spontánně. Úspěšná léčba vyžaduje mezioborovou spolupráci ortopeda s mikrobiologem, infekčním specialistou, rehabilitačním lékařem, internistou a plastickým chirurgem. Cílem terapeutického úsilí je eliminace infekce a implantát fungující správně a bez bolesti po co nejdelší dobu.

1.12.1. Chirurgické intervence

Málokterá infekce kloubní náhrady se dá označit za standardní situaci. Případy se liší prudkostí nástupu příznaků, vyvolávajícím agens, stavem měkkých tkání a okolních kostí, stabilitou implantátu, věkem, komorbiditami, aktuální kondicí a preferencemi pacienta. Terapeutický postup tedy musí být šitý na míru konkrétnímu pacientovi. Řešení infekce kloubní náhrady patří do rukou zkušených odborníků ve specializovaném centru. Zákroky můžeme rozdělit do šesti hlavních skupin:

- a. Débridement, antibiotika, irigace a retence implantátu (DAIR)
- b. Jednodobá reimplantace
- c. Dvoudobá reimplantace
- d. Explantace a resekční artroplastika
- e. Explantace a déza
- f. Amputace

Débridement, antibiotika, irigace a retence implantátu (DAIR) je v porovnání s následujícími zákroky šetrná a méně invazivní intervence. Komponenty zůstávají fixované do kosti, vyměňují se pouze mobilní součásti implantátu. Odstraňují se zánětlivě změněné tkáně, kloub se dlouho vyplachuje desinfekčními roztoky. Tato procedura je vyhrazena jen pro specifické případy, u kterých předpokládáme, že bakterie ještě nevytvořily zralý biofilm a jsme schopni chirurgicky redukovat bakteriální nálož a tu potom eliminovat antibiotiky. Obliba této metody v posledních letech narůstá. Indikační kritéria jsou následující [231]:

1. Známý původce
2. Původce citlivý k perorálním ATB s dobrou biologickou dostupností v kostech a kloubech
3. Symptomy trvají méně než 3 týdny nebo od implantace uplynulo méně než 30 dní
4. Implantát je stabilní
5. Není vytvořena píštěl

V krajním případě, kdy pacient indikační kritéria nesplňuje, ale kvůli špatné celkové kondici není schopen větší operace, můžeme DAIR provést, ale musíme očekávat recidivu infekce a nutnost doživotní ATB supresní terapie. Pokud je pacient kvůli septickému šoku oběhově nestabilní, užívá antikoagulantia nebo kvůli komorbiditám nezvládne rozsáhlejší urgentní výkon v celkové anestezii, můžeme provést DAIR u TEP kolena artroskopicky. Artroskopický přístup ovšem neumožňuje débridement popliteálního recesu ani výměnu polyetylenové vložky, což vede k vyšší pravděpodobnosti perzistence infekce a znemožňuje sonikační vyšetření [231]. Pokud se artroskopické DAIR kombinuje s antibiotickou supresní terapií, u 40 % pacientů zůstane infekce ve stádiu remise a

nebude třeba provádět další výkon [182]. V indikačních kritériích jsou v různých zemích drobné rozdíly. Ve Francii není píštel kontraindikací k provedení DAIR [184]. Dle rozsáhlých recentních studií je DAIR vhodné i u pacientů, kteří mají akutní pooperační infekci více než 4 týdny po implantaci a úspěšnost zákroku je stejná nezávisle na tom, kdy v prvních 3 měsících po implantaci nastoupily příznaky. Důležité je operovat co nejdříve po nástupu příznaků [370].

Jednodobá reimplantace je termín pro explantaci všech součástí implantátu a zbytků cementu, důkladné débridement devitalizované kosti a napadených tkání a implantaci revizní endoprotézy v jedné operační době. V porovnání s dvoudobou reimplantací u tohoto výkonu pacient profituje z toho, že podstoupí pouze jednu velkou operaci, tudíž ztratí méně krve, podrobí se jen jedné celkové anestézii a bude mít snadnější a úspěšnější rehabilitaci s větším výsledným rozsahem pohyblivosti [261]. Jednodobá reimplantace není u nás zatím příliš častým výkonem, avšak její obliba a počet jejích zastánců v Evropě a v USA v posledních letech roste. Důvodem je především fakt, že při správné indikaci dosahuje eradikační síly dvoudobé reimplantace. Ve Velké Británii zaznamenala rostoucí trend ze 7,9 % v roce 2005 na 18,8 % všech operací IKN v roce 2014 [367]. Vhodná je pro pacienty, kteří mají symptomy déle než 3 týdny a splňují následující indikační kritéria [261]:

1. Známý, nízc virulentní původce
2. Původce citlivý k perorálním ATB s dobrou biologickou dostupností v kostech a kloubech
3. Zdravé a silné měkké tkáně

IDSA k indikačním kritériím ještě doplňuje nález dobře léčitelného původce (streptokoky, meticilin-senzitivní stafylokoky, gramnegativní tyčky jiné než pseudomonády) a požadavek na užití vysokodávkového antibiotického cementu a provedení pouze u TEP kyčle bez kostních defektů a bez použití kostních štěpů [231]. Naopak hamburská ENDO Klinik nebo mezinárodní konsenzus požadují splnění pouze prvních dvou kritérií [186]. Revizní náhrada nemusí být nutně cementovaná. Byly popsány případy úspěšné jednodobé reimplantace s necementovou revizní náhradou [261].

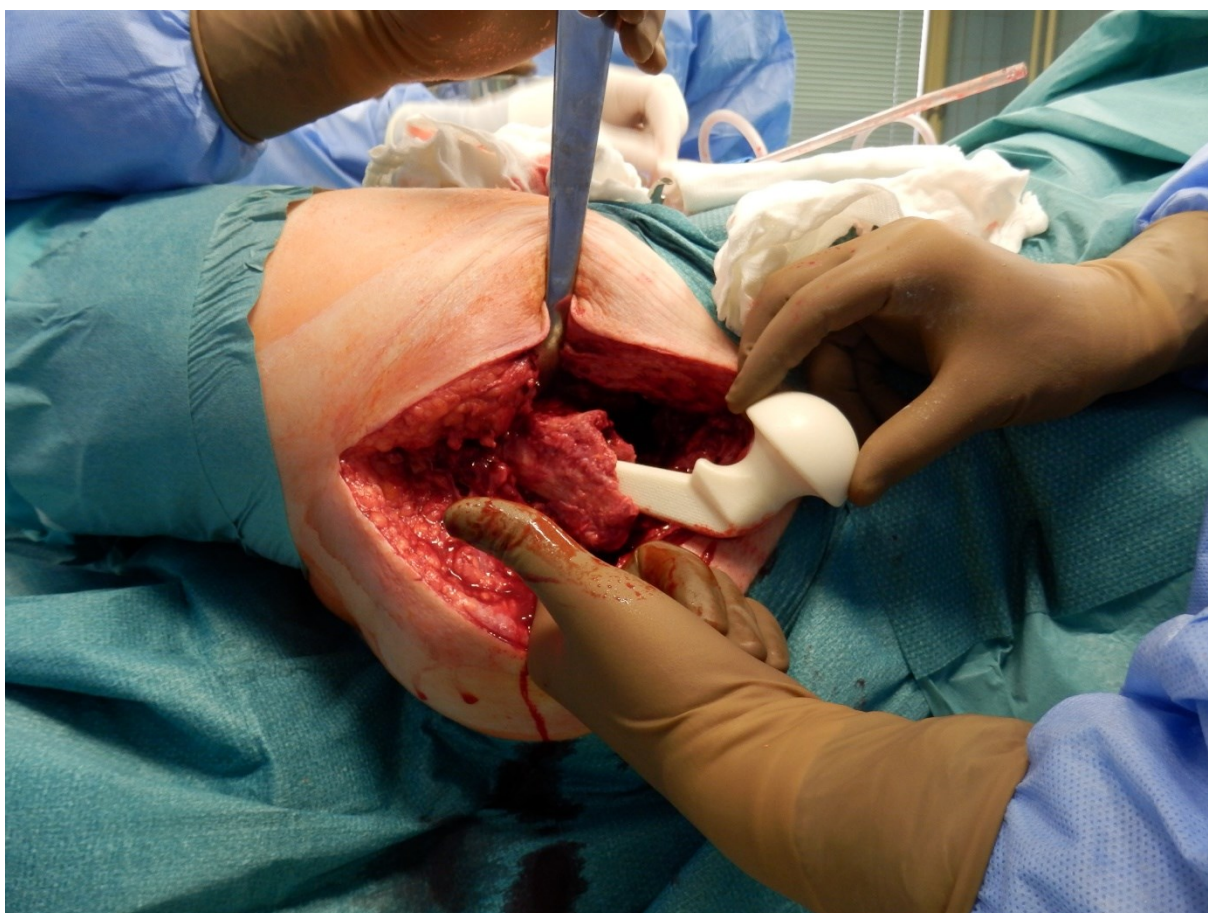
Dvoudobá reimplantace je u nás zlatým standardem v léčbě infekce kloubní náhrady. Během první operace se explantuje infikovaná protéza, provádí se důkladné débridement a implantuje se cementový spacer – nosič antibiotika, který uvolňuje antibiotikum ve vysokých koncentracích do okolních tkání alespoň 6 týdnů. Cementový spacer dále brání vzniku mrtvého prostoru a kontraktuře měkkých tkání. Ve druhé době se extrahuje cementový spacer a do čistého terénu se implantuje revizní endoprotéza [256]. Dvoudobá reimplantace je nejspolehlivější výkon a indikujeme ho u pacientů, jejichž nález je vážnější a nesplňuje indikační kritéria DAIR ani jednodobé reimplantace. Pacienti musí být schopni a ochotni podstoupit více operací. Dvoudobá reimplantace je indikovaná též jako revizní výkon tam, kde selhala předchozí jednodobá reimplantace, dvoudobá reimplantace nebo DAIR [231].

Dvoudobá reimplantace s krátkým intervalem je indikovaná u pacientů se špatným stavem kostí nebo měkkých tkání a bezproblémovým původcem. S ohledem na zvyklosti pracoviště a klinický vývoj se mezi extrakcí a reimplantací nechává interval 2-4 týdny a během této doby se aplikují intravenózní ATB.

Dvoudobá reimplantace s dlouhým intervalem je indikovaná v případě neznámého nebo obtížně léčitelného původce. Mezi obtížné původce řadíme stafylokoky tvořící varianty malých kolonií, enterokoky, pseudomonády a enterobakterie rezistentní k chinolonům, ostatní multirezistentní kmeny a houby. Délka intervalu mezi explantací a reimplantací je minimálně 8 týdnů, z toho poslední 2 týdny nepodáváme ATB, aby bylo při reimplantaci možné relevantně posoudit eradikaci původce [304]. Někteří autoři doporučují cementový spacer raději nepoužít, protože se eluce antibiotika z cementu postupně snižuje a po určité době klesne koncentrace ATB v okolních tkáních pod MIC a indukuje rezistenci eventuálních přežívajících mikroorganismů. To platí hlavně u mykotických IKN, protože eluce amfotericinu B z kostního cementu trvá méně než 7 dní [19]. Komerčně dodávané spacery

s gentamicinem pokrývají 76 % původců obvyklých v našich podmínkách [250]. V rámci dosažení stability končetiny a prevence kontraktur měkkých tkání lze aplikovat ortézy nebo zevní fixatér. V případě přetrvání příznaků infekce i v době plánované reimplantace je možné provést další débridement a reimplantaci odložit (trojdobá reimplantace).

Explantace a resekční artroplastika se provádí u infekcí TEP kyčle nebo ramene, pokud selhala předchozí dvoudobá reimplantace. Primárně, bez předchozích pokusů o zachování nebo reimplantaci protézy indikujeme resekci, pokud vznikly rozsáhlé kostní defekty nebo jsou výrazně kompromitované okolní měkké tkáně, pacient nechce nebo kvůli komorbiditám nemůže podstoupit rozsáhlejší nebo dvoudobý výkon nebo není možná účinná antibiotická terapie [231].



Obrázek 1.8: První doba dvoudobé reimplantace. Po odstranění TEP kyčle a důkladném débridement operatér vkládá komerční preformovaný antibiotický spacer do dřevové dutiny proximálního femuru. Archiv Ortopedické kliniky FNOL a UPOL.

Explantace a dēja je indikována u infikovaných TEP kolen, hlezén, zápěstí a loktů v případě významných kostních ztrát, defektů měkkých tkání nebo recidivy infekce po dvoudobé reimplantaci. Dēja kolena může být provedena technikou zevního fixatéru, která je z hlediska řešení infekce spolehlivá. Pokud jsou ale kostní defekty rozsáhlé, vzniklý pakloub se musí fixovat dlahou nebo distančním cementovaným nitrodřeňovým hřebem, což s sebou nese riziko reinfekce, zvláště u rezistentních bakteriálních kmenů. Distanční dēja je preferovaná proto, že není spojena s tak výrazným zkratem končetiny a ztrátou stability, takže si pacient může zachovat samostatnost [151].

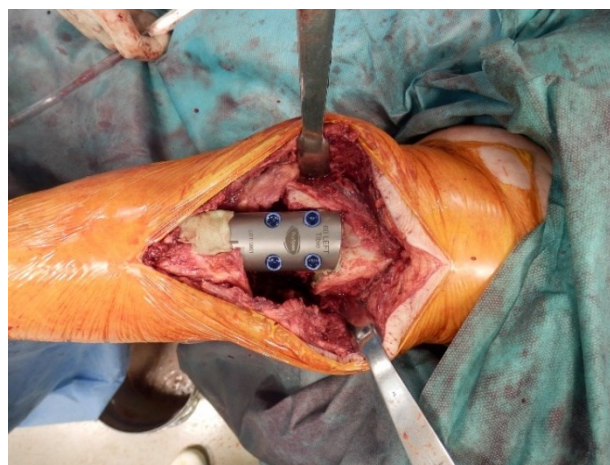
Amputace je poslední záchranný výkon, který indikujeme pouze v případě selhání předchozích resekčních arthroplastik, masivních ztrát kostí a měkkých tkání a ohrožení pacienta sepsí při nekontrolovatelné nekrotizující fasciitidě. Amputace je možná i tehdy, když přinese lepší dlouhodobý funkční výsledek než resekční arthroplastika nebo děza [231].

Volbu operačního postupu a způsob jeho provedení bychom měli vždy dostatečně promyslet, protože se zdá, že počet reoperací je zvláště v případě infekce TEP kolena limitovaný. Pokud na operaci z nějakého důvodu nestačíme, je výhodnější pacienta odeslat do specializovaného centra. Prioritním cílem musí být pacienta nepoškodit.

Existují i případy, kdy pacient onemocní v době, kdy již není operace schopen kvůli pokročilému věku nebo závažným komorbiditám. Pacient může také navrhovanou operaci odmítnout. Tito pacienti potom dostávají **dlouhodobou antibiotickou supresní léčbu** bez naděje na úplné vyléčení infekce.



Obrázek 1.9: Nitrodřeňový hřeb pro distanční dězu kolenního kloubu. Archiv Ortopedické kliniky FNOL a UPOL.



Obrázek 1.10: Distanční děza kolenního kloubu nitrodřeňovým hřebem. Celá konstrukce se posléze zacementuje. Archiv Ortopedické kliniky FNOL a UPOL.

1.12.2. Nechirurgické modalities – antibiotika

Volbu antibiotik při léčbě infekce kloubní náhrady je třeba přizpůsobit faktu, že cílíme na bakterie v biofilmu. Používáme ideálně baktericidní antibiotika. Musíme maximálně využít známé poznatky o chování bakteriálních biofilmů a navrhnout terapii tak, aby se minimalizovala pravděpodobnost perzistence nebo budoucí recidivy infekce. Navzdory všeobecně rostoucí míře bakteriální antibiotické rezistence zatím máme k dispozici celou paletu antibiotik, která jsou účinná proti volným bakteriím v planktonické formě. Mnoho z těchto antibiotik je však neúčinných na biofilmy kvůli špatné propustnosti biofilmů pro antibiotika, vyšší rezistenci nebo toleranci přisedlých forem bakterií k antibiotikům [98].

Mikroorganismus	Švýcarsko		IDSA		ČR	
	Iniciální i.v. za hospitalizace	Pokračování p.o. ambulantně	Iniciální i.v. za hospitalizace 4-6 týdnů	Pokračování p.o. ambulantně	Iniciální i.v. za hospitalizace	Pokračování p.o. ambulantně
Stafylokoky citlivé k oxacilinu	Flukloxacilin (cefazolin, vankomycin) + rifampicin 2 týdny	Ciprofloxacin (levofloxacin) + rifampicin	Nafcilin (cefazolin, ceftriaxon, vankomycin, daptomycin, linezolid) + rifampicin	Ciprofloxacin (levofloxacin, ko-trimoxazol, minocyklin, doxycyklin, cefalexin, dikloxacilin) + rifampicin	Oxacilin (cefazolin, vankomycin) + rifampicin 2 týdny	Ko-trimoxazol (levofloxacin, ciprofloxacin, linezolid) + rifampicin
Stafylokoky rezistentní k oxacilinu	Vankomycin + rifampicin 2 týdny	Ciprofloxacin (levofloxacin, k. fusidová, ko-trimoxazol, minocyklin, teikoplanin i.m./i.v.) + rifampicin	Vankomycin (daptomycin, linezolid) + rifampicin	+ rifampicin	Vankomycin (daptomycin) + rifampicin 2 týdny	Ko-trimoxazol (ciprofloxacin, levofloxacin, linezolid, teikoplanin i.m./i.v.) + rifampicin
Streptokoky (kromě <i>S. agalactiae</i>)	Penicilin G (ceftriaxon) 4 týdny	Amoxicilin	Penicilin G (ceftriaxon, vankomycin)	Dle citlivosti původce a tolerance pacienta	Penicilin G 2-4 týdny (ceftriaxon, vankomycin)	Amoxicilin
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Penicilin G (Amoxicilin)	Amoxicilin	Penicilin G (ampicilin, vankomycin, daptomycin, linezolid) + aminoglykosid		Ampicilin (vankomycin, linezolid, daptomycin) + gentamicin 2-4 týdny	Amoxicilin
Enterokoky citlivé k penicilinu	+ aminoglykosid 2-4 týdny		Vankomycin (daptomycin, linezolid) + aminoglykosid		Vankomycin 2-4 týdny	Linezolid
Enterokoky rezistentní k penicilinu	—	—				
<i>Enterobacter spp.</i>	Rovnou ciprofloxacin p.o.		Cefepim (ertapenem, ciprofloxacin)		Ciprofloxacin i.v. nebo p.o. (cefotaxim, meropenem) 2-4 týdny	Ciprofloxacin (ertapenem nebo jiné dle citlivosti původce a tolerance pacienta)
Ostatní <i>Enterobacteriaceae</i>			β-laktam i.v. nebo rovnou ciprofloxacin p.o.			
Nefermentující gramnegativní tyčky	Ceftazidim (cefepim) + aminoglykosid 2-4 týdny	Ciprofloxacin	Cefepim (meropenem, ciprofloxacin, ceftazidim) + aminoglykosid		ceftazidim 2-4 týdny (piperacilin/tazobaktam, meropenem) + ciprofloxacin nebo ceftazidim + gentamicin	Ciprofloxacin
Anaeroby grampozitivní	Klindamycin (penicilin G, ceftriaxon) 2-4 týdny	Klindamycin	Penicilin G (ceftriaxon, klindamycin, vankomycin)		penicilin G (klindamycin, vankomycin) + rifampicin 2-4 týdny	Klindamycin (amoxicilin) + rifampicin
Anaeroby gramnegativní	Klindamycin (metronidazol) 2-4 týdny	Klindamycin (metronidazol)	—	—	Ampicilin/sulbaktam 2 týdny	Metronidazol (Amoxicilin/klavulanát)

Tabulka 1.17: Doporučené antibiotické protokoly švýcarské skupiny [304], Infectious Diseases Society of America [231] a společné doporučení ČSOT a Společnosti infekčního lékařství ČLS JEP [216]

Rifampicin. Vzhledem k tomu, že až $\frac{3}{4}$ všech infekcí kloubních náhrad způsobují stafylokokové biofilmy, má rifampicin v jejich léčbě výsadní postavení. Rifampicin je původně antituberkulotikum. Dnes jsou jeho hlavní indikací stafylokokové infekce spojené s biofilmem. Rifampicin je úzkospektrý derivát rifamycinu a při vyšších koncentracích působí baktericidně. Mechanismus jeho účinku je inhibice syntézy bakteriálních nukleových kyselin. Rifampicin se vstřebává z trávicí trubice a v kostech a kloubech má výbornou biologickou dostupnost. Biologická dostupnost rifampicinu při perorálním podání nalačno je 90 – 100 %. Běžné dávkování při IKN je 600 – 900 mg denně v jedné nebo dvou dávkách [395]. Rifampicin efektivně prochází vrstvou biofilmu a na povrchu implantátu dosahuje baktericidních koncentrací. Je schopen usmrtit i intracelulárně přežívající zlaté stafylokoky [201].

Nevýhodou rifampicinu je rychlé získání rezistence většiny bakteriálních kmenů. Mechanismus vzniku rezistence proti rifampicinu je nejčastěji mutace v genu *rpoB* pro β -podjednotku bakteriální RNA-polymerázy. Jedná se o záměnu jediného páru bází, která výrazně snižuje afinitu β -podjednotky k rifampicinu a vede k jeho neúčinnosti [16]. Indukci rezistence k rifampicinu se dá zabránit užitím rifampicinu v kombinaci s jiným ATB dobře procházejícím skrz biofilm. Přidání rifampicinu do kombinace s účinným antibiotikem ještě výrazně zvyšuje jeho účinnost [364]. Účinné dvojkombinace jsou rifampicin s daptomycinem, linezolidem nebo levofloxacinem, všechny *in vivo* účinné proti MRSA. Zřejmě nejúčinnější je dvojkombinace daptomycin s rifampicinem. Proti ostatním zmíněným má daptomycin navíc tu výhodu, že nejsilněji brání vzniku rezistence MRSA k rifampicinu. Na druhém místě potom vychází kombinace levofloxacinu a rifampicinu, jak co do účinnosti proti MRSA, tak v prevenci vzniku rezistence k rifampicinu [306]. Výborné kombinace, účinné i proti MRSA, jsou dalbavancin s rifampicinem a fosfomycin s rifampicinem [395]. Vhodná je i kombinace s vankomycinem [79].

Ze syntézy výsledků mnoha studií na rifampicinu plyne zajímavý závěr: Kombinace různých antibiotik s rifampicinem mají perfektní účinnost, pokud jsou splněny tři podmínky: nízká bakteriální nálož, mladý nevyzrálý biofilm a dlouhodobá protražovaná léčba. Poslední podmínku vědomě plníme, ovšem splnění prvních dvou nelze zaručit ani zkontrolovat – pouze se o něj pokusíme, když začneme podávat rifampicin co nejdříve po revizní operaci a vyhneme se rifampicinu u pacientů s píštělí, defekty a poruchou hojení měkkých tkání, protože to jsou známky dlouhodobé infekce. Další známkou dlouhodobé infekce může být uvolnění implantátu [395]. Rifampicin nenasazujeme hned po operaci, ale až po zaschnutí operační rány, což je prevence superinfekce rifampicin-rezistentními kmeny přicházejícími z povrchu kůže do operační rány. Pacienti se symptomy trvajících méně než 1 měsíc se vysoce pravděpodobně na ATB režimu s rifampicinem vyléčí (pravděpodobnost 83,4 %). Ovšem ti, kteří mají symptomy vyjádřené déle než 6 měsíců, mají tuto pravděpodobnost jen 30,8 % [21]. Pokud dodržíme indikační kritéria jednotlivých operací a indikační kritéria léčby rifampicinem, pravděpodobně budou rifampicin dostávat pouze pacienti s jednodobou reimplantací nebo DAIR. Pacientům s dvoudobou reimplantací a dlouhým intervalem skutečně rifampicin nepřináší žádný benefit [26]. Délka léčby rifampicinem po DAIR musí být 3-6 měsíců. Při dodržení těchto základních doporučení po skončení léčby není nutná dlouhodobá ATB supresní terapie [231].

Nežádoucí účinky rifampicinu jsou nechutenství, nevolnost, vomitus, hepatotoxicita, myelotoxicita a exantém. Rifampicin silně indukuje cytochrom P450. Cytochrom P450 odbourává linezolid, ko-trimoxazol a klindamycin, tedy rifampicin způsobuje rychlý pokles jejich hladiny v séru. Proto tato antibiotika do kombinace s rifampicinem nepatří [299].

β -laktamová antibiotika jsou v léčbě infekcí kloubních náhrad nejčastěji užívaná antibiotika. Zabraňují tvorbě buněčné stěny rostoucích bakterií a působí baktericidně. Proti stafylokokům a streptokokům nasazujeme peniciliny, cefalosporiny volíme v léčbě gramnegativních infekcí. Karbapenemy hrají roli záložních antibiotik proti rezistentním kmenům gramnegativních bakterií.

Vankomycin je glykopeptidové antibiotikum, které se nevstřebává z trávicího traktu. V léčbě infekce kloubní náhrady se podává pouze intravenózně. Pomalu ztrácí status záložního antibiotika a

v některých indikacích nebo při alergiích na peniciliny se stává první volbou. Při léčbě infekcí spjatých s biofilmem je vhodné vankomycin kombinovat – samotný vankomycin nemusí být proti bakteriálnímu biofilmu účinný.

Je třeba mít na paměti, že antibiotika jsou v praxi použitelná pouze tehdy, pokud k nim nemá původce vytvořenou toleranci. Tolerance je definovaná jako poměr MBC/MIC větší než 32 nebo jako výrazné prodloužení času potřebného k zahubení 99 % bakterií v kultuře v porovnání s citlivým kmenem se stejnou MIC [34]. Tolerantní původce bude pouze inhibován ve svém růstu a bude dlouho přežívat ve svém biofilmu, aby se po vysazení ATB znovu rozmnožil. Příkladem je prokázaná tolerance *S. lugdunensis* k vankomycinu [98]. Tolerance k antibiotiku se u bakterií vyvíjí v řádu dní [382].

Vankomycin vůbec nepředchází vzniku rezistence stafylokoků proti rifampicinu [154], stejně jako např. tedizolid [235].

Vankomycin má nižší antibakteriální aktivitu proti grampozitivním mikroorganismům než β -laktamy, a proto by se měl nasazovat jen při kontraindikaci β -laktamů, tzn. u pacientů s alergií, intolerancí nebo prokázanou rezistencí původce k β -laktamům. Nevýhodou vankomycinu je ototoxicita, neurotoxicita a nefrotoxicita a nutnost pravidelného měření sérové hladiny. Účinek vankomycinu je závislý na čase. Vankomycin je tedy účinnější, když jeho koncentrace přesahuje MIC po maximum času. Cílem je dosáhnout co nejmenších výkyvů sérové hladiny během dne, proto se doporučuje dávat menší dávky častěji a infuzi nechat kapat co nejdéle nebo nejlépe podat kontinuální infuzi [304].

Fluorochinolony jsou širokospektrá baktericidní chemoterapeutika inhibující replikaci bakteriální DNA. Základní indikací jsou infekce gramnegativními bakteriemi a stafylokokové infekce. Nejsou vhodné k léčbě infekcí způsobených MRSA, protože MRSA rychle získává k fluorochinolonom rezistenci [304]. Nežádoucími účinky fluorochinolonů jsou prodloužení QT intervalu, neuropatie a tendinopatie. Fluorochinolony zvyšují riziko vzniku aneurysmatu nebo disekce aorty. Pokud toto riziko preexistuje, musíme být při volbě antibiotik obezřetní.

Proti gramnegativním tyčinkám rezistentním na fluorochinolony máme k dispozici jen omezený výběr antibiotik. *In vivo* byly testované různé kombinace moderních antimikrobních látek. Proti *E. coli* byla neúčinnější kombinace kolistinu s fosfomycinem a dobré výsledky měly také dvojice kolistin s tigeckylinem a fosfomycin s gentamicinem [50].

Kolistin (polymyxin E) je z chemického hlediska bazický polypeptid. Řadí se mezi polymyxiny. Jeho mechanismus účinku je založen na změně permeability bakteriální plasmatické membrány a usnadnění průniku kolistinu a dalších antibiotik plasmatickou membránou [192]. V klinické praxi se používá k léčbě infekcí gram-negativními multirezistentními kmeny, např. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Klebsiella pneumoniae*. Je účinný hlavně proti metabolicky neaktivním bakteriím vázaným v dolních vrstvách biofilmu, ale proti planktonickým bakteriím a bakteriím v povrchových vrstvách biofilmu již působí výrazně méně. Kolistin by se měl kombinovat s antibiotikem, které je namířené proti planktonickým metabolicky aktivním bakteriím, protože ty snadno získávají rezistenci ke kolistinu a kolistin je nedokáže eliminovat [192]. Kolistin v monoterapii, ač v dostatečně vysokých inhibičních dávkách, rychle vyvolává rezistenci *P. aeruginosa* [191]. Obzvláště při použití monoterapie kolistinem v léčbě infekce kloubní náhrady jsou výsledky špatné [314]. Vzhledem k jeho potenciální toxicitě a snadnému vzniku rezistence se nenasazuje plošně, ale jako záložní antibiotikum do kombinace [50]. Kolistin má výborné výsledky v kombinaci s fosfomycinem [50], doripenemem [191], ciprofloxacinem, tobramycinem [192], gentamicinem nebo tigeckylinem [50]. Kolistin se nevstřebává z trávicího traktu, a proto se u infekcí kloubních náhrad podává intravenózně, eventuálně jako přídatek do antibiotického cementového spaceru.

Moderní antibiotika. V léčbě infekcí kloubních náhrad se do běžných doporučení a ustálených kombinací dostávají nová, dříve záložní antibiotika, která procházejí biofilmem a účinkují i proti přisedlým bakteriím, např. daptomycin, linezolid, minocyklin, dalbavancin nebo chinupristin/dalfopristin. Tigecyklin je dobře tolerován během protražovaných antibiotických protokolů. Je vhodný jako záložní antibiotikum tam, kde se vyčerpala základní antibiotika nebo nebylo možné je podat kvůli intoleranci, alergii nebo rezistenci [174]. Linezolid je záložní syntetické antibiotikum ze skupiny oxazolidinonů účinné proti MRSA nebo vankomycin-rezistentním enterokokům. Nežádoucí účinky linezolidu jsou periferní neuropatie, optická neuritida, laktátová acidóza nebo serotoninový syndrom při současném podání s inhibitory zpětného vychytávání serotoninu nebo inhibitorů monoaminoxidázy.

Monitorování hladin a nežádoucích účinků. Mnohá z běžně používaných antibiotik jsou při protražovaném nasazení toxická. Neodmyslitelnou součástí antibiotické léčby je tedy monitorování hladin vankomycinu, gentamicinu, amikacinu nebo vorikonazolu, pravidelná kontrola jaterních a ledvinných funkcí a cílené vyhledávání nežádoucích účinků, například u linezolidu, fluorochinolonů nebo daptomycinu. I tak běžné antibiotikum jako je amoxicilin s klavulanátem může způsobit hepatitidu, kterou klinik snadno přehlédne, pokud pravidelně neodebírá jaterní enzymy. Nauzea a zvracení jsou totiž při antibiotické terapii běžné a mnoho lékařů na riziko poškození jater nemyslí. Stává se, že pacienti některá antibiotika netolerují, mají na ně alergii nebo se u nich projeví nežádoucí účinek. Potom vznikají situace, kdy neexistuje účinné antibiotikum, které bychom mohli u konkrétního pacienta podat.

Mikroorganismus	ATB první volby	Alternativní ATB
Stafylokoky citlivé k oxacilinu	Cefalexin, cefadroxil	Dikloxacilin Klindamycin amoxicilin/klavulanát
Stafylokoky rezistentní k oxacilinu	Ko-trimoxazol Minocyklin doxycyklin	
β-hemolytické streptokoky	Penicilin V Amoxicilin	Cefalexin
Enterokoky citlivé k penicilinu	Penicilin V Amoxicilin	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ciprofloxacín	
<i>Enterobacteriaceae</i>	Ko-trimoxazol	β-laktam dle citlivosti
<i>Cutibacterium acnes</i>	Penicilin V Amoxicilin	Cefalexin Minocyklin doxycyklin

Tabulka 1.18: Doporučená antibiotika pro dlouhodobou antibiotickou supresní terapii. Doporučení IDSA. Převzato z [231]

Antibiotické protokoly. V terapii infekcí kloubních náhrad už je všeobecně přijato, že antibiotické monoterapie nejsou vhodné, a kombinace antibiotik se staly nepodkročitelným minimem. Výhodou je synergie, širší antibakteriální spektrum a redukce rizika vzniku rezistence [114]. Podle druhu a citlivosti původce a typu operace jsou k dispozici přesně rozepsaná doporučení včetně dávkování a celkové doby léčby. Délka antibiotické terapie infekce kloubní náhrady je stále námětem k diskusi. Obecně platí, že musíme zničit všechny perzistentní bakterie, které by se mohly po vysazení antibiotik rozmnožit, protože imunitní systém pacienta je sám eliminovat nedokáže.

Švýcarská skupina doporučuje celkovou délku antibiotické terapie 3 měsíce, v případě TEP kolena dokonce 6 měsíců, nehledě na to, jestli byla provedena jednodobá reimplantace, dvoudobá reimplantace nebo DAIR. Počáteční fáze intravenózních antibiotik trvá 2-4 týdny [304]. Tyto protokoly byly stanoveny empiricky a nejsou důkazy, že musí být opravdu tak dlouhé, nicméně přijala je IDSA (Infectious Diseases Society of America). Objevují se zprávy, že kratší antibiotické protokoly (3 měsíce u TEP kolen, 2 měsíce u ostatních kloubů) mají stejnou úspěšnost [252].

Naopak v případě IKN způsobených houbami je třeba antibiotické protokoly výrazně prodloužit. Houby jsou houževnaté a odolávají antimykotikům velmi dlouho. Antimykotika se podávají 6 – 12 měsíců. Echinokandiny a amfotericin mají lepší účinnost proti mykotickým biofilmům než azolová antimykotika [19].

Dlouhodobá antibiotická supresní terapie má opodstatnění pouze tam, kde není možné operovat ze závažných interních důvodů, nebo kde pacient odmítá operační řešení [109]. Pro dlouhodobou antibiotickou supresi jsou předepsány jiné protokoly než pro časově omezenou léčbu po operaci, a to kvůli toxicitě některých antibiotik, například linezolidu nebo rifampicinu, která nesmí být užívána dlouhodobě [216]. Pro toxicitu se rifampicin nepředepisuje zbytečně po amputačních a resekčních výkonech.

1.12.3. Nechirurgické modalities – experimentální

Vývoj nových antimikrobních látek. Mnoho nových antimikrobních látek s aktivitou proti biofilmu je nyní v různé fázi výzkumu. Jmenujme na příklad semisyntetický glykopeptid oritavancin, rostlinný alkaloid berberin, sfingosin nebo deriváty sperminu [387][392].

Cílení na quorum-sensing systém. Růst a zrání biofilmu je závislé na systému mezibuněčné signalizace. Intervence na této úrovni by mohla výrazně omezit růst nebo změnit vlastnosti biofilmu. Cílená léčba zaměřená na inhibici quorum-sensing systému je předmětem současného výzkumu a případné nové léky budou vyžadovat hlubokou znalost jeho fungování. Již teď je jasné, že stejná látka zaměřená na stejný bakteriální druh bude v jednom případě léčebná a v jiném případě škodlivá. Na příklad ovlivnění genu *Agr* a jeho efektorů nemusí nutně vést k bezproblémovému vyléčení IKN. K vyvolání infekce kloubní náhrady predisponují mutanty s delecí genu *Agr*, které tvoří silnější biofilmy, zatímco kmeny s jeho zvýšenou produkcí se vyskytují v planktonické formě a způsobují akutní infekce kůže, plic a osteomyelitidy [61].

Cílení na intracelulární bakterie jako prevence recidivy infekce. Předmětem současného výzkumu je vytvoření proformy antibiotika, která by byla navázána na protilátky proti složkám buněčné stěny bakterií (AAC – antibody-antibiotic conjugate). V případě perzistence takto „označené“ bakterie uvnitř fagolysosomu neutrofilu by se z AAC odštěpila aktivní forma antibiotika (pravděpodobně ze skupiny rifamycinu) a zahubila ji. Na myším modelu byla prokázána úplná eradikace intracelulárního *S. aureus* s použitím AAC v kombinaci s vankomycinem [177].

Bakteriofágy jsou viry napadající výhradně bakterie. Bakteriofágy nepoškozují eukaryotické buňky [215]. Rychle se replikují uvnitř bakteriální buňky a využívají její proteosyntetický aparát ke tvorbě endolysinů. Tyto enzymy štěpí bakteriální buněčnou stěnu, čímž usmrtí hostitelskou bakteriální buňku a uvolní záplavy virových částic do okolí. Endolysiny dále štěpí i polysacharidové složky extracelulární matrix, takže destrukují i biofilm [339].

Bakteriofágy byly objeveny počátkem 20. století, ale s rozvojem antibiotik byl jejich další výzkum odsunut ze středu zájmu [333]. Rozvoj fágové terapie pokračoval ve východní Evropě, hlavně v Polsku a v Sovětském svazu. V Polsku a Rusku se již dlouhá léta fágová terapie běžně nasazuje v léčbě

bakteriální endokarditidy, periodontitidy, gastrointestinálních, respiračních, močových infekcí a infekcí pohybového aparátu [215]. Mimo lékařské účely se bakteriofágy používají i v zemědělství, vodárenství a veterinárním lékařství [47].

Zatím je nejvíce prozkoumán účinek bakteriofágů na MRSA a *Pseudomonas aeruginosa*. Na těchto bakteriích bylo *in vivo* prokázáno, že použití bakteriofágů má synergický efekt s antibiotiky [339]. Aplikace bakteriofágů na tvořící se biofilm redukuje jeho růst o 98 % [215].

Výhodou fágové terapie je všeobecné rozšíření bakteriofágů v prostředí a relativně nízká cena jejich izolace a purifikace, a dále účinnost bakteriofágů proti biofilmu. Fágy neútočí na lidské buňky ani na bakterie běžné střevní flóry. Fágová terapie je bezpečná i u pacientů s imunodeficitem [47].

Nevýhodou je úzké spektrum zaměřené pouze na určité sérotypy konkrétních bakteriálních druhů, což s sebou nese i nutnost aplikovat koktejl tří nebo více kmenů bakteriofágů a potřebu stále přizpůsobovat genotyp bakteriofága genotypu izolovaného původce [323], což adekvátně prodražuje léčbu [172]. Dále hrozí vznik imunitní reakce člověka proti bakteriofágovi, která by úplně eliminovala účinek léčby. Pro minimalizaci rozvoje imunitní odpovědi člověka proti bakteriofágům se fágová terapie dává intenzivně během krátké doby [323]. V neposlední řadě hrozí i kontaminace bakteriofágového koktejlu endotoxinem při chybné přípravě koktejlu nebo přenos genů kódujících faktory bakteriální virulence společně s fágovou DNA [75].

Fyzikální metody. Princip elektrolytického odstranění biofilmu se vysvětluje tak, že vodíkové kationty putují ke katodě, kterou je sám implantát – přitom bez problémů prostupují biofilmem. Na povrchu implantátu potom přijímají elektrony za vzniku molekul H₂, které tvoří bublinky. Tyto bublinky potom odstraňují biofilm z povrchu implantátu. Elektrický proud *in vitro* úplně sterilizuje kovové implantáty [378] a *in vivo* redukuje bakteriální nálož až o 98 %, a to bez histologicky detekovatelných změn v okolních tkáních [81]. Klinické studie na pacientech zatím nebyly provedeny.

Vysokofrekvenční magnetické pole *in vitro* redukuje počet viabilních bakterií adheovaných v biofilmu na kovový povrch o 5 řádů, navíc zvyšuje senzitivitu *Pseudomonas aeruginosa* k ciprofloxacinu. Autoři vysvětlují tento jev jako termální destrukci biofilmu, kde teplo na povrchu implantátu vzniká při indukci elektrického proudu ve vodiči (tedy v implantátu) v proměnlivém magnetickém poli. *In vivo* potom stanovili rozsah termálního poškození okolních tkání, který byl pouze do hloubky 2 mm. Tato metoda by teoreticky mohla odstraňovat biofilm z kovových povrchů bezkontaktně, bez chirurgické intervence [357].

Fotodynamická terapie může usmrtit bakterie způsobující infekce kloubní náhrady. Principem je ozáření napadených tkání a povrchu implantátu laserem za pomoci methylenové modři jako fotosenzitizéru. Tato metoda byla *in vitro* účinná proti MSSA, MRSA, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Acinetobacter baumannii*, a to v planktonické formě i v biofilmu. Fotodynamická terapie je bezpečná a rychlá a teoreticky bude možné ji užít při DAIR, jednodobé i dvoudobé reimplantaci. Zatím čekáme na výsledky pokusů *in vivo*.

1.13. Prognóza

Přes veškeré pokroky v diagnostice i terapii infekce kloubní náhrady toto onemocnění stále zůstává závažnou hrozbou s nezanedbatelnou mírou reinfekce a trvalých následků. Počet pacientů, kterým jsme nuceni nabídnout záchranný mutilující výkon, je stále vysoký a malé procento infekcí kloubních náhrad končí i úmrtím pacienta.

1.13.1. Pravděpodobnost vyléčení

Pravděpodobnost vyléčení infekce ovlivňuje původce, pacient a kvalita a včasnost poskytnuté péče. Různá pracoviště prezentují své výsledky, které se mohou v porovnání s ostatními diametrálně lišit. K dispozici jsou i metaanalýzy a systematické přehledy. Ovšem výsledky jednotlivých souborů často nejsou souměřitelné kvůli různým indikačním kritériím k jednotlivým operacím a kvůli různým rekonstrukčním strategiím. Práce se rozcházejí i v definici toho, co je selhání terapie, a v délce pooperačního sledování souboru pacientů. Zdánlivě srovnatelné soubory pacientů, kteří podstoupili stejnou operaci, jsou po detailním náhledu velmi různorodé.

DAIR je přes zlepšování operačního postupu stále intervencí s hůře předvídatelnou úspěšností. Účinnost DAIR při správné indikaci a za použití rifampicinu je dle různých studií 80 – 95 %, tedy srovnatelná s dvoudobou reimplantací. Bez použití rifampicinu ovšem pouze 14 – 68 % [395]. Při nedodržení indikačních kritérií může DAIR vyústit ve fatální výsledek pro pacienta [297]. Jedna z největších metaanalýz udává celkovou úspěšnost DAIR 55 % [190].

Na úspěšnost DAIR u stafylokokových infekcí má největší vliv použití rifampicinu, dále dostatečně dlouhý ATB protokol a nekuřáctví. Lepší výsledky jsou u akutních pooperačních než u hematogenních infekcí. Některé recentní studie poukazují na fakt, že pokud od začátku příznaků do DAIR uplyne více než 3 týdny, pravděpodobnost selhání DAIR není vyšší v porovnání s časnější intervencí, ovšem pacient musí dobře tolerovat rifampicin [184]. Naopak Zimmerli tvrdí, že čím dříve se provede DAIR, tím větší je pravděpodobnost úspěšného vyléčení [395].

Recidiva infekce po DAIR přichází nejčastěji 3-4 měsíce po vysazení ATB. Prodloužení ATB protokolu nad 6 měsíců nesníží pravděpodobnost recidivy, pouze případnou recidivu oddálí. Zkrácení ATB protokolu pod 3 měsíce zvyšuje pravděpodobnost recidivy [40].

Úspěšnost DAIR u infekcí *Pseudomonas aeruginosa* je po dvou letech 26 %. Do 3 let nastane reinfekce u všech pacientů s infekcí *Pseudomonas aeruginosa*, kterým bylo provedeno DAIR [268]. Podobně u mykotických infekcí je selhání DAIR 100 % [19].

Jednodobá reimplantace. Pozice jednodobé reimplantace v posledních letech výrazně posiluje. Recentní metaanalýzy a systematické přehledy dokládají, že jednodobá reimplantace má za předpokladu správné indikace srovnatelnou úspěšnost jako dvoudobá reimplantace [261][183], ovšem s nespornými výhodami, kterými jsou nižší operační zátěž, kratší hospitalizace, snadnější rehabilitace a lepší funkční výsledek. V Evropě je v posledních letech snaha rozšířit indikace jednodobé reimplantace a provádět ji častěji. V USA zůstávají zdrženliví, možná kvůli výrazně častějšímu výskytu rezistentních bakteriálních kmenů.

Úspěšnost jednodobé reimplantace se na velkých souborech udává 80 – 90 % [231]. Různé zdroje dokládají pravděpodobnost reinfekce po jednodobé reimplantaci 0 – 25 % u TEP kolen, a 0 – 65 % u TEP kyčlí, což jasně poukazuje na nesourodost souborů pacientů [261].

Je rozdíl mezi jednodobou reimplantací při předem známé infekci kloubní náhrady a jednodobou reimplantací selhané kloubní náhrady, považované původně za aseptickou. Pokud operatér zná původce předem, nasazuje rovnou cílená antibiotika, a při vědomí, že se jedná o infekci,

pravděpodobně provede i důkladnější débridement. Úspěšnost předpokládané aseptické jednodobé reimplantace s pozitivní peroperační kultivací se udává 80 – 100 %. Někteří autoři potom doporučují dlouhodobou antibiotickou supresní léčbu [231].

Dvoudobá reimplantace byla dlouho považována za zlatý standard terapie infekcí kloubních náhrad. Úspěšnost dvoudobé reimplantace je v literatuře uváděna mezi 72 – 100 % [3]. Po dvoudobé reimplantaci se udává incidence perzistence nebo reinfekce 2,2 – 36,8 % [196]. Kolena mají v průměru horší výsledky (11,0 %) v porovnání s kyčlemi (7,4 %) [109]. V případě reinfekce je jedna z doporučovaných možností zopakování dvoudobé reimplantace. Tentokrát má ovšem výrazně menší šanci na úspěch. Opakovaná dvoudobá reimplantace má dvouleté přežití bez reinfekce 74 % a pětileté přežití bez reinfekce 45 %. Pravděpodobnost, že se další reinfekce bude muset řešit operačně, je 42 %. Pravděpodobnost další reinfekce nezávisí na stupni komorbidit pacienta McPhersonovy klasifikace [36].

Dvoudobá reimplantace se indikuje i po selhání jednodobé reimplantace, opět s menší pravděpodobností vyléčení [231]. Mnozí se dlouhá léta zdráhali indikovat DAIR v obavě, že případné neúspěšné DAIR snižuje pravděpodobnost úspěchu následné dvoudobé reimplantace. Nyní jsou důkazy, že předchozí neúspěšné DAIR nemá neblahý vliv na vyléčení následnou dvoudobou reimplantací [163].

Explantace. Pravděpodobnost eradikace infekce po explantaci a resekční artroplastice nebo deze se uvádí v různých pramenech 60 – 100 %. Úspěšnost je horší než u dvoudobé reimplantace, a to proto, že k tomuto výkonu dospívají rizikovější pacienti s velkými kostními nebo měkkotkáňovými defekty po selhání předchozích operací [231].

Výhled do budoucna. Individuální prognóza jednotlivých případů se pravděpodobně v nejbližších letechlepší díky implementaci výpočetní techniky do každodenní praxe. Kompletní elektronické vedení dat bude velkým pomocníkem při dodržování dlouhodobých antibiotických protokolů. Dnes je compliance mnoha pacientů přinejmenším sporná. Většina z nich nezná názvy svých léků a nevybavuje si, kdy bylo které antibiotikum nasazeno nebo vysazeno. Prognózu pacienta dálelepší i časně a správně stanovení diagnózy. Dnes používáme dichotomické rozdělení výsledků diagnostických testů na pozitivní a negativní s vědomím, že žádný test není 100% přesný. Hledáme optimální syntézu mezi výsledky v podobě diagnostických kritérií. V blízké budoucnosti budeme využívat umělé neuronové sítě, které budou schopny strojového učení a samy budou zpřesňovat diagnostiku [91]. Vstupy do umělých neuronových sítí budou nabývat hodnot v oboru reálných čísel, počet vložených výsledků nejrůznějších vyšetření nebude omezen a výstupem bude pravděpodobnost hledané diagnózy v rozmezí 0 % až 100 %.

1.13.2. Nezávislé prognostické faktory

Na pravděpodobnost vyléčení má vliv celá řada nezávislých prognostických faktorů. Nezávislými prediktory reinfekce jsou například vyšší Charlson comorbidity index a předchozí infekce kloubní náhrady na stejném kloubu. Vyšší pravděpodobnost reinfekce má TEP kolena v porovnání s TEP kyčle [3].

Velkou roli hraje pozitivní peroperační kultivace při druhé době dvoudobé reimplantace. Pravděpodobnost infekčního selhání po dvoudobé reimplantaci je 14,7 %, pokud jsou všechny vzorky tkání odebrané při reimplantaci kultivačně negativní, ovšem v případě pozitivní peroperační kultivace při reimplantaci roste pravděpodobnost selhání na 29,6 %. Zvláštní je, že se při extrakci, při reimplantaci a při reinfekci obvykle izolují tři různé původci [3].

Infekce způsobená gramnegativními bakteriemi je tradičně považovaná za obtížněji léčitelnou. Úspěšnost dvoudobé reimplantace v léčbě IKN způsobené gramnegativními kmeny je 52 %, což je významně horší výsledek v porovnání s léčbou infekcí grampozitivními kmeny (69 %). U meticilin-rezistentních grampozitivních původců je úspěšnost stejně špatná jako u gramnegativních původců (51 %) [348]. Mezi gramnegativními bakteriemi jsou obzvláště časté recidivy *Pseudomonas aeruginosa*. Dvouleté přežití bez recidivy nezávisle na typu operace je 69 %, pětileté přežití 50 % [268]. *Pseudomonas aeruginosa* je schopna přežívat v protetickém kloubu řadu let bez toho, aby vyvolala zánětlivou reakci. Jsou popsány případy recidivy po šesti letech od operačního řešení IKN, které bylo dávno mylně považováno za úspěšné. Přitom u *Pseudomonas aeruginosa* zatím nebylo prokázáno intracelulární přežívání ani tvorba SCV [108].

Naopak tolik obávaná rezistence stafylokoka k meticilinu (u nás oxacilinu) negativním prognostickým faktorem není. Z hlediska rizika recidivy infekce není prognostický rozdíl mezi infekcí MSSA a MRSA. Pokud dojde k recidivě infekce MRSA, obvykle se to stane ještě za průběhu pooperačního antibiotického protokolu. MSSA způsobí recidivu infekce až po vysazení ATB [109].

Velmi nepříznivým prognostickým faktorem je mykotická infekce. Zralý biofilm *Candidy* je téměř úplně rezistentní na jakoukoliv léčbu antimykotiky, a proto je jedinou možností léčby mykózy extrakce implantátu [165]. DAIR skončí v případě mykózy vždy reinfekcí a je doložený jen jediný případ úspěšné jednodobé reimplantace. Doporučený postup je tedy dvoudobá reimplantace s dlouhým intervalem a v případě jejího selhání resekční artroplastika nebo déza [19].

Tloušťku biofilmu v klinické praxi neměříme, nicméně s využitím elektronové mikroskopie je to možné. Větší tloušťka biofilmu *S. epidermidis* koreluje s horšími výsledky léčby IKN [213].

VLASTNÍ PRÁCE

Cíle disertační práce

- Experiment na zvířeti
 - Validace modelu osteomyelitidy
 - Určení antibakteriálních vlastností nově vyvinutých antibakteriálních látek – lipofosfonoxinů 3. generace
- Klinické studie
 - Stanovení diagnostických vlastností cytologických parametrů kloubního punktátu
 - Stanovení diagnostických vlastností sérového interleukinu 6
 - Stanovení diagnostických vlastností biochemických parametrů kloubního punktátu

2. Část experimentální

Autor disertační práce se v průběhu studia podílel na grantovém projektu s názvem „Použití lipofosfonoxinů k prevenci a léčbě muskuloskeletálních infekcí: potenciální role nových antibakteriálních látek,“ který financovalo Ministerstvo zdravotnictví ČR. Projekt je v Centrální evidenci projektů registrován pod kódem NV17-29680A. Projekt pokusů stejného názvu byl schválen MŠMT dne 2.5.2017 pod č.j. 11120/2017-3. Cílem experimentu je prokázat antibakteriální účinnost nově vyvíjených látek nejprve *in vitro* a ve druhé fázi též *in vivo*. Autor disertační práce se podílel na průkazu účinnosti testovaných látek *in vitro*, na vývoji modelu bakteriální osteomyelitidy na zvířeti a na následném průkazu účinnosti testovaných látek *in vivo*.

2.1. Validace modelu infekce kloubní náhrady na zvířeti

Prokázaná antibakteriální aktivita jakékoliv testované látky *in vitro* ještě není zárukou její účinnosti *in vivo*. To platí hlavně ve výzkumu nových antibakteriálních látek k léčbě infekce kloubní náhrady, protože bakterie tvořící biofilm mají k dispozici celou řadu obranných mechanismů, které planktonickým formám scházejí. Cílem pilotní studie na zvířeti bylo vytvořit model neletální lokalizované osteomyelitidy bez systémových příznaků, který lze v budoucnu využít pro průkaz antibakteriální a terapeutické účinnosti testovaných látek. Dílčími cíli bylo nastavit správnou bakteriální nálož, vypěstovat šetrnou operační techniku, vyřešit technické detaily a načasování přípravy zvířat a pooperační péče a nastavit dávkování analgetik.

2.1.1. Materiál a metody

Laboratorní zvířata. K pokusům byli použiti samečci bílých novozélandských králíků stáří alespoň 8 týdnů o tělesné hmotnosti 2500 – 2700 g v kvalitě SPF. Zvířata byla odchována v Charles River Laboratories ve Francii a dodána firmou Velaz, s. r. o. (Praha, ČR). Každé zvíře bylo ustájeno samostatně v kleci s vlastním krmivem a vlastní miskou s vodou v tiché místnosti s přístupem denního světla a normálním střídáním dne a noci. V místnosti byla udržována teplota 21 °C a relativní vlhkost 50 %. Každé zvíře vidělo na ostatní zvířata. V jedné místnosti bylo umístěno najednou maximálně 12 králíků a nebyla zde laboratorní zvířata jiného živočišného druhu. Zvířata byla krmena krmnou směsí Maintenance diet for rabbits (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Německo). Před začátkem experimentu byla dodržena 21denní karanténa.

Bakteriální kmen. Pro všechna zvířata jsme použili stejný bakteriální kmen *Staphylococcus aureus* 5217/A/2019, který byl izolován na Ústavu mikrobiologie FNOL ze vzorku odebraného z infikovaného protetického kloubu na Ortopedické klinice FNOL. Použitý bakteriální kmen tvoří biofilm.

Určení správné bakteriální nálože. V dostupné literatuře se jako infekční dávka pro vyvolání osteomyelitidy nebo infekční artritidy uvádí 10^2 až 10^9 CFU *Staphylococcus aureus*. Dávka nutná pro vyvolání infekce kosti kmenem 5217/A/2019 nebyla předem známá a musela se ověřit. První tři králíci dostali postupně infekční dávky 10^5 , 10^6 a 10^7 CFU. Infekční dávka byla koncentrována do objemu 100 μ l, který se vejde do tibiální dřeňové dutiny. Koncentrace bakteriálních suspenzí tedy byla postupně 10^6 , 10^7 a 10^8 CFU/ml. Jako správná infekční dávka byla označena ta, která způsobila zvířeti osteomyelitidu tibie a infekční gonitidu, ale nevyvolala systémové příznaky sepse. Zvíře se správnou infekční dávkou muselo mít viditelně hnisavě zánětlivě změněné tkáně na peroperačním nálezu 21 dní

po inokulaci, pozitivní histologii a kultivaci tkání odebraných z kolena a z tibie a zároveň negativní hemokultury. V druhé fázi byla verifikována nalezená správná infekční dávka na dalších dvou zvířatech.

Implantát. Zvířatům byl zaveden jednoduchý implantát, který simuluje povrch kloubní náhrady a je podkladem pro tvorbu bakteriálního biofilmu. Implantát byl vytvořen z kostního cementu Biomet Bone Cement R (Zimmer Biomet, Warsaw, Indiana, USA) vytvarovaného do válečku délky 15 mm a průměru 4,2 mm. Cement byl armován Kirschnerovým drátem z chirurgické oceli, který na okrajích dosahoval až k povrchu cementu.

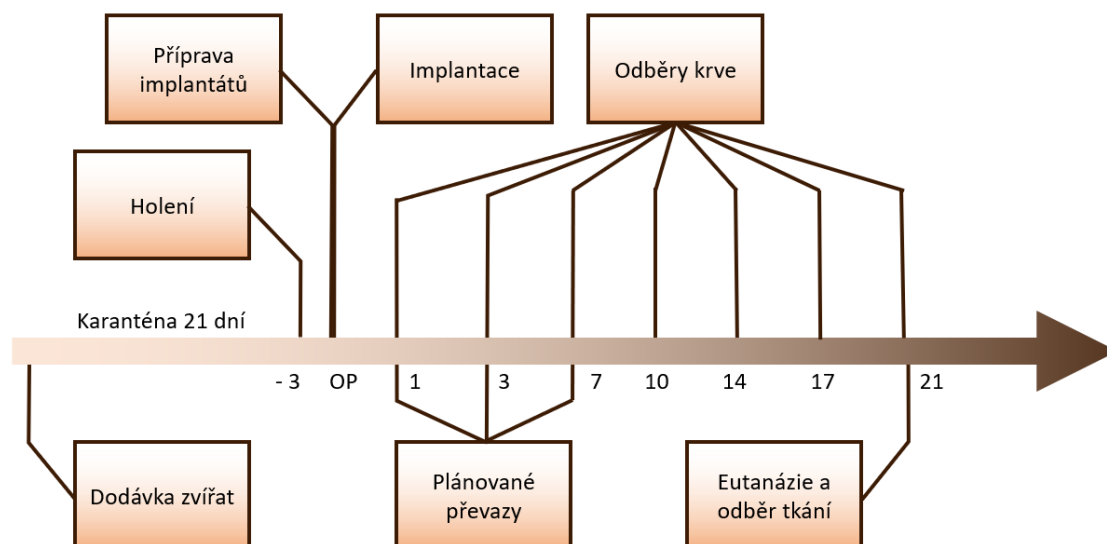


Schéma 2.1: Časový průběh experimentu. Na časové ose jsou vyznačeny pooperační dny

Operační postup. Před operací byla každému zvířeti vyholena pravá pánevní končetina v rozsahu od kyčle po hlezno a dále okrasek kůže mezi lopatkami pro aplikaci analgetické náplasti. Zvířata byla premedikována podkožní injekcí atropinu (Atropin Biotika 0,5 mg inj.) v dávce 0,05 mg / 1 kg tělesné hmotnosti. Již před operací byla aplikována náplast s fentanylem (Fentalis transdermální náplast 25 µg/hod., Sandoz, s.r.o.). Úvod do anestezie proběhl v plynové komoře s koncentrací izofluranu postupně rostoucí od 1 % do 3 – 5 % dle reaktivity zvířete. Anestezie izofluranem byla potom udržovaná na masce.

Před zahájením operace byla operovaná končetina třikrát natřena alkoholovým roztokem povidon-jódu (Braunoderm, B. Braun, Melsungen, Hessen, Německo) a sterilně zarouškována s cílem maximálně imitovat skutečné podmínky při implantaci kloubní náhrady na ortopedickém sále. Kožní řez byl veden podélně nad *ligamentum patellae* v rozsahu od *tuberositas tibiae* po *apex patellae*. Přístup do kolenního kloubu byl veden podélným rozpolcením *ligamentum patellae*. Do tibiálního plateau byl vyvrtán otvor. Po vysušení dřeňové dutiny tibie byla dovnitř inokulována bakteriální suspenze a zaveden implantát. Otvor byl ihned uzavřen kostním voskem. *Ligamentum patellae* bylo šito vstřebatelným vláknem jednoduchým pokračovacím stehem (Safil 4/0, B. Braun, Melsungen, Hessen, Německo) a kůže nevstřebatelným vláknem (Dafilon 4/0, B. Braun, Melsungen, Hessen, Německo) pokračovacím podvlékaným Donatiho stehem. Rána se ošetřila masťou s povidon-jódem (Betadine mast 100 mg / 1 g, Egis Pharmaceuticals PLC, Budapešť, Maďarsko) a sterilně zakryla.



Obrázek 2.1: Implantace cementového válečku do dřeňové dutiny pravé tibie. Ligamentum patellae je podélně rozpolcené a vrták směřuje do dřeňové dutiny přes tibiální plateau. Fotografoval PharmDr. Martin Poruba, Ph.D.

Pooperační péče. Převazy byly plánovány na první, třetí a sedmý pooperační den. Extrakce stehů proběhla sedmý pooperační den. Pokud si zvíře strhávalo nebo posouvalo obvaz, bylo nutné převazovat až dvakrát denně. Každý den byla zaznamenávána tělesná hmotnost, tělesná teplota, přítomnost moči a trusu, spotřeba krmiva a vody, celkový tělesný stav, aktivita, lokální status a algické projevy. Dle závažnosti bolesti se v pooperačním období aplikovala tři analgetika: fentanyl (Fentalis transdermální náplast 25 µg/hod., Sandoz, s.r.o.), carprofenum (Rimadyl 50 mg/ml injekční roztok, Zoetis, Belgie) a ketoprofen (Ketonal 100 mg inj. sol. 5x2 ml, Sandoz, s.r.o.).

Odběry vzorků. Odběr krve na hemokulturu, krevní obraz a CRP z *vena auricularis rostralis* byl naplánován na 1., 3., 7., 10., 14., 17. a 21. pooperační den. 21. pooperační den byla krátce po posledním odběru krve provedena eutanázie intravenózní injekcí pentobarbitalu (Exagon 400 mg/ml, Richter Pharma AG, Rakousko) dle doporučeného dávkování 1 ml na 1 kg tělesné hmotnosti. Po eutanázii zvířete byla pravá pánevní končetina zbavena kůže, třikrát natřena alkoholovým roztokem povidonjodu (Braunoderm, B. Braun, Melsungen, Hessen, Německo) a sterilně zarouškována, aby se zabránilo kontaminaci vzorků určených pro bakteriální kultivaci. V případě fluktuace kloubního pouzdra byl odebrán kloubní výpotek sterilní jehlou a stříkačkou. Chirurgický přístup do kolenního kloubu byl veden mediálně parapatelárně s everzí pately. Byl zdokumentován pooperační nález. Následně bylo odebráno 5 vzorků na kultivaci (stěr z kolenního kloubu nebo kloubní výpotek, Hoffovo těleso, stěr z tibiálního plateau, zánětlivá tkáň z dřeňové dutiny tibie a implantát) a 4 vzorky k histologické analýze

(synoviální tkáň z laterálního recesu kolenního kloubu, Hoffovo těleso, celé tibiální plateau a proximální polovina tibiální diafýzy).

Bakteriální kultivace. 0,5 ml odebrané plné krve bylo inokulováno do hemokultivační lahvičky (PEDS PLUS/F, Becton Dickinson), inkubováno v analyzátoru Bactec 9050 (Becton Dickinson) při teplotě 35 °C v atmosféře s 5 % CO₂ po dobu 5 dní. Při hlášení positivity byla provedena mikroskopie dle Grama a kultivace na plotnách s krevním agarem, MacConkey agarem a BHI krevním agarem pro anaerobní kultivaci. Anaerobní kultivace proběhla v atmosféře 80 % N₂, 10 % H₂, 10 % CO₂ (LAS, Trios). Výsledky kultivace byly odečítány po 24 a 48 hodinách. Původce byl identifikován hmotnostní spektrometrií (MALDI-TOF).

Vzorky tkání a stěry byly obarveny dle Grama a pozorovány světelným mikroskopem. Implantáty mikroskopovány nebyly. Všechny vzorky byly inokulovány na krevní agar, MacConkey agar, BHI krevní agar pro anaerobní kultivaci a do játrového bujónu pro pomnožení (Trios). Implantáty byly před zpracováním sonikovány pro uvolnění případného biofilmu (Sonorex Bandelin RK 156). Inkubace probíhala při 35 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Játrový bujón byl po 24hodinové inkubaci vyočkován na krevní agar a MacConkey agar. Po 24 hodinách inkubace se vzorky odečítaly. Anaerobní kultivace proběhla v atmosféře 80 % N₂, 10 % H₂, 10 % CO₂ (LAS, Trios) a výsledky se odečítaly po 24 a 48 hodinách. Původce byl identifikován metodou hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF, Bruker).

Histologická analýza. Vzorky Hoffova tělesa, synoviální tkáň laterálního recesu, tibiálního plateau a tibiální diafýzy k histologické analýze naložené v 10% roztoku formaldehydu byly doručeny do laboratoře bezprostředně po odběru. Všechny kostní fragmenty byly odvápněny v roztoku Microdecast (DiaPath, Martinengo, Itálie) po dobu dvou až tří týdnů dle velikosti vzorků. Všechny vzorky byly zpracovány standardně do parafínových bloků, nakrájeny na 4µm řezy a obarveny hematoxylinem a eosinem. Tkáň z dřevnaté dutiny tibie z bezprostřední blízkosti implantátu byla klasifikovaná podle Morawietze [211] a přítomnost a typ osteomyelitidy byly stanoveny podle klasifikačního schématu Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score – HOES [388]. Ve vzorcích byly semikvantitativně (0, +, ++, +++) stanoveny příznaky akutní nebo chronické osteomyelitidy a dle součtu celkového score byl stanoven typ osteomyelitidy (Tabulka 2.1.)

Příznaky akutní osteomyelitidy	A1 Osteonekróza
	A2 Nekróza měkké tkáň
	A3 Granulocytární infiltrát
Příznaky chronické osteomyelitidy	C1 Kostní neogeneze / fibróza
	C2 Lymfocytární / makrofágový infiltrát
Hodnocení	
Součet score ≥ 4 za příznaky A	Akutní osteomyelitida
Součet score ≥ 6 za příznaky A a C	Chronická osteomyelitida exacerbovaná
Součet score ≥ 4 za příznaky C	Chronická osteomyelitida
Součet score 2 – 4 za příznaky C	Chronická osteomyelitida v remisi
Součet score ≤ 1 za příznaky C	Osteomyelitida nepřítomna

Tabulka 2.1: Histologické hodnocení osteomyelitidy HOES [388]

Krevní obraz. 1 ml krve byl odebrán do zkumavky s K₃EDTA (kyselinou ethylendiamintetraoctovou – prevence aglutinace). Odečet byl proveden na automatickém analyzátoru MEK 6550 J/K (Nihon Kohden, Tokyo, Japonsko) kalibrovaném pro laboratorní králíky. Přístroj se nachází v bezprostřední blízkosti odběrové místnosti a analýza následovala ihned po odběru.

Biochemická analýza. Bezprostředně po odběru krve bylo na centrifuze separováno sérum a to bylo zamraženo. Nejpozději za 14 dní proběhla analýza ke stanovení CRP na přístroji Indiko™ typu 863 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Hodnocení výsledků. Pro interpretaci pilotní a verifikační fáze byly použity výsledky histologické analýzy, kultivace tkání, stěrů a výpotků, hemokultury a peroperační nález. Hemokultura byla hodnocena jako negativní, pokud všechny krevní vzorky jednoho králíka za celou dobu pokusu nevykázaly žádný bakteriální růst. Pokud alespoň jeden vzorek byl kultivačně pozitivní, zvíře bylo označeno jako zvíře s pozitivní hemokulturou. Kultivace tkání, výpotků a stěrů se považuje za negativní pouze v případě, že všechny vzorky z jednoho zvířete nevykázaly bakteriální růst. Výsledky „pomnožení“ a kontaminace jsou ignorovány. Výsledky „ojediněle“ a „zcela ojediněle“ se považují za pozitivní. Kultivace jednoho zvířete je považována za pozitivní, pokud alespoň jeden vzorek je hodnocen jako pozitivní. Peroperační nález byl hodnocen třemi stupni: klidné tkáně bez známek zánětu, zánětlivě změněné tkáně (rozbředlá synovialis, zkalený výpotek, pablány v dřevěné dutině), masivní známky zánětu (hnis, nekrózy, rozpadlé struktury). Histologické hodnocení bylo pro účely této studie redukováno na dva stupně: osteomyelitida přítomna, osteomyelitida nepřítomna.

Každá infekční dávka (10^5 , 10^6 a 10^7 CFU) potom dostala výsledné hodnocení na třístupňové stupnici podle toho, kolik ze tří vyšetření (peroperační nález, histologie, kultivace) mělo celkové hodnocení pozitivní:

- Infekce nepravděpodobná – negativní peroperační nález, kultivace i histologie
- Infekce nejistá – pozitivní jedno nebo dvě ze tří vyšetření
- Infekce jistá – pozitivní všechna tři vyšetření

2.1.2. Výsledky

Prvním třem laboratorním zvířatům byly aplikovány infekční dávky postupně 10^5 , 10^6 a 10^7 CFU. První zvíře mělo při odběru vzorků klidný peroperační nález a následně negativní kultivaci tkání i histologii. Vznik infekce u něj byl nepravděpodobný. Další dva králíci vykazovali peroperačně známky osteomyelity i infekční gonitidy a mikrobiologická i histologická analýza byly pozitivní. Hemokultury všech tří zvířat zůstaly sterilní a systémové projevy sepse nebyly přítomny. Infekční dávky 10^6 i 10^7 CFU se tedy ukázaly jako vhodné pro verifikační fázi.

Králík	Fáze	Infekční dávka	Morawietzova klasifikace	A1	A2	A3	C1	C2	HOES A/C	vyhodnocení
H17200	Pilotní	10^5	2. typ	+	0	+	0	0	2/0	negativní
H17211	Pilotní	10^6	2. typ	+	++	+	0	0	4/0	akutní osteomyelitida
H17217	Pilotní	10^7	2. typ	+	++	++	0	0	5/0	akutní osteomyelitida
H17214	Verifikační	10^7	2. typ	++	+++	+++	0	0	8/0	akutní osteomyelitida
H17210	Verifikační	10^7	2. typ	+	++	++	0	0	5/0	akutní osteomyelitida

Tabulka 2.2: Výsledky histologické analýzy vzorků z kolenního kloubu a tibiální dřevěné dutiny zvířat zahrnutých do pilotní a verifikační fáze validační studie

U dvou králíků ve verifikační fázi se použila dávka 10^7 CFU jako nejvyšší možná dávka, která vyvolá lokální infekci, ale ještě nezpůsobí sepsi. Ve verifikační fázi měl negativní hemokulturu králík

H17210 vždy, králík H17214 vždy kromě prvního pooperačního dne, kdy byl z krve vykultivován inokulovaný *Staphylococcus aureus*. Králík H17214 měl později systémové projevy sepse, výrazné algické chování a kachektizoval. Bylo nutné ho utratit již 14. pooperační den, aby se předešlo neúměrnému utrpení zvířete. Výzkumný tým tento průběh nepovažuje za následek příliš velké infekční dávky. Stejnou infekční dávku měli i další dva králíci, H17217 a H17210, ovšem bez systémových příznaků. U králíka H17214 se rozšířila infekce následkem operační chyby. Při vrtání kanálu do tibiální dřevěné dutiny vrták prorazil zadní kortiku tibie a pohmoždil měkké tkáně lýtko. To se stalo podkladem pro formování abscesu v podkolení, šíření infekce a zhoršení celkového stavu zvířete. Výsledky králíka H17214 tedy nebyly důvodem k redukcí infekční dávky v dalších pokusech. Tabulka 2.2 přináší výsledky histologické analýzy. Kultivační výsledky stěrů, tkání a sonikačních roztoků jsou uspořádány do Tabulky 2.3.



Obrázek 2.2: Makroskopický nitrokloubní nález po eutanázii.

Analgetizace. Transdermální náplast s fentanylem byla aplikována ještě před operací, aby byla sérová hladina fentanylu dostatečná již v době vzniku bolestivého podnětu. Navzdory doporučené dávce u králíka 25 $\mu\text{g}/\text{hod}$ se jako optimální dávka pro náš pokus jeví pouhá čtvrtina náplasti, tedy 6,25 $\mu\text{g}/\text{hod}$. Při vyšších dávkách jsou zvířata apatická a somnolentní a mají horší motoriku. Při této dávce zvířata normálně přijímají potravu i vodu, mají zájem o okolí a interagují s ošetřovatelkou a mezi sebou. Citlivější jedinci dostali do kombinace carprofenum 4 mg/kg tělesné hmotnosti podkožně během prvního pooperačního dne, eventuálně se přidala ještě čtvrtina náplasti s fentanylem. Účinek transdermální náplasti skončil třetí pooperační den. Dle stavu a chování zvířete se některým aplikovala ještě čtvrtina transdermální náplasti na 3 dny, jiní zůstali bez analgetizace.

Králík	Označení vzorku	Mikroskopie		Kultivace			
		PMN	Bakterie	24 h	48 h	pomnožení	anaerobní kultivace (48 h)
H17200	Implantát	-	-	-	-	-	-
	Hoffovo těleso	Zcela ojedinele	0	-	-	-	-
	Membrána z dřevné dutiny	Zcela ojedinele	0	-	-	-	-
	Punktát z kolena	Ojedinele	0	-	-	-	-
	Stěr z dřevné dutiny	Ojedinele	0	-	-	-	-
H17211	Implantát	-	-	-	-	+	-
	Hoffovo těleso	++	0	-	-	-	-
	Membrána z dřevné dutiny	++	0	-	-	+	+
	Punktát z kolena	Ojedinele	0	-	-	-	-
	Stěr z dřevné dutiny	Ojedinele	0	-	-	-	-
H17217	Implantát	-	-	+	+	+	+
	Hoffovo těleso	++++	0	-	-	-	-
	Membrána z dřevné dutiny	++++	0	-	-	-	-
	Punktát z kolena	++	0	-	-	-	-
	Stěr z dřevné dutiny	++	0	-	-	-	-
H17214	Implantát	-	-	Ojedinele	Ojedinele	+	Ojedinele
	Hoffovo těleso	+	Zcela ojedinele	+	+	+	+
	Membrána z dřevné dutiny	++	+	+++	+++	+	+++
	Punktát z kolena	+++	++	+++	+++	+	+++
	Stěr z dřevné dutiny	Ojedinele	0	Ojedinele	Ojedinele	+	Ojedinele
H17210	Implantát	-	-	-	-	-	-
	Hoffovo těleso	+	0	-	-	+	-
	Membrána z dřevné dutiny	+	0	-	-	+	-
	Punktát z kolena	+	Zcela ojedinele	-	-	+	Zcela ojedinele
	Stěr z dřevné dutiny	Ojedinele	0	-	-	+	-

Tabulka 2.3: Kultivační výsledky tkání, punktátů a sonikace implantátů. PMN = polymorfonukleární neutrofil

Králík	Fáze	Infekční dávka	Histologie	Kultivace z tkání a výpotku	Hemokultura	Sonikace	Peroperační nález	Závěr	Sepse
H17200	Pilotní	10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0
H17211	Pilotní	10 ⁶	1	1	0	0	1	1	0
H17217	Pilotní	10 ⁷	1	0	0	1	1	1	0
H17214	Verifikační	10 ⁷	1	1	1	1	2	1	1
H17210	Verifikační	10 ⁷	1	1	0	0	1	1	0

Tabulka 2.4: Závěrečná interpretace výsledků dle postupu v kapitole 2.1.1. 0 = negativní, 1 = pozitivní. U peroperačního nálezu 0 = klidné tkáně, 1 = zánětlivě změněné tkáně, 2 = masivní známky zánětu. V závěru 0 = infekce nepravděpodobná, 0/1 infekce nejistá, 1 = infekce jistá

2.1.3. Závěr

Verifikační fáze potvrdila nález pilotní fáze. Infekční dávka 10⁷ CFU *Staphylococcus aureus* 5217/A/2019 inokulovaná do tibiální dřevné dutiny cestou tibiálního plateau v přítomnosti cizího tělesa vyvolá osteomyelitidu tibie, infekční gonitidu a nezpůsobí celkovou sepsi organismu. V dalším pokusu (kapitola 2.2) byla primárně nasazena dávka 10⁷ CFU.

2.2. Testování antibakteriálních vlastností lipofosfonoxinů 3. generace

Lipofosfonoxiny (LPPO) jsou skupinou nových antibakteriálních látek odvozených od fosfonoxinů. Jejich baktericidní účinek je založený na permeabilizaci bakteriální cytoplasmatické membrány. Účinek LPPO byl prokázán *in vitro*, kdy inhiboval růst celé řady standardních bakteriálních kmenů. Spektrum účinku je široké: je aktivní proti grampozitivním a méně i proti gramnegativním bakteriím. LPPO nejsou při baktericidní koncentraci cytotoxické vůči lidským buněčným liniím a jsou dobře tolerovány u savců, kterým jsou podávány perorálně [257]. LPPO jsou acidostabilní a nejsou inaktivovány v prostředí žaludečních šťáv [372]. Lipofosfonoxiny se uvolňují z kostního cementu do okolí a inhibují růst standardních bakteriálních kmenů na povrchu cementových těles. Opakovaná expozice subinhibičním koncentracím LPPO nevyvolává u bakterií vznik rezistence [321]. Cílem této studie je prokázat *in vivo* antibakteriální účinnost látky DR7030 ze skupiny lipofosfonoxinů 3. generace, u kterých již byla prokázána účinnost *in vitro*.

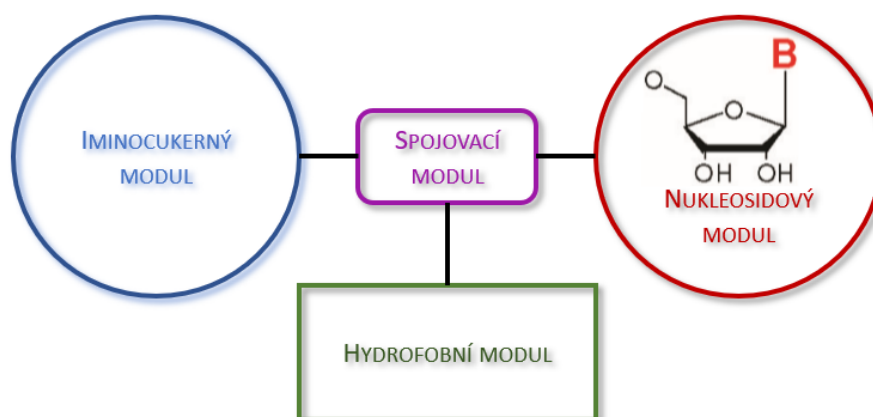


Schéma 2.2: Obecná struktura lipofosfonoxinů

2.2.1. Materiál a metody

V tomto pokusu se použil model infekce kloubní náhrady validovaný v předchozím experimentu, tedy stejný druh pokusných zvířat stejného dodavatele, stejný bakteriální kmen, stejně připravené implantáty, stejný operační postup, pooperační péče a analýza vzorků. Výsledky byly interpretovány podle klíče popsaného v kapitole 2.1.1. Králíkům byla odebírána krev pouze 1., 3., 7., 14. a 21. pooperační den, protože častější odběry nepřinesly žádné přidané informace, ale uváděly zvířata zbytečně do stresu. Celého experimentu se zúčastnilo 36 pokusných králíků.

Pokusné a kontrolní skupiny. Účinek každé testované látky byl testován na pokusné skupině 6 králíků. Ke každé pokusné skupině náleží dvě kontrolní skupiny složené z králíků stejného stáří dodaných ve stejné dodávce, kteří byli operováni ve stejném období jako králíci z pokusné skupiny. Králíci v pokusné skupině dostali implantát z cementu impregnovaného testovanou látkou. Králíkům ze skupiny pozitivních kontrol byl implantován cement Refobacin® Bone Cement R impregnovaný gentamicinem v koncentraci 0,5 g na 40 g cementu (Zimmer Biomet, Warsaw, Indiana, USA). Negativní kontroly potom měly implantát z prostého cementu Biomet Bone Cement R (Zimmer Biomet, Warsaw, Indiana, USA). Každá z kontrolních skupin čítala 3 králíky.

Fáze experimentu. Experiment byl rozdělen do tří fází. Do každé fáze bylo zahrnuto 12 králíků. V rámci jedné fáze byli králíci všech skupin operováni v průběhu 8 dnů. Z technických a organizačních důvodů bylo v první fázi operováno 8 králíků první den a 4 králíci následující den, ve druhé a třetí fázi byly operovány kontrolní skupiny první den a pokusné skupiny o 7 dní později. V první fázi byla látka DR7030 v koncentraci 0,2 g na 10 g kostního cementu a bakteriální inokulum obsahovalo 10^7 CFU (koncentrace 10^8 CFU/ml při inokulovaném objemu 100 μ l). V reakci na výsledky první fáze experimentu se výzkumný tým rozhodl zvýšit koncentraci LPPO na 0,3 g / 10 g cementu a snížit bakteriální nálož ve druhé fázi na 10^6 CFU (koncentrace 10^7 CFU/ml při inokulovaném objemu 100 μ l). Ve třetí fázi byla použita koncentrace 0,5 g / 10 g cementu a infekční dávka 10^4 CFU (koncentrace 10^5 CFU/ml při inokulovaném objemu 100 μ l), tedy dávka o řád nižší než nejslabší dávka při pilotní studii.

2.2.2. Výsledky

Fáze 1. Ve fázi 1 byla inokulovaná infekční dávka 10^7 CFU. Použitá koncentrace DR7030 byla 0,2 g / 10 g cementu. Implantace, pooperační období, 21denní sledování, eutanázie i odběr vzorků proběhly za standardních podmínek bez komplikací. Všichni pokusní králíci ze všech skupin měli pozitivní peroperační nález, tedy zánětlivě změněné tkáně. U dvou zvířat z pokusné skupiny se vytvořily kolemkloubní abscesy a nitrokloubní tkáně byly destruované. Kloub byl naplněn masivním tenzním hnisavým výpotkem. Všichni králíci, až na jednoho ze skupiny pozitivních kontrol, měli pozitivní kultivaci tkání, stěrů nebo výpotků. Nebyl nalezen signifikantní rozdíl v četnosti pozitivní hemokultury mezi pokusnou, pozitivní kontrolní nebo negativní kontrolní skupinou. Tabulka 2.5.

Králík	Implantát	Kultivace z tkání, výpotků a stěrů	Hemokultura	Sonikace	Peroperační nález	Závěr
H28209	PMMA	1	0	0	1	1
H28210	PMMA	1	0	0	1	1
H28229	PMMA	1	1	1	1	1
H28237	LPPO	1	1	1	1	1
H28246	LPPO	1	1	1	1	1
H28252	LPPO	1	1	1	2	1
H28255	LPPO	1	1	1	1	1
H28266	LPPO	1	0	1	2	1
H28274	LPPO	1	1	1	1	1
H28288	GEN	1	0	1	1	1
H28303	GEN	1	1	0	1	1
H28316	GEN	0	1	0	1	0/1

Tabulka 2.5: Interpretace výsledků fáze 1 dle postupu v kapitole 2.1.1. 0 = negativní, 1 = pozitivní. U peroperačního nálezu 0 = klidné tkáně, 1 = zánětlivě změněné tkáně, 2 = masivní známky zánětu. V závěru 0 = infekce nepravděpodobná, 0/1 infekce nejistá, 1 = infekce jistá. PMMA = prostý kostní cement bez příměsí, LPPO = kostní cement impregnovaný testovanou látkou, GEN = kostní cement impregnovaný gentamicinem.

Závěr: Při infekční dávce 10^7 CFU není schopna impregnace cementu látkou DR7030 o koncentraci 0,2 g / 10 g kostního cementu zabránit kolonizaci povrchu cementu bakteriemi *Staphylococcus aureus*. Infekce je diagnostikována u pokusných i kontrolních skupin.

Fáze 2. Je možné, že neúspěch fáze 1 je způsoben tím, že infekční dávka byla tak velká, že překryla účinek LPPO nebo gentamicinu. Proto se výzkumný tým rozhodl redukovat infekční dávku na 10^6 CFU (tedy inokulovat 100 μ l bakteriální suspenze o koncentraci 10^7 CFU/ml) a zvýšit koncentraci testované látky DR7030 na 0,3 g / 10 g kostního cementu. Nebyla zaznamenána žádná mimořádnost v průběhu implantace, pooperační péče, 21denního sledování, eutanázie ani odběru vzorků. Výsledky přináší tabulka 2.6. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v četnosti infekce u pokusné nebo kontrolních skupin.

Závěr: Při infekční dávce 10^6 CFU není schopna impregnace cementu látkou DR7030 o koncentraci 0,3 g / 10 g kostního cementu zabránit kolonizaci povrchu cementu bakteriemi *Staphylococcus aureus*. Infekce je diagnostikována u pokusných i kontrolních skupin.

Králík	Implantát	Kultivace z tkání, výpotků a stěrů	Hemokultura	Sonikace	Peroperační nález	Závěr
H36200	PMMA	1	1	1	1	1
H36201	PMMA	1	1	1	1	1
H36202	PMMA	1	1	1	2	1
H36218	LPPO	1	1	1	1	1
H36276	LPPO	1	1	1	1	1
H36277	LPPO	1	1	1	1	1
H36278	LPPO	1	0	0	1	1
H36280	LPPO	1	1	1	1	1
H36281	LPPO	0	0	0	1	0/1
H36203	GEN	1	0	0	1	1
H36230	GEN	1	1	0	2	1
H36279	GEN	1	0	0	1	1

Tabulka 2.6: Interpretace výsledků fáze 2 dle postupu v kapitole 2.1.1. 0 = negativní, 1 = pozitivní. U peroperačního nálezu 0 = klidné tkáně, 1 = zánětlivě změněné tkáně, 2 = masivní známky zánětu. V závěru 0 = infekce nepravděpodobná, 0/1 infekce nejistá, 1 = infekce jistá. PMMA = prostý kostní cement bez příměsí, LPPO = kostní cement impregnovaný testovanou látkou, GEN = kostní cement impregnovaný gentamicinem.

Fáze 3. Ze stejného důvodu jako ve fázi 2 byla snížena infekční dávka i ve fázi 3, tentokrát na 10^4 CFU. Inokulováno bylo tedy 100 μ l bakteriální suspenze o koncentraci 10^5 CFU/ml. Byla také navýšena koncentrace DR7030 na 0,5 g v 10 g kostního cementu. Při tomto nastavení se výsledky začínají diferencovat a projevy infekce u některých zvířat již nejsou tak zřetelné. Operace, pooperační období, sledování zvířat, eutanázie i odběr vzorků proběhly standardně. Výsledky jsou shrnuté Tabulce 2.7.

Závěr: Při infekční dávce 10^4 CFU není implantát kolonizován bakteriemi *Staphylococcus aureus*. Variabilita dosažených výsledků však nesevídčí preferenčně pro protektivní efekt LPPO, avšak ani protektivní účinek cementu s gentamicinem použitým jako pozitivní kontrola.

Králík	Implantát	Kultivace z tkání, výpotků a stěrů	Hemokultura	Sonikace	Peroperační nález	Závěr
H45208	PMMA	0	0	0	1	0/1
H45209	PMMA	1	0	0	1	1
H45210	PMMA	0	0	0	1	0/1
H45200	LPPO	1	1	0	1	1
H45201	LPPO	0	0	0	1	0/1
H45202	LPPO	0	0	0	0	0
H45203	LPPO	0	0	0	1	0/1
H45204	LPPO	1	0	0	2	1
H45217	LPPO	1	0	0	1	1
H45223	GEN	0	1	0	1	0/1
H45224	GEN	0	0	0	1	0/1
H45234	GEN	0	0	0	1	0/1

Tabulka 2.7: Interpretace výsledků fáze 3 dle postupu v kapitole 2.1.1. 0 = negativní, 1 = pozitivní. U peroperačního nálezu 0 = klidné tkáně, 1 = zánětlivě změněné tkáně, 2 = masivní známky zánětu. V závěru 0 = infekce nepravděpodobná, 0/1 infekce nejistá, 1 = infekce jistá. PMMA = prostý kostní cement bez příměsí, LPPO = kostní cement impregnovaný testovanou látkou, GEN = kostní cement impregnovaný gentamicinem.

3. Klinické studie

Kloubní punkce je neodmyslitelnou součástí diagnostiky infekce kloubní náhrady. Kloubní tekutina nejlépe vypovídá o stavu a dějích uvnitř kloubu, protože je v kontaktu s bakteriemi i imunitními buňkami, což musí ovlivnit její složení. Rutinní vyšetření kloubního punktátu zahrnuje přímou mikroskopii a kultivaci, stanovení počtu leukocytů a diferenciálu a od roku 2018 též synoviální CRP. Alfa-defensin je zahrnut do souboru diagnostických kritérií Mezinárodního konsenzu 2018, ale ne každé pracoviště má toto vyšetření rutinně k dispozici. Současný intenzivní výzkum rozvíjí stále nové metody, které by mohly mít vyšší přesnost než stávající metody a aspirují na zapracování do souboru diagnostických kritérií.

Autor disertační práce během studia spolupracoval na třech klinických diagnostických studiích zaměřených na analýzu kloubního výpotku při diagnostice infekce kloubní náhrady. První studie stanovila diagnostické vlastnosti cytologických parametrů kloubního punktátu a další dvě studie hodnotily sérové a synoviální biochemické markery.

3.1. Přínos cytologické analýzy kloubního punktátu k diagnostice IKN

Hlavní součástí diagnostického algoritmu infekce kloubní náhrady jsou dva cytologické parametry kloubního výpotku: počet leukocytů v kloubním punktátu a podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu synoviálních leukocytů. Do doby jejich zavedení do běžné diagnostické praxe byly jako referenční standardy starších studií používány typické příznaky infekce kloubní náhrady, peroperační nález a bakteriální kultivace, což jsou všechno nástroje nedostatečně senzitivní i nedostatečně specifické. Histologická analýza klasických preparátů má přijatelnou senzitivitu a specificitu, ale její výsledky přicházejí s mnohadenním odstupem po operaci. Různé dosavadní studie se rozcházejí v určení vhodných rozdělovacích hodnot synoviálních leukocytů i podílu neutrofilů, jakož i v určení diagnostických vlastností těchto testů. Mezinárodní konsenzus 2018 doporučuje jako rozdělovací hodnoty 3000 leukocytů/ μl výpotku a 80 % neutrofilů. Během prvních 90 dní po operaci doporučuje použít vyšší rozdělovací hodnoty, 10 000 leukocytů/ μl a 90 % neutrofilů. Švýcarská skupina navrhuje různé rozdělovací hodnoty pro různé klouby: počet leukocytů u TEP kolen 1700/ μl a u TEP kyčlí 4200/ μl . Podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu 65 % u TEP kolen a 80 % TEP kyčlí [227]. Tyto rozdělovací hodnoty přejala i IDSA a zapracovala je do svého doporučení [231]. Metaanalýza 15 cytologických studií udává u počtu leukocytů ve výpotku soubornou senzitivitu 88 % a specificitu 93 %, u podílu neutrofilů potom senzitivitu 90 % a specificitu 88 % [376].

Pokladem této kapitoly jsou výsledky diagnostické studie „Excellent AUC for joint fluid cytology in the detection/exclusion of hip and knee prosthetic joint infection“ autorského kolektivu vedeného prof. Gallem, publikované v časopise Biomedical Papers v roce 2017 [111]. Cílem této studie bylo stanovit význam cytologických parametrů kloubního výpotku a jejich přínos v diagnostice infekce kloubní náhrady. Ačkoliv tyto výsledky byly známy z předchozích studií, u různých autorů se poněkud liší vypočítané rozdělovací hodnoty a diagnostické vlastnosti. Předložená práce dokládá výsledky na větším souboru pacientů, a tím přispívá k vyšší přesnosti eventuální budoucí metaanalýzy. Doktorand přispěl rešerší literatury, podílel na designu studie, náboru pacientů a sepsování jejich souhlasů. Dále sbíral klinická i laboratorní data, roztřídil pacienty do infekčních a kontrolních skupin, vytvořil tabulky a schémata a částečně spolupracoval na textu rukopisu.

3.1.1. Materiál a metody

Výběr pacientů. Do studie byli zahrnuti všichni po sobě jdoucí pacienti, kteří podstoupili na Ortopedické klinice FNOL a UPOL revizní operaci infikované nebo asepticky selhané TEP kolena nebo kyčle v období od ledna 2009 do srpna 2015. Byli vyřazeni pacienti, kteří měli diagnostikováno systémové zánětlivé onemocnění, které by mohlo ovlivnit hladiny zánětlivých parametrů, např. reaktivní artritidu, Crohnovu nemoc, psoriatickou artritidu, tuberkulózu, dnovou artritidu nebo generalizované nádorové onemocnění (Graf 3.1.). Výjimkou byli pacienti s revmatoidní artritidou, kteří byli ve studii ponecháni. Ze statistické analýzy byli dále vyloučeni pacienti, jimž se nepodařilo odebrat dostatečné množství kloubního výpotku. Výsledný soubor tedy čítal 78 infikovaných kloubních náhrad a 313 asepticky selhaných kloubních náhrad. Podíl infekcí v našem souboru revizních operací je tedy $78/391 = 19,9\%$. Všechny infekční i aseptické revizní operace proběhly za standardních podmínek a s písemným informovaným souhlasem pacienta. Studie byla schválena etickou komisí. 37 pacientů (47 %) z infekční skupiny užívalo antibiotika již před odběrem kloubního punktátu k analýze (1 až 197 dní, medián 25 dní).

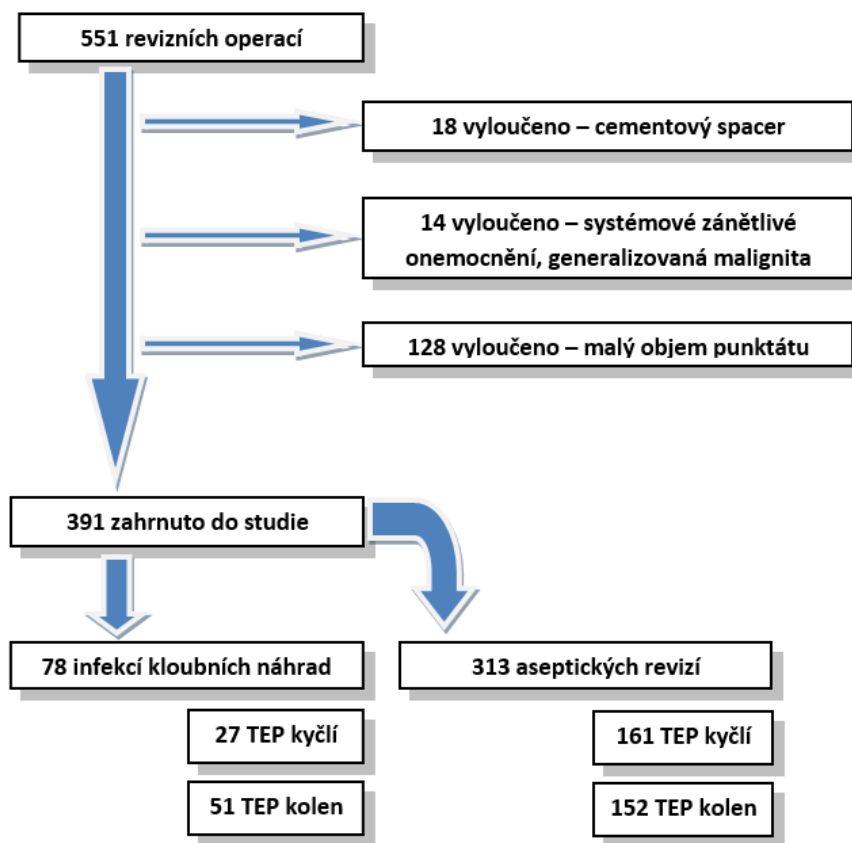
Definice infekce kloubní náhrady. Jako referenční standard byl použitý soubor diagnostických kritérií odvozený od diagnostických kritérií dříve užívaných v literatuře. Pacient byl veden a léčen jako infekční, pokud splňoval následující diagnostická kritéria:

1. píštěl komunikující s kloubní dutinou a/nebo zřetelná přítomnost hnisu v kloubní dutině během operace
2. pozitivní výsledky histologické analýzy a zároveň pozitivní kultivace peroperačních vzorků tkání nebo výpotku
3. pokud byla pozitivní pouze histologie nebo pouze mikrobiologie, byl pacient veden jako infekční při splnění alespoň dvou z následujících podmínek: důvodné klinické podezření na infekci kloubní náhrady (akutní nástup příznaků, horečka, edém nebo zarudnutí kloubu, lokální bolestivost, časný selhání implantátu, poruchy hojení rány), zvýšená sedimentace erytrocytů (více než 30 mm za hodinu), zvýšený CRP (alespoň 1,5násobek horní hranice normy, tedy 15 mg/l).

Všichni ostatní pacienti byli považováni za aseptické [107]. Referenční standard nepřipouštěl nerozhodné výsledky a každý pacient byl přidělen do infekční nebo aseptické skupiny. Pacienti s chybějícími údaji byli vyloučeni ze studie.

Alespoň jedno z následujících:	Píštěl komunikující s kloubní dutinou	
	Zřetelný nález hnisu v kloubní dutině	
	Alespoň dvě z následujících:	Pozitivní histologie
		Pozitivní peroperační kultivace tkáně nebo výpotku
Alespoň dvě z následujících: Klinické podezření FW > 30 mm/h CRP > 15 mg/l		

Tabulka 3.1: Grafické zpracování diagnostických kritérií referenčního standardu.



Graf 3.1: Vývojový diagram demonstrující počty pacientů zahrnutých do studie.

Klasifikace infekce kloubní náhrady. Pro účely této studie jsme použili modifikovanou klasifikaci infekce kloubní náhrady Trampuze a Zimmerliho (kapitola 1.4.5) a původní klasifikaci celkového stavu pacienta a lokálního stavu končetiny McPhersona (kapitola 1.4.4).

Odběr vzorků. Kloubní punktát byl aspirován během revizní operace po incizi kůže a podkoží, těsně před artrotomií, aby se minimalizovalo riziko falešně pozitivních kultivačních výsledků. Vzorky tkání byly odebrány ihned po artrotomii nejméně ze tří různých částí kloubu, která jevíla makroskopicky nejvýraznější známky zánětu: alespoň jednou z kloubního pouzdra a alespoň jednou z každého kostního lůžka zpod implantátu tak, aby byla zachycena SLIM. Krevní vzorky se odebíraly při příjmu den před plánovanou operací, eventuálně v den revizní operace.

Cytologická analýza. Vzorky k cytologické analýze byly do laboratoře dopraveny ve zkumavkách s roztokem EDTA (prevence aglutinace). Počet leukocytů byl stanoven strojově na přístroji Sysmex XE-5000 (Korporace Sysmex, Kobe, Japonsko) v režimu tělních tekutin. Všechny výsledky jsou uvedeny jako počet buněk na 1 μ l punktátu. Diferenciální rozpočet leukocytů byl potom proveden ručně: nátěr byl obarven metodou Pappenheimova panoptického barvení a odečítán mikroskopem při 1000násobném zvětšení. Výsledky jsou udávány jako poměr počtu sledovaných buněk k celkovému počtu leukocytů.

Ukazatel	Hodnota	
Muži / Ženy	38 / 40	(49 % resp. 51 %)
TEP kyčlí / TEP kolen	27 / 51	(14,4 % resp. 25,1 %)*
Počet leukocytů ve výpotku [počet buněk v 1 µl]	39 000	(126 – 416 600)
Podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu	90 %	(47 % – 98 %)
Podíl lymfocytů v diferenciálním rozpočtu	3 %	(0 % – 53 %)
Předoperační CRP [mg/l]	112	(8 – 470)
Předoperační FW [mm/h]	59	(2 – 120)
Předoperační IL-6 [ng/l]	Všechny TEP	63 (5,0 – 3420)
	Zvlášť u TEP kyčlí	63 (5,0 – 808)
	Zvlášť u TEP kolen	64 (5,3 – 3420)
Mikrobiologická mikroskopie	Negativní	7 9,2 %
	PMN	47 61,8 %
	PMN a bakterie	22 28,9 %
Věk v době implantace nebo poslední revize [roky]	67,6	(44,5 – 90,8)
Věk v době sledované revize [roky]	72,7	(45,8 – 90,9)
Přežití implantátu [měsíce]	21	(0 – 236)

Tabulka 3.2: Charakteristika skupiny infekcí kloubních náhrad. TEP = totální endoprotéza, CRP = C-reaktivní protein, FW = sedimentace erytrocytů, IL-6 = interleukin 6, PMN = polymorfonukleární neutrofil; *udává podíl infekcí na celkovém počtu revidovaných TEP kyčlí, resp. kolen; údaje jsou vyjádřeny jako medián, nejnižší a nejvyšší naměřená hodnota.

Kultivace. Punktát i vzorky tkání byly převezeny ke kultivaci ihned během operace, a to bez transportního média. Pokud v den operace nebyl kloubní výpotek přítomen, byl použit výsledek z poslední předoperační ambulantní kontroly. Byla provedena i kultivace ze stěrů z implantátů (použity stěrky se standardním transportním médiem) a sonikace explantátů. Celkem bylo ke kultivačnímu vyšetření odesláno 5-9 vzorků od každého pacienta. Teprve po odběru všech vzorků ke kultivaci bylo pacientovi podáno nitrožilně antibiotikum v rámci standardního antibiotického peroperačního profylaktického protokolu. Vzorky byly inokulovány na půdy do 2 hodin po odběru a kultivace probíhala dle standardního laboratorního protokolu za aerobních (Columbia agar, MacConkey agar, Sabouraudův agar, játrový bujón, vše Trios, spol. s r.o.) i anaerobních podmínek (VL agar, Trios, spol. s r.o.). Kultivace trvala 12 dní. První odečet aerobní kultivace byl po 24 hodinách, v případě anaerobní kultivace po 48 hodinách. Okolní teplota byla udržována na 37 °C po celou dobu kultivace [107]. Tekuté vzorky byly obarveny k mikroskopii dle Grama. Sonikaci (sonikační lázeň BactoSonic, Bandelin) byla provedena dle doporučeného protokolu, délka aerobní i anaerobní kultivace byla opět prodloužena na 12 dní [143]. Výsledek kultivace punktátu byl označen za pozitivní, pokud byly patrné jakékoliv známky bakteriálního růstu, tedy včetně výsledků „velmi ojediněle“ a „po pomnožení.“ Tkáňové vzorky byly hodnoceny jako pozitivní, pokud byl izolován stejný původce alespoň ze dvou odběrových míst [15]. Interpretací závěr byl vždy stanoven na základě všech kultivačních výsledků. Zvažována byla rovněž možnost kontaminace.

Ukazatel		Hodnota	
Muži / Ženy	V obou asept. skupinách	125/188	40,0 % resp. 60,0 %
TEP kyčlí / TEP kolen		161/152	
Počet leukocytů ve výpotku [počet buněk v 1 μ l]		700	(30 – 10 500)
Podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu		42 %	(0 % – 95 %)
Podíl lymfocytů v diferenciálním rozpočtu		50 %	(0 % – 98 %)
Předoperační CRP [mg/l]		3,2	(0,1 – 185)
Předoperační FW [mm/h]		17	(2 – 115)
Předoperační IL-6 [ng/l]	Všechny TEP	4,8	(1,5 – 130)
	Zvlášť u TEP kyčlí	4,5	(1,5 – 130)
	Zvlášť u TEP kolen	5,2	(1,5 – 76,9)
Mikrobiologická mikroskopie	Negativní	258	97,0 %
	PMN	6	2,3 %
	PMN a bakterie	1	0,7 %
Věk v době implantace nebo poslední revize [roky]		59,4	(25,1 – 85,4)
Věk v době sledované revize [roky]		68,8	(38,4 – 91,6)
Přežití implantátu [měsíce]		125	(0 – 377)

Tabulka 3.3: Charakteristika skupin aseptických revizí. TEP = totální endoprotéza, CRP = C-reaktivní protein, FW = sedimentace erytrocytů, IL-6 = interleukin 6, PMN = polymorfonukleární neutrofil; údaje jsou vyjádřeny jako medián, nejnižší a nejvyšší naměřená hodnota.

Histologie. Za pozitivní výsledek je označen takový nález, kde patolog identifikoval 5 nebo více polymorfonukleárních neutrofilů v každém zorném poli při 400násobném zvětšení a zhlédnutí 5 zorných polí [238].

Design studie byl prospektivní. Pacienti byli rozděleni do infekčních a aseptických skupin podle diagnostických kritérií referenčního standardu uvedených výše. Rozdělení pacientů do infekčních, resp. aseptických skupin provedl autor disertační práce, který se nepodílel na diagnostice ani rozhodování o léčbě pacientů. Součástí kritérií infekce kloubní náhrady (referenčního standardu) nebyl žádný cytologický parametr. Během studie neměli mikrobiologové ani hematologové přístup ke klinickým záznamům ani k výsledkům histopatologického vyšetření. Všechny zkoumané údaje byly průběžně vkládány do elektronických tabulek (Microsoft Excel, Microsoft Corp., WA, USA) a následně statisticky analyzovány. Zkoumané diagnostické metody byly:

1. počet leukocytů v 1 μ l výpotku
2. podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu výpotku
3. podíl lymfocytů v diferenciálním rozpočtu výpotku

Srovnáním s referenčním standardem byly určeny diagnostické vlastnosti těchto diagnostických testů, tedy jejich senzitivita, specificita, přesnost, prediktivní hodnota pozitivního výsledku, prediktivní hodnota negativního výsledku, pozitivní a negativní věrohodnostní poměr, diagnostický poměr šancí a jejich intervaly spolehlivosti. K výpočtu byl použitý software IBM SPSS Statistics v. 22. (USA) a program MedCalc. V kategoriálních parametrech byly soubory porovnávány pomocí Fisherova přesného testu. Pro porovnání kvantitativních parametrů byl, v závislosti na

normalitě dat, použit Mann-Whitney U-test, resp. dvouvýběrový Studentův t-test. Normalita dat byla ověřena pomocí testu Shapiro-Wilk. Statistická významnost byla stanovena na $p = 0,05$. Nebyly použity rozdělovací hodnoty z dříve publikovaných studií jiných autorů. Ideální rozdělovací hodnoty sledovaných ukazatelů byly stanoveny pomocí metody ROC a Youdenova indexu J [194].

3.1.2. Výsledky

Nejčastější původci. Nejčastějším původcem byl *Staphylococcus aureus*, následovaný koaguláza-negativními stafylokoky a streptokoky. Celých 29,5 % všech případů potvrzených infekcí kloubních náhrad mělo negativní kultivační nález a pouze 5,1 % kultivačních nálezů prokázalo více než jednoho bakteriálního původce. Detaily dokládá tabulka 3.4.

Původce	Počet případů	Podíl zastoupení
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	24,4 %
Koaguláza-negativní stafylokoky	14	17,9 %
Hemolytické streptokoky	11	14,1 %
Anhemolytické a viridující streptokoky	5	6,4 %
Gramnegativní tyčky z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	4	5,1 %
Pseudomonády a další nefermentující gramnegativní tyčky	3	3,8 %
Enterokoky	1	1,3 %
Polymikrobiální nálezy	4	5,1 %
Negativní kultivace	23	29,5 %

Tabulka 3.4: Četnost jednotlivých původců izolovaných z peroperačních vzorků tkání a výpotků.

Klasifikace infekcí. Nejčastějším typem infekce byla hematogenní infekce kloubní náhrady. Na druhém místě potom časná pooperační infekce. Podrobný rozpis podle typů infekcí přináší tabulka 3.5.

Typ infekce	Počet případů	Podíl zastoupení
1. Časná pooperační	19	24,4 %
2. Opožděná	16	20,5 %
3. Hematogenní	27	34,6 %
4. Pozitivní peroperační kultivace	1	1,3 %
5. Recidiva	2	2,6 %
6. Reinfekce	4	5,1 %
7. Přímý přestup infekce z okolí	9	11,5 %
Celkem	78	100,0 %

Tabulka 3.5: Podíl zastoupení jednotlivých typů infekcí kloubních náhrad.

Počet leukocytů ve výpotku a podíl neutrofilů a lymfocytů v diferenciálním rozpočtu. Do statistické analýzy počtu leukocytů bylo použito 373 vzorků výpotků. U 326 z nich bylo možné určit i diferenciální rozpočet. Ostatní vzorky byly sražené a neodečitatelné. Infekční pacienti měli významně vyšší počet leukocytů ve výpotku (medián 39 000 leukocytů v 1 μ l výpotku) v porovnání s aseptickými pacienty (medián 700 leukocytů v 1 μ l výpotku). Medián podílu neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů byl u infekčních pacientů 90 %, zatímco u aseptických pacientů 42 %. Naopak podíl lymfocytů vycházel v infekčních případech výrazně nižší než u aseptických kontrol (medián 3 % u infekčních oproti 50 % u aseptických). U všech tří ukazatelů byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi infekčními a aseptickými skupinami. Pomocí Mann-Whitney U testu byla stanovena pravděpodobnost menší než 0,0001, že sledované skupiny se shodují v ukazatelích počtu leukocytů, podílu neutrofilů nebo podílu lymfocytů v diferenciálním rozpočtu leukocytů. Výsledky jsou graficky uspořádány v tabulce 3.6. Pro úplnost jsou uvedeny i hodnoty získané při analýze TEP kyčlí a TEP kolen zvlášť. Mezi skupinami TEP kolen a TEP kyčlí nebyl nalezen statisticky významný rozdíl.

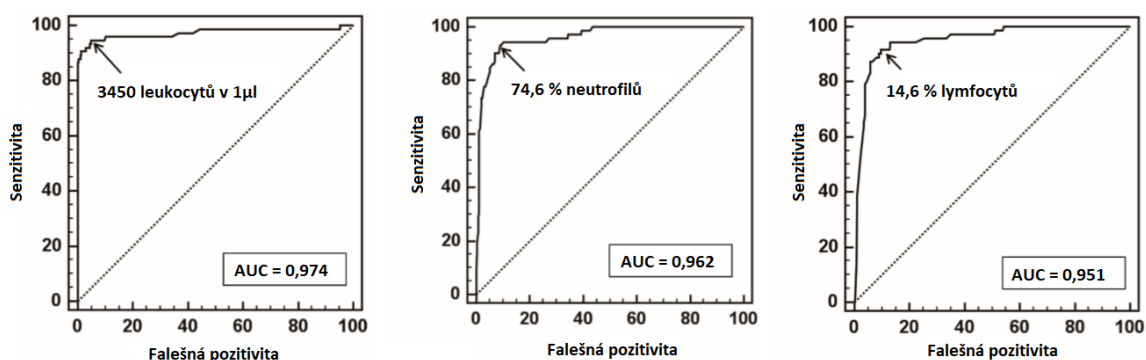
		Aseptické skupiny	Infekční skupiny
Počet leukocytů v 1 μl výpotku	Všechny TEP	700 (30 – 10 500)	39 000 (126 – 416 600)
	TEP kyčlí	605 (30 – 10 400)	36 300 (1000 – 416 600)
	TEP kolen	744 (30 – 10 500)	39 600 (126 – 328 700)
Podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu	Všechny TEP	42 % (0 % – 95 %)	90 % (47 % – 98 %)
	TEP kyčlí	46 % (0 % – 95 %)	91 % (52 % – 95 %)
	TEP kolen	38 % (0 % – 94 %)	89 % (47 % – 98 %)
Podíl lymfocytů v diferenciálním rozpočtu	Všechny TEP	50 % (0 % – 98 %)	3 % (0 % – 53 %)
	TEP kyčlí	47 % (1 % – 98 %)	3 % (1 % – 38 %)
	TEP kolen	54 % (0 % – 92 %)	3 % (0 % – 53 %)

Tabulka 3.6: Výsledky sledovaných ukazatelů u infekčních a neinfekčních skupin. Hodnoty jsou udávány jako medián, nejnižší a nejvyšší naměřená hodnota.

Diagnostické vlastnosti počtu leukocytů. Test počtu leukocytů ve výpotku prokázal skvělou diagnostickou přesností a plocha pod ROC křivkou vyšla 0,974 (95% interval spolehlivosti 0,945 – 1,000). Pomocí Youdenova indexu J byla jako ideální rozdělovací hodnota určena 3450 leukocytů na 1 μ l výpotku (graf 3.2). Když byly analyzovány zvlášť TEP kyčlí, rozdělovací hodnota byla stanovena na 4100 buněk na 1 μ l výpotku, u kolen 3200/ μ l. Tabulka 3.8 ilustruje všechny hledané diagnostické vlastnosti testu. Přínos stanovení počtu leukocytů ve výpotku k diagnostice IKN je nesporný. Pokud máme předtestovou pravděpodobnost IKN u konkrétního pacienta 50 % (tedy absolutně nejsme schopni rozhodnout, zda je selhání jeho implantátu infekční nebo aseptické), po stanovení počtu leukocytů ve výpotku je pravděpodobnost IKN 95 % v případě positivity testu a 5,6 % v případě negativity (pracujeme s pozitivním věrohodnostním poměrem 19,0 a s negativním věrohodnostním poměrem 0,06).

Leukocyty v punktátu	Test pozitivní (počet větší nebo roven 3450/ μ l)	Test negativní (počet menší než 3450/ μ l)	Celkem
AUC = 0,974			
IKN	69	4	73
Aseptické revize	15	285	300
Celkem	84	289	373

Tabulka 3.7: Kontingenční tabulka pro test leukocytů ve výpotku u TEP kolen a kyčlí dohromady.



Graf 3.2: ROC křivky pro počet leukocytů ve výpotku, podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů a podíl lymfocytů v diferenciálním rozpočtu leukocytů. Analyzovány TEP kolen i kyčlí dohromady.

	Počet leukocytů		
	Všechny TEP	Kyčle	Kolena
Hranice [buňky/ μ l]	3450	4100	3200
Senzitivita	94,7 %	92,0 %	96,0 %
Specifická	95,0 %	96,8 %	95,9 %
PPV	82,6 %	82,1 %	88,9 %
NPV	98,6 %	98,7 %	98,6 %
LR+	19,0	28,3	23,5
LR-	0,06	0,08	0,04
DOR	339	341	560

Tabulka 3.8: Diagnostické vlastnosti počtu leukocytů ve výpotku. PPV = prediktivní hodnota pozitivního výsledku, NPV = prediktivní hodnota negativního výsledku, LR+ = pozitivní věrohodnostní poměr, LR- = negativní věrohodnostní poměr, DOR = diagnostický poměr šancí

Diagnostické vlastnosti podílu neutrofilů a podílu lymfocytů. Plocha pod ROC křivkou byla u těchto testů mírně nižší než u předchozího testu, leč stále velmi vysoká. Podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů vykázal plochu pod křivkou 0,962 (95% interval spolehlivosti 0,939 – 0,984) při zahrnutí všech TEP bez separace kolen a kyčlí. Podobně u podílu lymfocytů vyšla AUC = 0,951 (95% interval spolehlivosti 0,924 – 0,978). Pomocí Youdenova indexu J byla potom stanovena optimální rozdělovací hodnota 74,6 % neutrofilů, resp. 14,6 % lymfocytů. První test je hodnocen jako pozitivní, pokud je v diferenciálním rozpočtu leukocytů zastoupeno 74,6 % nebo více neutrofilů. Druhý test je hodnocen jako pozitivní, pokud je v diferenciálním rozpočtu leukocytů zastoupeno 14,6 % nebo méně lymfocytů. Všechny diagnostické vlastnosti testů a rozdělovací hodnoty pro separované skupiny TEP kolen a TEP kyčlí jsou seřazené v tabulkách 3.11. a 3.12.

Podíl PMN AUC = 0,962	Test pozitivní (podíl větší nebo roven 74,6 %)	Test negativní (podíl menší než 74,6 %)	Celkem
IKN	65	5	70
Aseptické revize	21	235	256
Celkem	86	240	326

Tabulka 3.9: Kontingenční tabulka pro test podílu polymorfonukleárních neutrofilů v diferenciálním rozpočtu výpotku u TEP kolen a kyčlí dohromady.

Podíl lymfocytů AUC = 0,951	Test pozitivní (podíl menší nebo roven 14,6 %)	Test negativní (podíl větší než 14,6 %)	Celkem
IKN	64	6	70
Aseptické revize	18	233	251
Celkem	82	239	321

Tabulka 3.10: Kontingenční tabulka pro test podílu lymfocytů v diferenciálním rozpočtu výpotku u TEP kolen a kyčlí dohromady.

	Podíl neutrofilů		
	Všechny TEP	Kyčle	Kolena
Hranice	74,6 %	76,5 %	72,8 %
Senzitivita	93,1 %	95,7 %	93,9 %
Specifická	91,1 %	93,8 %	90,0 %
PPV	74,4 %	73,3 %	78,0 %
NPV	97,9 %	99,2 %	97,5 %
LR+	10,4	15,3	9,4
LR-	0,076	0,046	0,068
DOR	136,9	332,6	138,2

	Podíl lymfocytů		
	Všechny TEP	Kyčle	Kolena
Hranice	14,6 %	14,6 %	19,9 %
Senzitivita	91,7 %	95,7 %	93,9 %
Specifická	90,3 %	93,0 %	84,6 %
PPV	72,5 %	71,0 %	69,7 %
NPV	97,5 %	99,2 %	97,3 %
LR+	9,5	13,6	6,1
LR-	0,092	0,047	0,072
DOR	102,5	289,4	84,7

Tabulky 3.11. a 3.12: Diagnostické vlastnosti podílu neutrofilů, resp. podílu lymfocytů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku. PPV = prediktivní hodnota pozitivního výsledku, NPV = prediktivní hodnota negativního výsledku, LR+ = pozitivní věrohodnostní poměr, LR- = negativní věrohodnostní poměr, DOR = diagnostický poměr šancí

3.2. Přínos stanovení sérového interleukinu 6 k diagnostice IKN

Nové vysoce senzitivní a specifické biochemické markery IKN se objevují doslova každý rok. Kromě synoviálních biomarkerů postupuje dopředu nebývalou rychlostí i objevování a testování nových sérových markerů. Interleukin 6 už je v posledních letech společně s CRP, sedimentací erytrocytů, prokalcitoninem a TNF- α řazen mezi tradiční sérové zánětlivé ukazatele. Mezi nové markery patří např. presepsin, toll-like receptor 2 (TLR2), rozpustný receptor pro aktivátor plasminogenu urokinázového typu (suPAR), chemokin ligand 2 (CCL2), osteopontin nebo rozpustná mezibuněčná adhezní molekula 1 (sICAM-1). Na studie hodnotící jejich diagnostické vlastnosti si musíme ještě počkat [7][324].

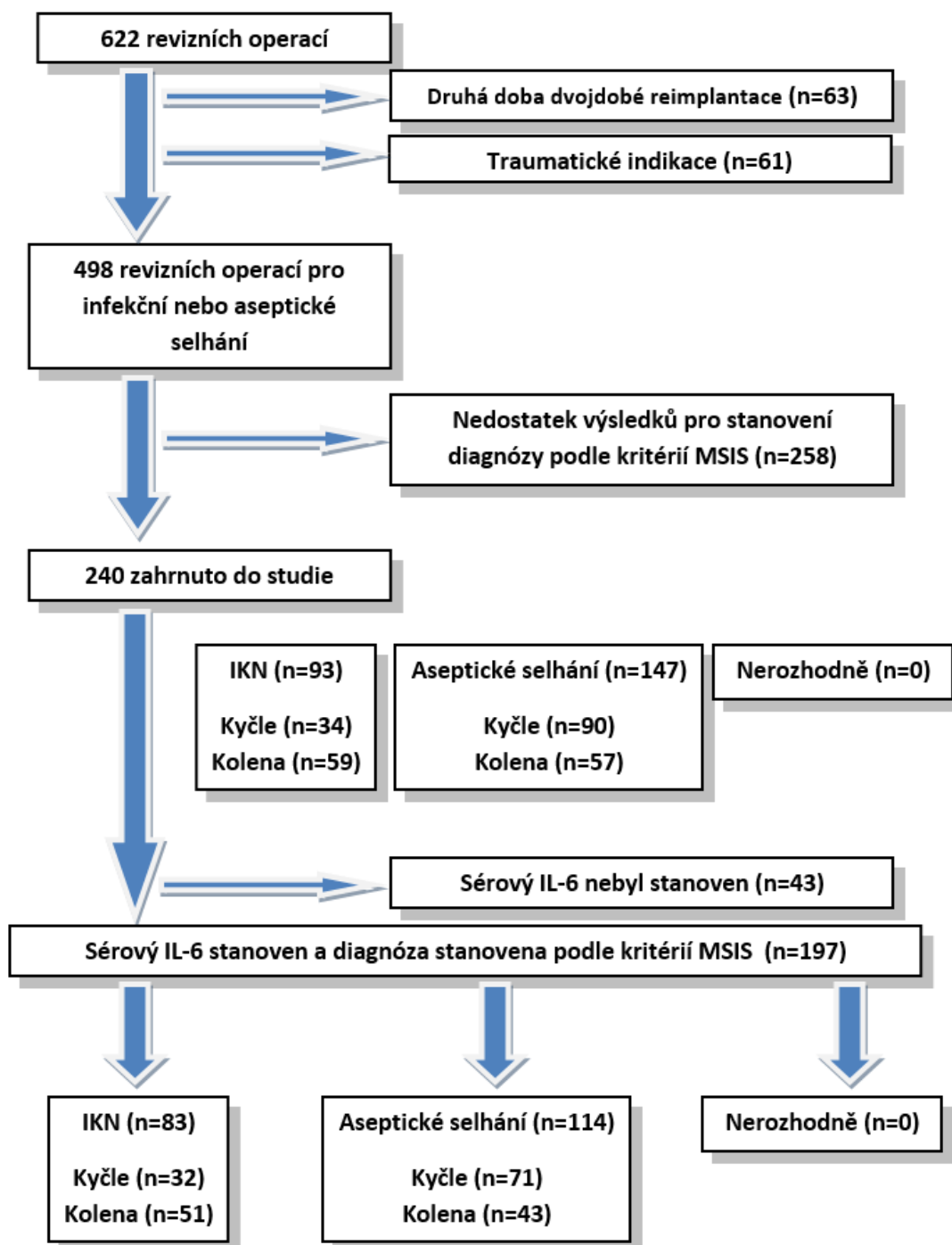
Interleukin 6 je pleiotropní cytokin o atomové hmotnosti 26 kDa s prozánětlivými i protizánětlivými účinky, promotor hematopoézy, modulátor kostní resorpce a induktor vývoje plasmatických buněk. Je produkován stimulovanými makrofágy a monocyty a patří mezi hlavní mediátory akutní fáze zánětlivé odpovědi. Hladina IL-6 rychle stoupá po poškození tkáně. IL-6 je zodpovědný například za zvýšení syntézy CRP při zánětu, horečku nebo chemotaxi neutrofilů do místa poškození. IL-6 ovlivňuje funkci fibrinogenu a komplementu [72]. IL-6 je jedním z několika faktorů, které stimulují sekreci antimikrobiálních peptidů leukocyty, včetně defensinů [120]. Elevaci sérového IL-6 pozorujeme při bakteriémii, infekci CNS nebo rejekci štěpu po transplantaci. IL-6 stimuluje osteoklastogenezi, takže jeho dlouhodobě zvýšená synoviální hladina vede k osteolýze [273]

Normální hladina sérového IL-6 u zdravé populace je nižší než 1 ng/l [72]. U pacientů s infekcí kloubní náhrady se jeho hladina výrazně zvyšuje, zatímco v případě aseptického uvolnění zůstává v normě [332]. Jakou přesně má sérový interleukin 6 senzitivitu a specificitu, stanovila diagnostická studie „Serum IL-6 in combination with synovial IL-6 / CRP shows excellent diagnostic power to detect hip and knee prosthetic joint infection“ autorského kolektivu vedeného prof. Gallem, jehož členem byl i autor předložené disertační práce. Článek byl otištěn 21.6.2018 v časopise Plos One [359]. Doktorand přispěl rešerší literatury, podílel se na designu studie, náboru pacientů a sepisování informovaných souhlasů. Dále pracoval na sběru klinických i laboratorních dat a interpretaci výsledků, roztřídil pacienty do infekčních a kontrolních skupin, vytvořil tabulky a schémata a částečně spolupracoval na textu rukopisu.

3.2.1. Materiál a metody

Výběr pacientů. Do studie byli zařazeni všichni po sobě jdoucí pacienti, kteří podstoupili na Ortopedické klinice FNOL a UPOL revizní operaci TEP kolena nebo kyčle v období od října 2010 do června 2016. Ve studii byli ponecháni pacienti s revmatoidní artritidou, dnou, psoriázou i jinými systémovými zánětlivými onemocněními. U některých parametrů potom byli tito pacienti hodnoceni zvlášť. Ze sledování byly vyloučeny druhé doby dvojdobé reimplantace (pro duplicitu sledování konkrétního pacienta) a operace z traumatických indikací (periprotetické fraktury, fraktury implantátů). Pacienti operovaní v období prvních šesti týdnů po implantaci TEP i pacienti s antibiotickou léčbou nasazenou před odběrem vzorků nebyli ze studie vyřazeni. 46 pacientů užívalo antibiotika již před odběrem vzorků k analýze (1 až 197 dní, medián 7 dní). Soubor pacientů se do značné míry překrývá se souborem z předchozí studie (z kapitoly 3.1). Menší počet pacientů je vysvětlen tím, že IL-6 se na pracovišti autorů začal odebírat rutinně až v říjnu 2010. Naopak sběr dat pro účely této studie skončil o rok později, a proto jsou zde zahrnutí i noví pacienti. Celkem se studie zúčastnilo 197 pacientů, z toho 83 mělo infekci kloubní náhrady a 114 podstoupilo aseptickou revizi

(graf 3.3). Všechny infekční i aseptické revizní operace proběhly za standardních podmínek a s písemným informovaným souhlasem pacienta. Studie byla schválena etickou komisí.



Graf 3.3: Vývojový diagram demonstrující počty pacientů zahrnutých do studie.

Definice infekce kloubní náhrady. Jako referenční standard byl použit soubor diagnostických kritérií Mezinárodního konsenzu ve Philadelphii z roku 2013 [241]. Každý pacient byl přidělen do infekční nebo aseptické skupiny – nepřipouštěli jsme nerozhodné výsledky. V případě chybějících dat a nemožnosti přiřazení pacienta do skupiny na základě kritérií Mezinárodního konsenzu 2013 byl pacient vyřazen ze studie (graf 3.3).

Klasifikace infekce kloubní náhrady. Pro účely této studie jsme použili modifikovanou klasifikaci infekce kloubní náhrady Trampuze a Zimmerliho (kapitola 1.4.5) a původní klasifikaci celkového stavu pacienta a lokálního stavu končetiny McPhersona stejně jako v předchozí studii (kapitola 1.4.4).

	Všechny TEP			TEP kyčlí			TEP kolen		
	IKN	Kontroly	<i>p</i>	IKN	Kontroly	<i>p</i>	IKN	Kontroly	<i>p</i>
Muži/ženy	44/49 47,3%/52,7%	57/90 38,8%/61,2%	0,192	12/22 35,3%/64,7%	24/66 26,7%/73,3%	0,379	32/27 54,2%/45,8%	33/24 57,9%/42,1%	0,712
Věk v době revize [roky]	73,3 40,6 – 90,9	70,7 44,3 – 86,3	0,248	73,7 40,6 – 90,9	70,4 44,3 – 86,3	0,260	72,5 47,8 – 87,0	70,9 49,9 – 85,4	0,749
BMI	30,5 20,5 – 48,9	29,7 19,5 – 50,2	0,873	28,2 21,5 – 45,0	28,6 19,5 – 50,2	0,920	31,0 20,5 – 48,9	31,0 22,3 – 40,9	0,411
Primární OA / Sekundární OA	55/38 59,1%/40,9%	84/63 57,1%/42,9%	0,760	16/18 47,1%/52,9%	39/51 43,3%/56,7%	0,710	39/20 66,1%/33,9%	45/12 78,9%/21,1%	0,122
Stabilní TEP	61/93 65,6%	72/147 49,0%	<0,0001	19/34 55,9%	35/90 38,9%	<0,0001	42/59 72,4%	37/57 64,9%	0,106
Typ pacienta McPherson	A	35 (37,6%)	32 (56,1%)	12 (35,3%)	46 (51,1%)	23 (39,0%)	32 (56,1%)		
	B	52 (55,9%)	19 (33,3%)	17 (50,0%)	35 (38,9%)	35 (59,3%)	19 (33,3%)		0,006
	C	6 (6,5%)	6 (10,5%)	5 (14,7%)	9 (10,0%)	1 (1,7%)	6 (10,5%)		
Přežití protézy [měsíce]	22 0,26 – 236	116 0,6 – 388		18 0,3 – 236	151 0,6 – 388		25 0,3 – 201	47 0,6 – 265	
CRP [mg/l]	74 1 – 435	3 1 – 152	< 0,0001	50 3 – 386	3 1 – 47	< 0,0001	107 1 – 435	3,5 1 – 152	< 0,0001
Sedimentace [mm/h]	60 1 – 120	17 2 – 94	< 0,0001	55 10 – 120	17 2 – 75	< 0,0001	61 1 – 120	15 2 – 94	< 0,0001
Pozitivní kultivace	76/93 81,7%	34/147 24,1%	< 0,0001	27/34 79,4%	14/90 15,6%	< 0,0001	49/59 83,1%	11/57 19,3%	< 0,0001
Pozitivní histologie	40/93 43,0%	48/147 32,7%	0,105	14/34 41,2%	31/90 34,4%	0,487	26/59 44,1%	17/57 29,8%	0,112

Tabulka 3.13: Charakteristika pacientů v souboru

Design studie. Studie byla navržena jako prospektivní. U všech po sobě jdoucích pacientů, kteří na pracovišti autorů podstoupili revizní operaci TEP kolena nebo kyčle a prošli výběrovými kritérii, byla odebrána potřebná data a výsledky byly průběžně vkládány do elektronických tabulek (Microsoft Excel, Microsoft Corp., WA, USA) a následně statisticky analyzovány. Původně zamýšlený rozsah souboru byl 150 pacientů. Pacienti byli rozděleni do infekčních a aseptických skupin podle diagnostických kritérií referenčního standardu (Mezinárodní konsenzus, Philadelphia, 2013). Rozdělení pacientů do infekčních, resp. aseptických skupin provedl opět autor disertační práce, který se nepodílel na diagnostice ani rozhodování o léčbě pacientů. Součástí kritérií infekce kloubní náhrady (referenčního standardu) není IL-6. Během studie neměli mikrobiologové, biochemici ani hematologové přístup ke klinickým záznamům ani k výsledkům histopatologického vyšetření. Srovnáním s referenčním standardem byly vypočítány diagnostické vlastnosti testu sérového IL-6 při diagnostice infekce kloubní náhrady, tedy senzitivita, specifická, přesnost, prediktivní hodnota pozitivního výsledku, prediktivní hodnota negativního výsledku, pozitivní a negativní věrohodnostní poměr, diagnostický poměr šancí a

jejich intervaly spolehlivosti. Rozdělovací hodnota byla stanovena během studie a nebyla přejata z předchozích prací. Matematický postup a software byl stejný jako v kapitole 3.1.1.

Odběr vzorků. Stejný postup jako v kapitole 3.1.1.

Histologie. Stejný postup jako v kapitole 3.1.1.

Kultivace. Stejný postup jako v kapitole 3.1.1.

Cytologická analýza. Stejná jako v kapitole 3.1.1.

Biochemická analýza. Zkoumaným testem byl tentokrát sérový interleukin (IL-6). Jeho stanovení bylo provedeno pomocí modulárního analyzátoru Cobas8000 (Roche/Hitachi).

3.2.2. Výsledky

Nejčastější původci. Nejčastějšími původci ve sledovaném souboru byli *Staphylococcus aureus* a koaguláza-negativní stafylokoky, kteří se dělili rovným dílem o první místo. Dalšími častými původci byly hemolytické streptokoky. 18,3 % případů potvrzených infekcí kloubních náhrad mělo negativní kultivační nález a pouze 3,2 % kultivačních nálezů prokázalo více než jednoho bakteriálního původce. Detaily dokládá tabulka 3.15.

Původce	Počet případů	Podíl zastoupení
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	24,7 %
Koaguláza-negativní stafylokoky	23	24,7 %
Hemolytické streptokoky	13	14,0 %
Anhemolytické a viridující streptokoky	3	3,2 %
Gramnegativní tyčky z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	6	6,5 %
Pseudomonády a další nefermentující gramnegativní tyčky	1	1,1 %
Enterokoky	2	2,2 %
Ostatní	2	2,2 %
Polymikrobiální nálezy	3	3,2 %
Negativní kultivace	17	18,3 %
Celkem	93	100,0 %

Tabulka 3.14: Četnost jednotlivých původců izolovaných z peroperačních vzorků tkání a výpotků.

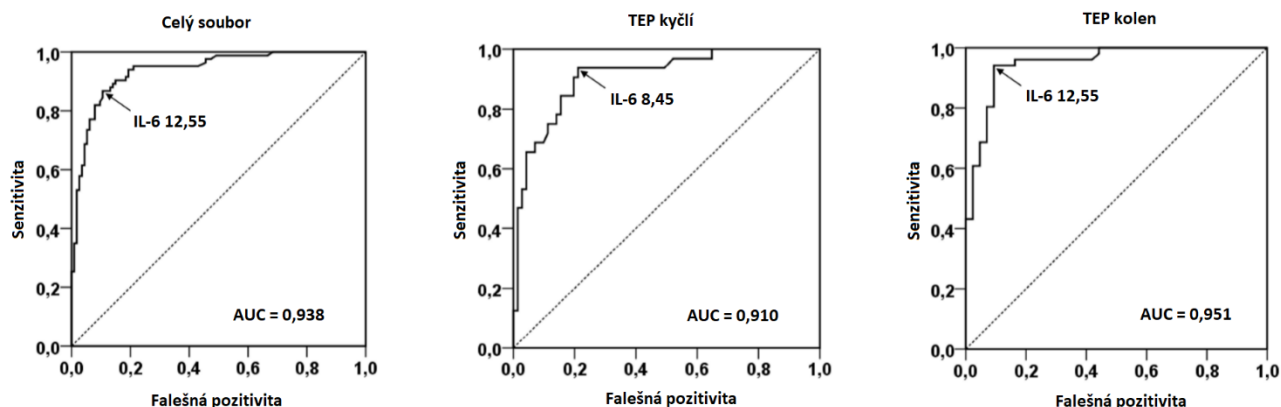
Klasifikace infekcí. Nejčastějším typem infekce ve zkoumaném souboru byla hematogenní infekce kloubní náhrady. Na druhém místě opožděná infekce, na třetím místě akutní pooperační infekce. Podrobný rozpis podle typů infekcí přináší tabulka 3.15.

Hladina sérového interleukinu 6 vycházela významně vyšší u pacientů s infekcí kloubní náhrady (medián 48 ng/l, rozsah 4,0 – 17 673 ng/l) než u pacientů s aseptickým selháním implantátu (medián 5,0 ng/l, rozsah 2,0 – 130 ng/l). Pravděpodobnost totožnosti obou skupin p je menší než 0,0001. Výsledek je tedy statisticky významný. Plocha pod ROC křivkou byla určena jako 0,938 (95% interval spolehlivosti 0,904 – 0,971). Pomocí Youdenova indexu J byla jako optimální rozdělovací hodnota sérového IL-6 stanovena hladina 12,55 ng/l. Při analýze oddělené skupiny pacientů se selháním TEP kyčle vycházela rozdělovací hodnota na 8,45 ng/l, u skupiny kolen 12,55 ng/l (graf 3.4).

Typ infekce	Počet případů	Podíl zastoupení
1. Časná pooperační	20	21,5 %
2. Opožděná	25	26,9 %
3. Hematogenní	28	30,1 %
4. Pozitivní peroperační kultivace	3	3,2 %
5. Recidiva	1	1,1 %
6. Reinfekce	4	4,3 %
7. Přímý přestup infekce z okolí	12	12,9 %
Celkem	93	100,0 %

Tabulka 3.15: Podíl zastoupení jednotlivých typů infekcí kloubních náhrad.

Ve studii byli ponecháni pacienti se systémovým zánětlivým onemocněním. Tito pacienti se ve většině sledovaných parametrů nelišili od pacientů bez systémového zánětlivého onemocnění. Infikovaní revmatikové měli vyšší sedimentaci erytrocytů (medián 98 mm za hodinu oproti 60 mm/h u nerevmatiků s infekcí kloubní náhrady) a sérový IL-6 (medián 568,3 ng/l oproti 45,2 ng/l u nerevmatiků s IKN). Bylo třeba položit si otázku, jak moc jejich přítomnost ve studii zkresluje celkové výsledky. Proto byla stejná statistická analýza provedena znovu po vyloučení těchto pacientů. Rozdělující hodnoty potom byly stanoveny stejně: 12,55 ng/l pro celý soubor, 8,45 ng/l pro izolované TEP kyčlí a 12,55 ng/l pro izolované TEP kolen. Koincidence systémového zánětlivého onemocnění tedy nezakládá důvod pro použití jiných rozdělujících hodnot sérového IL-6 v diagnostice IKN.



Graf 3.4: ROC křivky pro sérový IL-6. První je odvozena z celého souboru pacientů, druhá pouze ze skupiny TEP kyčlí, třetí pouze ze skupiny TEP kolen.

Dalším potenciálním zdrojem zkreslení byli pacienti s antibiotickou léčbou nasazenou před odběrem vzorků k analýze. Potřetí byla tedy provedena stejná statistická analýza po vyloučení pacientů s antibiotikou nasazenými před odběrem vzorků. Nyní byla rozdělující hodnota IL-6 pro celý soubor určena jako 10,4 ng/l, pro TEP kyčlí 8,45 ng/l, a 12,85 ng/l pro TEP kolen. Odchytky tedy nejsou výrazné. I u pacientů s nasazenými antibiotiky můžeme používat stejné rozdělující hodnoty IL-6 jako u pacientů bez antibiotik.

	IL-6 pozitivní	IL-6 negativní	Součet
IKN	72	11	83
Aseptická revize	12	102	114
Součet	84	113	197

Tabulka 3.16: Kontingenční tabulka srovnávající pozitivitu a negativitu sérového IL-6 ve vztahu k pozitivitě a negativitě kritérií Mezinárodního konsenzu 2013. IKN = infekce kloubní náhrady, IL-6 = interleukin 6.

Diagnostické vlastnosti sérového IL-6. Podle referenčního standardu, kritérií Mezinárodního konsenzu z roku 2013, bylo diagnostikováno 83 pacientů s infekcí kloubní náhrady, z toho 72 pacientů mělo hladinu IL-6 vyšší než rozdělovací hodnotu 12,55 ng/l, zbylých 11 mělo negativní hodnotu. Podle referenčního standardu, kritérií Mezinárodního konsenzu z roku 2013, bylo diagnostikováno 114 pacientů aseptických. 102 z nich měli též negativní hodnotu sérového IL-6, 12 z nich mělo hodnotu sérového IL-6 falešně pozitivní. Podle kontingenční tabulky (Tab. 3.16) byly vypočítány diagnostické vlastnosti sérového IL-6 – senzitivita, specificita, prediktivní hodnoty pozitivního i negativního výsledku, pozitivní a negativní věrohodnostní poměr a diagnostický poměr šancí. Tyto hodnoty shrnuje tabulka 3.17. Sérový interleukin 6 je viditelně lepším diagnostickým nástrojem v případě diagnostiky infekce TEP kolena. V případě TEP kyčle jsou jeho diagnostické vlastnosti horší. Pozitivní věrohodnostní poměr pro celý soubor vyšel 8,24, negativní věrohodnostní poměr potom 0,15.

IL-6	Všechny TEP		TEP kyčlí		TEP kolena	
	Hranice 12,55 ng/l		Hranice 8,45 ng/l		Hranice 12,55 ng/l	
		95% CI		95% CI		95% CI
Senzitivita	86,7 %	77,5 – 93,2 %	93,7 %	79,2 – 99,2 %	94,1 %	83,7 – 98,8 %
Specificita	89,5 %	82,3 – 94,4 %	78,9 %	67,6 – 87,7 %	90,7 %	77,9 – 97,4 %
PPV	85,7 %	77,7 – 91,2 %	66,7 %	55,8 – 75,9 %	92,3 %	82,5 – 96,8 %
NPV	90,3 %	84,2 – 94,2 %	96,6 %	87,9 – 99,1 %	92,9 %	81,2 – 97,5 %
LR+	8,24	4,79 – 14,17	4,44	2,81 – 7,02	10,120	3,97 – 25,8
LR-	0,15	0,09 – 0,26	0,079	0,021 – 0,305	0,065	0,022 – 0,195
DOR	55,6	23,3 – 133,1	56,0	12 – 261	156,0	33 – 739

Tabulka 3.17: Diagnostické vlastnosti sérového interleukinu 6. TEP = totální endoprotéza, CI = interval spolehlivosti, PPV = prediktivní hodnota pozitivního výsledku, NPV = prediktivní hodnota negativního výsledku, LR+ = pozitivní věrohodnostní poměr, LR- = negativní věrohodnostní poměr, DOR = diagnostický poměr šancí

3.3. Přínos stanovení synoviálních biochemických markerů k diagnostice IKN

Kloubní výpotek je v přímém kontaktu s bakteriálními buňkami a se synovií a pohybují se v něm imunitní buňky hostitele. Všechny tyto buňky musí zákonitě ovlivňovat biochemické složení kloubního výpotku. Molekuly charakteristické pro přítomnost bakterií v kloubním prostoru se nazývají biomarkery. V posledních letech běží intenzivní výzkum zaměřený na hledání co nejpřesnějších biomarkerů infekce kloubní náhrady. Diagnosticky nejpřínosnější jsou tyto markery [7][64]:

1. Látky produkované imunitními buňkami, které působí proti bakteriím
 - lipokalin asociovaný s želatinázou neutrofilů (NGAL)
 - α -defensiny 1-3, β -defensiny 2 a 3
 - C-reaktivní protein (CRP)
 - laktoferin
 - baktericidní a permeabilitu zvyšující protein (BPI)
 - katelicidin LL-37
 - kalprotektin
2. růstové faktory
 - vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF)
3. cytokiny
 - interleukiny: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17
 - faktor stimulující granulocytové kolonie (G-CSF)
4. substráty a produkty metabolismu
 - glukóza
 - laktát
5. enzymy
 - laktát-dehydrogenáza
 - neutrofilní elastáza
 - adenosindeamináza (ADA)
 - α 2 makroglobulin

Alfa-defensin je složka vrozené imunity, jeden z mnoha antimikrobiálních peptidů, který secernují do kloubního výpotku lokální neutrofilové buňky v reakci na přítomnost bakterií, nezávisle na typu nebo virulenci bakterie. V diagnostice se používá jako biomarker zánětu, který je vysoce senzitivní i specifický pro infekci kloubní náhrady. Metody jeho stanovení jsou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) nebo rychlý imunotest na bázi laterálního proudění. ELISA v metaanalýze obstála jako 95% senzitivní a 97% specifická metoda určení infekce kloubní náhrady. Rychlý imunotest používá operátor u nejasných případů přímo na operačním sále. Jeho senzitivita je nižší, pouze 85 % a specifická vychází jen 90 % [205]. ELISA dává falešně negativní výsledky v případě infekce nízkou virulentním kmenem [70]. Alfa-defensin vykazuje ovšem i falešnou pozitivitu při metalóze [287].

C-reaktivní protein je reaktant akutní fáze produkovaný v játrech. Elevaci jeho sérových hodnot sledujeme při infekci, zánětlivých onemocněních a malignitách. CRP lze měřit nejen v séru, ale i v synoviální tekutině, kde vykazuje vyšší senzitivitu i specifitu pro IKN. Různé studie stanovují rozdílné rozdělovací hodnoty pro synoviální CRP. Pohybují se v rozmezí 3,6 – 10,0 mg/l. Rozdělovací hodnota 7,0 mg/l má vyšší senzitivitu a srovnatelnou specifitu jako rozdělovací hodnota 10,0 mg/l [70]. Mezinárodní konsenzus 2018 doporučuje rozdělovací hodnotu 6,9 mg/l. Po uveřejnění většího počtu diagnostických studií se bude doporučovaná rozdělovací hodnota pravděpodobně upravovat. Senzitivita synoviálního CRP se pohybuje dle různých autorů v rozmezí 85 – 87,5 %, specifita má větší rozptyl: 71 – 98 %.

Lipokalin asociovaný s želatinázou neutrofilů (NGAL, lipokalin 2) je stejně jako α -defensin jedním z vrozených mechanismů antibakteriální imunity. V přítomnosti bakterií jsou aktivovány toll-like receptory na povrchu imunitních buněk a neutrofilů jsou stimulovány k sekreci NGAL. NGAL interferuje s příjmem železa bakteriální buňkou pomocí vazby na bakteriální siderofory, čímž výrazně omezuje růst bakterií, protože bakterie k růstu železo potřebují [93]. Nárůst koncentrace NGAL v synoviální tekutině je vysoce senzitivní i specifický marker infekčního zánětu.

Glukóza je základní substrát metabolismu lidských buněk i bakterií. V kloubním prostoru je spotřebována buňkami synovie a v případě infekčního zánětu též bakteriemi a imunitními buňkami. Její pokles v kloubní tekutině indikuje infekční zánětlivý proces.

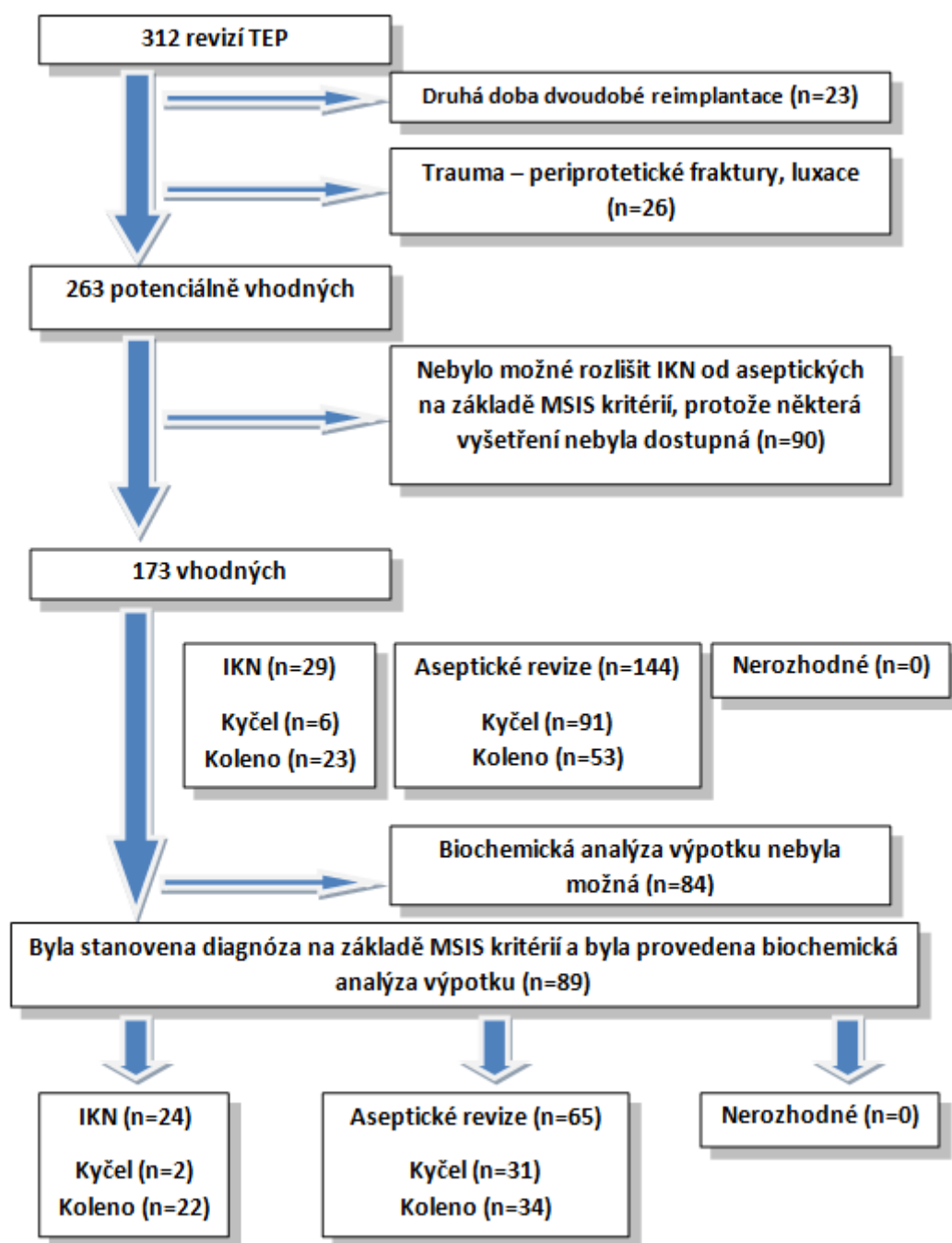
Laktát vzniká anaerobním metabolismem glukózy ve tkáních se zvýšenou energetickou spotřebou. Pokud vznikne, jedinou cestou jeho přeměny je jeho rekonverze zpět na pyruvát aerobní cestou. Laktát difunduje z buněk, ve kterých vznikl, a krevní cestou se dostává do jater, kde je metabolizován na glukózu a glykogen [35]. V případě infekčního postižení kloubu koncentrace laktátu v kloubní tekutině roste.

Synoviální biomarkery prokázaly v několika nedávných studiích velmi vysokou přesnost v diagnostice IKN, která by mohla přispět ke zjednodušení diagnostického algoritmu, v krajním případě k redukci na pouhý jediný biochemický test. Tato kapitola prezentuje výsledky diagnostické studie zaměřené na stanovení diagnostických vlastností synoviálních biomarkerů při diagnostice infekce kloubní náhrady. Cílem studie bylo potvrdit nebo zpochybnit vynikající přesnost některých biochemických markerů IKN a přispět původními daty do případné budoucí metaanalýzy. Výsledky byly publikované částečně v práci „Serum IL-6 in combination with synovial IL-6 / CRP shows excellent diagnostic power to detect hip and knee prosthetic joint infection“ [359] a hlavně v článku „Stanovení hladiny glukózy, laktátu, NGAL a KEB výpotku u infekcí TEP kyčlí a kolen“ [289]. Doktorand přispěl rešerší literatury, podílel se na designu studie, náboru pacientů a sepisování informovaných souhlasů. Dále pracoval na sběru klinických i laboratorních dat a interpretaci výsledků, roztřídil pacienty do infekčních a kontrolních skupin, vytvořil tabulky a schémata a částečně spolupracoval na textu rukopisu. V případě druhého článku byl prvním autorem.

3.3.1. Materiál a metody

Výběr pacientů. Studie pracuje se vzorky 312 po sobě jdoucích pacientů, kteří podstoupili na Ortopedické klinice FNOL a UPOL revizní operaci TEP kolena nebo kyčle v období od dubna 2014 do června 2017. Soubor pacientů se částečně překrývá se soubory z kapitol 3.1 a 3.2. Biochemické parametry kloubního punktátu se na pracovišti autorů začaly rutinně vyšetřovat v dubnu 2014. Do studie byli zahrnuti i pacienti s revmatoidní artritidou, dnou, psoriázou i jinými systémovými zánětlivými onemocněními. U některých parametrů potom byli tito pacienti hodnoceni zvláště. 14 pacientů s antibiotickou léčbou nasazenou již před odběrem vzorků k analýze i pacienti, kteří podstoupili implantaci kloubní náhrady v období 6 týdnů před revizí, byli v souboru rovněž ponecháni. Průměrná délka ATB terapie byla 17,8 dne, rozsah 1-141 dní. Důvodem byla prodloužená profylaxe u rizikových pacientů nebo včasné podání ATB u septických pacientů s ohrožením životních funkcí. Pro vyloučení duplicitního sledování téhož pacienta byly ze souboru vyřazeny druhé doby dvoudobých reimplantací. Revize z traumatických indikací (periprotetické fraktury, luxace) nebyly do souboru zařazeny, protože se vymykají sledované problematice. Ke statistické analýze byly odeslány údaje 89 pacientů, z toho 24 s diagnózou infekce kloubní náhrady a 65 s diagnózou aseptického selhání TEP (graf

3.5). Všechny infekční i aseptické revizní operace proběhly za standardních podmínek a s písemným informovaným souhlasem pacienta. Studie byly schváleny etickou komisí.



Graf 3.5: Vývojový diagram zobrazující distribuci pacientů do skupin infekčních a aseptických revízi kyčlí a kolen.

Definice infekce kloubní náhrady. Pacienti byli rozděleni do infekčních a neinfekčních skupin na základě diagnózy, která byla stanovena pomocí referenčního standardu. Jako referenční standard byl použit soubor diagnostických kritérií Mezinárodního konsenzu ve Philadelphii z roku 2013 [241].

Klasifikace infekce kloubní náhrady. Pro účely této studie jsme použili modifikovanou klasifikaci infekce kloubní náhrady Trampuze a Zimmerliho (kapitola 1.4.5) a původní klasifikaci

celkového stavu pacienta a lokálního stavu končetiny McPhersona (kapitola 1.4.4) stejně jako v předchozí studii.

Odběr vzorků. Stejný postup jako v kapitolách 3.1.1. a 3.2.1.

Histologie. Stejný postup jako v kapitolách 3.1.1. a 3.2.1.

Kultivace. Stejný postup jako v kapitolách 3.1.1. a 3.2.1.

Cytologická analýza. Stejná jako v kapitole 3.1.1. a 3.2.1.

Biochemická analýza. Zkoumanými testy jsou nyní tyto synoviální biochemické markery infekce kloubní náhrady: hladina C-reaktivního proteinu ve výpotku (sCRP), hladina interleukinu 6 ve výpotku (sIL-6), hladina lipokalinu asociovaného s želatinázou neutrofilů ve výpotku (sNGAL), hladiny glukózy a laktátu ve výpotku a koeficient energetické bilance výpotku (KEB).

Hladiny glukózy, laktátu, CRP, IL-6 a NGAL v kloubním punktátu byly stanoveny na modulárním analytickém systému Cobas 8000 (výrobce Roche/Hitachi). Glukóza a laktát byly stanoveny fotometricky na spektrofotometrickém modulu c702. Pro glukózu byla použita referenční enzymatická metoda s hexokinázou. Laktát byl stanoven také enzymaticky, principem stanovení je oxidace laktátu na pyruvát specifickým enzymem laktát-oxidázou a následné změření nárůstu absorbance. CRP a NGAL byly stanoveny imunoturbidimetricky na modulu c502. Interleukin-6 byl stanoven metodou elektrochemiluminiscenční imunoeseje na imunochemickém modulu e602.

Koeficient energetické bilance je výpočtový parametr určený z hodnoty koncentrace glukózy a laktátu v punktátu dle vzorce:

$$\text{KEB} = 38 - 18 \times \frac{[\text{laktát}]}{[\text{glukóza}]}$$

Design studie. Studie byla navržena jako prospektivní. Pacientům, kteří byli na základě výběrových kritérií zařazeni do studie, byly odebrány krevní a peroperační vzorky a další údaje nutné k analýze. Ty byly pravidelně zapisovány do elektronických tabulek (Microsoft Excel, Microsoft Corp., WA, USA) a statisticky hodnoceny. Původně zamýšlený rozsah souboru byl 80 – 100 pacientů. Autor disertační práce rozdělil pacienty do infekčních a aseptických skupin na základě referenčního diagnostického standardu, tedy souboru diagnostických kritérií Mezinárodního konsenzu z roku 2013. Každý pacient byl přidělen do infekční nebo aseptické skupiny – nepřipouštěly se nerozhodné výsledky. V případě chybějících dat a nemožnosti přiřazení pacienta do skupiny na základě kritérií Mezinárodního konsenzu 2013 byl pacient vyřazen ze studie (graf 3.5). Autor disertační práce nerozhodoval o léčbě pacientů ani se nepodílel na diagnostice nebo odběru vzorků v době klinického sledování. Sledované diagnostické testy, tedy synoviální hladiny CRP, IL-6, glukózy, laktátu, NGAL ani KEB, nebyly součástí algoritmu pro rozdělení pacientů do infekčních, resp. aseptických skupin. Tyto parametry nebyly v době rozdělování pacientů do skupin autorovi disertační práce známy. Během studie neměli mikrobiologové, biochemici ani hematologové přístup ke klinickým záznamům ani k výsledkům histopatologického vyšetření, ani nevěděli, zda je konkrétní pacient zařazen do infekční nebo aseptické skupiny. Rozdělovací hodnoty sledovaných testů nebyly přežaty z předchozích studií, ale určeny ROC analýzou. Srovnáním s referenčním standardem byly určeny diagnostické vlastnosti sledovaných testů při diagnostice infekce kloubní náhrady, tedy senzitivita, specifita, přesnost, prediktivní hodnota pozitivního výsledku, prediktivní hodnota negativního výsledku, pozitivní a negativní věrohodnostní poměr, diagnostický poměr šancí a jejich intervaly spolehlivosti. Matematický postup a software byl stejný jako v kapitolách 3.1.1 a 3.2.1.

Vždy byla snaha, aby vzorky nutné k rozdělení pacientů do skupin podle referenčního standardu a vzorky k analýze sledovaných parametrů byly odebrány v co nejkratším intervalu, nejlépe v tentýž den. U chronicky probíhajících infekcí a aseptických selhání však mezi stanovením diagnózy a

operací uběhlo až několik měsíců. Těmto pacientům byly odebrány vzorky znovu při příjmu k operaci nebo peroperačně. V případě nedostatečného množství výpotku v den operace byly použity poslední dostupné výsledky analýzy kloubního punktátu odebraného ambulantně. Všechny výsledky potřebné pro účely studie byly dodány do 14 dnů po operaci. Poslední byly doručovány výsledky histologické analýzy.

	Všechny revize (n=89)		TEP kyčlí (n=33)		TEP kolen (n=56)	
	IKN (n=24)	Aseptické (n=65)	IKN (n=2)	Aseptické (n=31)	IKN (n=22)	Aseptické (n=34)
Pohlaví M / Ž	16 / 8	29 / 36	1 / 1	8 / 23	15 / 7	21 / 13
Věk v době revize	71 59 - 87	69 44 - 85	77 70 - 85	69 44 - 78	71 59 - 87	69 50 - 84
BMI	32,12 20,83 - 48,89	29,48 19,53 - 40,90	31,10 26,22 - 35,99	27,34 19,53 - 38,93	32,12 20,83 - 48,89	31,26 22,31 - 40,90
Primární/sekundární OA	19 / 5	34 / 31	2 / 0	11 / 20	17 / 5	23 / 11
Stabilní / nestabilní	16 / 8	30 / 35	1 / 1	9 / 22	15 / 7	21 / 13
Přežití protézy [měsíce]	20 0,3 - 149	124 1,4 - 311	17 0,3 - 34	185 7 - 311	20 0,3 - 149	47 1,4 - 242
CRP v séru [mg/l]	109 2,8 - 435	3,0 0,3 - 30	38 2,8 - 74	1,8 0,3 - 30	136 17 - 435	3,2 0,6 - 16
Sedimentace erytrocytů [mm/h]	60 24 - 120	17 4 - 94	42 30 - 54	17 4 - 62	61 24 - 120	17,5 4 - 94
Leukocyty [buňky/1 μl výpotku]	52 110 6390 - 295 890	1000 30 - 5720	36 660 36 660 - 36 660	1130 240 - 23 120	57 450 6390 - 295 890	800 30 - 5720
% PMN	93 % 42 - 97 %	50 % 6 - 92 %	96 % 96 - 96 %	53 % 12 - 92 %	93 % 42 % - 97 %	44 % 6 - 74 %
Pozitivní histologie	23 95,8 %	2 3,1 %	2 100,0 %	2 6,5 %	21 95,5 %	0 0,0 %
Pozitivní kultivace	23 95,8 %	17 26,2 %	2 100,0 %	10 32,3 %	21 95,5 %	7 20,6 %

Tabulka 3.18: Charakteristika pacientů v infekčních a aseptických skupinách. M = muž, Ž = žena, BMI = index tělesné hmotnosti, stabilní = obě komponenty pevně drží v kosti, nestabilní = alespoň jedna komponenta je uvolněná, CRP = C-reaktivní protein, PMN = polymorfonukleární neutrofil, IKN = infekce kloubní náhrady, TEP = totální endoprotéza, OA = osteoartróza, %PMN = Podíl PMN v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku. Hodnoty jsou udány jako medián a rozsah nejnižší a nejvyšší naměřené hodnoty nebo jako podíl pozitivních výsledků na celkovém počtu výsledků ve skupině

3.3.2. Výsledky

Infekční a aseptické skupiny se statisticky významně lišily ve všech sledovaných parametrech. Hladina glukózy byla v infekčních výpotcích nižší než v aseptických výpotcích, naopak hladina laktátu byla u infekčních výpotků výrazně vyšší. Z toho vyplývá i rozdíl v koeficientu energetické bilance (KEB), který u infekčních výpotků klesal hluboko do záporných hodnot. I další biochemické markery infekce, sCRP, sIL-6 a NGAL, byly výrazně vyšší u infekčních výpotků než u výpotků aseptických. Mediány a krajní hodnoty přináší tabulka 3.19.

Marker	Všechny revize			TEP kyčlí			TEP kolen		
	IKN	Aseptické	<i>p</i>	IKN	Aseptické	<i>p</i>	IKN	Aseptické	<i>p</i>
Glukóza [mmol/l]	2,1 0,1 – 7,9	3,7 0,9 – 13,3	<0,0001	5,0 2,0 – 7,9	3,3 0,9 – 7,5	0,029	2,1 0,1 – 5,1	4,4 1,7 – 13,3	<0,0001
Laktát [mmol/l]	10,0 3,0 – 27,0	5,3 3,0 – 10,4	<0,0001	10,3 9,6 – 10,9	5,3 3,3 – 10,4	0,001	10,0 3,0 – 27,0	5,2 3,0 – 9,6	<0,0001
KEB	-131,6 -4815 až +23	+15,8 -136 až +31	<0,0001	-17,5 -48 až +13	10,4 -136 až 25	0,031	-237,0 -4814 až +23	18,8 -35 až 31	<0,0001
CRP [mg/l]	33,7 1,1 – 113,7	0,9 0,1 – 8,3	<0,0001	13,6 1,7 – 25,4	0,7 0,2 – 6,8	0,002	35,0 1,1 – 113,7	1,1 0,1 – 8,3	<0,0001
IL-6 [ng/l]	38 217 295 – 50 000	565 6,9 – 24 839	<0,0001	44 950 39901 – 50 000	801 156 – 24 839	0,004	30 736 295 – 50 000	467 6,9 – 4738	<0,0001
NGAL [μg/l]	3446 1390 – 32 998	102 5,4 – 606	<0,0001	3697	93,1 5,4 – 605	---	3334 1390 – 32 998	110 42,8 – 196	---

Tabulka 3.19: Výsledky biochemických vyšetření pacientů z infekčních a aseptických skupin. TEP = totální endoprotéza, IKN = infekce kloubní náhrady, *p* = statistická pravděpodobnost, že se obě skupiny v daném ukazateli neliší, KEB = koeficient energetické bilance, CRP = C-reaktivní protein, IL-6 = Interleukin 6, NGAL = lipokalin asociovaný s želatinázou neutrofilů. Hodnoty jsou udány jako medián a rozsah nejnižší a nejvyšší naměřené hodnoty.

Glukóza ve výpotku. Hladina glukózy v kloubním punktátu byla významně nižší u infikovaných protetických kloubů (medián 2,1; rozsah 0,1 – 7,9 mmol/l) než u aseptických kontrol (medián 3,7; rozsah 0,9 – 13,3 mmol/l). Pravděpodobnost *p*, že se infekční a aseptická skupina shodují v parametru synoviální glukózy, je menší než 0,0001. ROC analýza stanovila jako optimální rozdělovací hodnotu 2,6 mmol/l. Plocha pod ROC křivkou je 0,811 (95% interval spolehlivosti 0,697 – 0,926). Tabulka 3.20.

Při analýze oddělených skupin TEP kyčlí a TEP kolen vyšla rozdělovací hodnota 2,25 mmol/l pro kyčle a 3,00 mmol/l pro kolena.

Glukóza v punktátu	Test pozitivní (hladina menší nebo rovna 2,6 mmol/l)	Test negativní (hladina větší než 2,6 mmol/l)	Celkem
AUC = 0,811			
IKN	18	6	24
Aseptické revize	11	54	65
Celkem	29	60	89

Tabulka 3.20: Kontingenční tabulka pro diagnostický test glukózy v kloubním punktátu. AUC = plocha pod křivkou, IKN = infekce kloubních náhrad

Laktát ve výpotku. V kloubních punktátech pacientů ze skupin infekcí kloubních náhrad byly opakovaně stanoveny výrazně vyšší koncentrace kyseliny mléčné (medián 10,01; rozsah 2,95 – 26,96 mmol/l) než v kloubních punktátech pacientů s aseptickým selháním implantátu (medián 5,27; rozsah 2,97 – 10,38 mmol/l; $p < 0,0001$). Plocha pod ROC křivkou vyšla 0,861 (95% CI 0,761 – 0,960). Jako optimální rozdělovací hodnota byla určena hladina 8,87 mmol/l. Tabulka 3.21.

Rozdělovací hodnota byla stanovena na 9,14 mmol/l, když byl pro statistickou analýzu použit pouze podsoubor TEP kyčlí, a 7,64 mmol/l při oddělené analýze TEP kolen.

Laktát v punktátu	Test pozitivní (hladina větší nebo rovna 8,87 mmol/l)	Test negativní (hladina menší než 8,87 mmol/l)	Celkem
AUC = 0,861			
IKN	17	7	24
Aseptické revize	3	62	65
Celkem	20	69	89

Tabulka 3.21: Kontingenční tabulka pro diagnostický test laktátu v kloubním punktátu. AUC = plocha pod křivkou, IKN = infekce kloubních náhrad

Koeficient energetické bilance (KEB) je výpočtový parametr, který se odvíjí od hladin glukózy a laktátu ve výpotku. U infekcí kloubních náhrad vychází výrazně nižší (medián -131,6; rozsah -4814,8 až +23,3) než u aseptických kontrol (medián +15,8; rozsah -136,2 až +31,0; $p < 0,0001$). ROC analýza stanovila jako optimální rozdělovací hodnotu +4,7. Plocha pod křivkou byla 0,867 (95% CI 0,777 – 0,957). Tabulka 3.22.

Při oddělené analýze dat ze souboru TEP kyčlí byla stanovena rozdělovací hodnota -38,4, u TEP kolen potom +10,4.

KEB	Test pozitivní (KEB menší nebo roven +4,7)	Test negativní (KEB větší než +4,7)	Celkem
AUC = 0,867			
IKN	22	2	24
Aseptické revize	19	46	65
Celkem	41	48	89

Tabulka 3.22: Kontingenční tabulka pro koeficient energetické bilance (KEB) kloubního punktátu. AUC = plocha pod křivkou, IKN = infekce kloubních náhrad

C-reaktivní protein ve výpotku. Vzorky výpotku pacientů z infekčních skupin vykazovaly výrazně vyšší hodnoty sCRP (medián 33,2; rozsah 1,1 – 113,7 mg/l) než vzorky pacientů ze skupin aseptických kontrol (medián 0,9; rozsah 0,1 – 8,3 mg/l; $p < 0,0001$). ROC analýza stanovila rozdělovací hodnotu na 8,80 mg/l a plocha pod ROC křivkou zaujímá 0,974, tedy nejvyšší hodnotu mezi všemi sledovanými parametry (95% CI 0,936 – 1,000). Tabulka 3.23.

Rozdělovací hodnota byla stanovena na 8,80 mg/l, pokud byla zvlášť analyzována data ze skupiny TEP kyčlí, resp. 11,90 mg/l, pokud byly zahrnuty pouze TEP kolen.

CRP v punktátu	Test pozitivní (hladina větší nebo rovna 8,8 mg/l)	Test negativní (hladina menší než 8,8 mg/l)	Celkem
AUC = 0,974			
IKN	21	2	23
Aseptické revize	0	65	65
Celkem	21	67	88

Tabulka 3.23: Kontingenční tabulka pro diagnostický test C-reaktivního proteinu (CRP) v kloubním punktátu. AUC = plocha pod křivkou, IKN = infekce kloubních náhrad

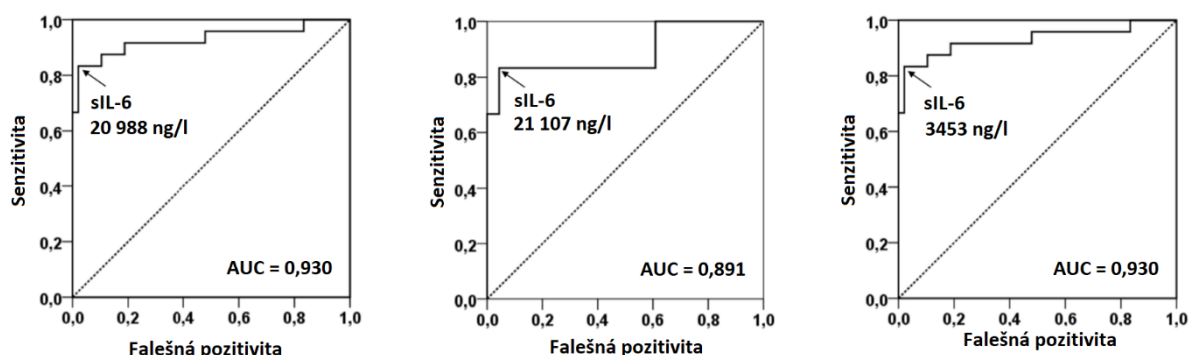
Interleukin 6 ve výpotku. Hladina synoviálního interleukinu 6 (sIL-6) byla významně vyšší u infekčních pacientů (medián 34 477 ng/l; rozsah 295 – více než 50 000) než u pacientů z kontrolních skupin (medián 565 ng/l; rozsah 7,0 – 24 839 ng/l, $p < 0,0001$). U pacientů z infekčních skupin hladina sIL-6 několikrát překročila maximální měřitelnou hodnotu 50 000 ng/l. Plocha pod ROC křivkou vyšla 0,930 (95% CI 0,852 – 1,000). Jako ideální rozdělovací hodnota byla stanovena hladina 20 988 ng/l. Tabulka 3.24. Graf 3.6 zobrazuje ROC křivky interleukinu 6 pro celý soubor a oddělené skupiny TEP kyčlí a TEP kolen.

Rozdělovací hodnoty vyšly 21 107 ng/l a 3453 ng/l, pokud byly analyzovány odděleně TEP kyčlí, resp. TEP kolen. Za pozitivní jsou považovány výsledky rovné nebo vyšší rozdělovací hodnotě.

U jednoho pacienta ze skupiny infikovaných TEP kolen nebylo možné stanovit IL-6 v punktátu, protože bylo aspirováno nedostatečné množství punktátu a nevystačilo na všechny biochemické analýzy. Je to tentýž pacient, u kterého nešlo stanovit CRP v punktátu. U 17 pacientů nebylo možné stanovit IL-6 v punktátu pro vysokou viskozitu punktátu.

IL-6 v punktátu	Test pozitivní (hladina větší nebo rovna 20 988 ng/l)	Test negativní (hladina menší než 20 988 ng/l)	Celkem
AUC = 0,930			
IKN	19	4	23
Aseptické revize	1	47	48
Celkem	20	51	71

Tabulka 3.24: Kontingenční tabulka pro diagnostický test interleukinu 6 v kloubním punktátu. AUC = plocha pod křivkou, IKN = infekce kloubních náhrad



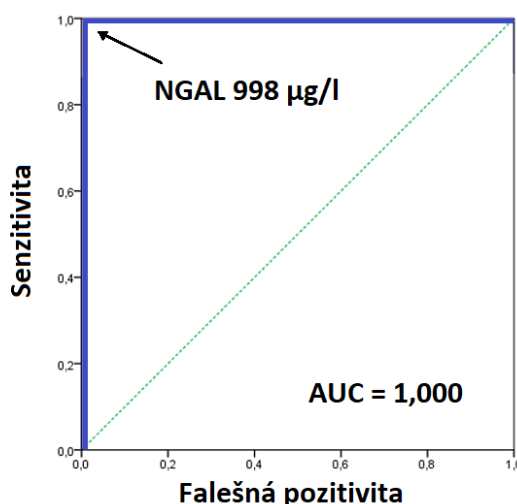
Graf 3.6: ROC křivky pro synoviální interleukin 6 pro celý soubor, pro vyčleněné TEP kyčlí a pro vyčleněné TEP kolen

NGAL ve výpotku. V punktátu z infikovaných protetických kloubů byly detekovány výrazně vyšší hladiny NGAL (medián 3446 $\mu\text{g/l}$; rozsah 1390 – 32 998 $\mu\text{g/l}$) než v punktátu aseptických kontrol (medián 101,8; rozsah 5,4 – 605,9 $\mu\text{g/l}$; $p < 0,0001$). ROC analýza stanovila jako optimální rozdělující hodnotu 998 $\mu\text{g/l}$. Plocha pod křivkou byla 1,000. Tabulka 3.25. ROC křivka je zobrazena na grafu 3.7.

Nebyly analyzovány zvlášť skupiny TEP kyčlí a TEP kolen. 11 pacientů ze skupiny IKN a 47 pacientů ze skupiny aseptických kontrol nemělo NGAL ve výpotku vyšetřený buď pro malý objem aspirovaného materiálu nebo pro vysokou viskozitu punktátu. Ze zbylých pacientů vznikl příliš malý soubor na to, aby výsledky analýzy zvlášť TEP kyčlí a zvlášť TEP kolen byly statisticky signifikantní.

NGAL v punktátu	Test pozitivní (hladina větší nebo rovna 998 $\mu\text{g/l}$)	Test negativní (hladina menší než 998 $\mu\text{g/l}$)	Celkem
AUC = 1,000			
IKN	13	0	13
Aseptické revize	0	18	18
Celkem	13	18	31

Tabulka 3.25: Kontingenční tabulka pro diagnostický test NGAL v kloubním punktátu.



Graf 3.7: ROC křivka pro synoviální NGAL. Na našem malém souboru vyšla ROC křivka ideálního diagnostického testu.

Diagnostické vlastnosti synoviálních biochemických markerů. Tabulka 3.26 shrnuje diagnostické vlastnosti biochemických testů kloubního punktátu. Všechny údaje jsou uvedeny včetně 95% intervalu spolehlivosti (95% CI). Za zmínku stojí pozitivní věrohodnostní poměr synoviálního IL-6 40,0 (95% CI 5,7 – 280,5) a jeho negativní věrohodnostní poměr 0,170 (95% CI 0,07 – 0,417). Pozitivní věrohodnostní poměr ani diagnostický poměr šancí synoviálního CRP není možné spočítat, protože na analyzovaném malém souboru u něj vyšla 100% specifita.

Test	Skupina	Senzitivita	Specificita	PPV	NPV	LR+	LR-	DOR
Glukóza	TEP	0,750	0,831	0,621	0,900	4,430	0,301	14,7
	95% CI	0,533 – 0,902	0,717 – 0,912	0,477 – 0,746	0,817 – 0,948	2,47 – 7,96	0,149 – 0,607	4,8 – 45,5
	TEP kyčlí	-	-	-	-	-	-	-
	TEP kolen	0,773	0,853	0,773	0,853	5,250	0,266	19,7
95% CI	0,546 – 0,922	0,689 – 0,951	0,595 – 0,887	0,726 – 0,927	2,27 – 12,18	0,122 – 0,583	5,0 – 78,1	
Laktát	TEP	0,708	0,954	0,850	0,899	15,35	0,306	50,2
	95% CI	0,489 – 0,874	0,871 – 0,990	0,646 – 0,946	0,826 – 0,943	4,93 – 47,73	0,164 – 0,572	11,7 – 215,1
	TEP kyčlí	-	-	-	-	-	-	-
	TEP kolen	0,773	0,912	0,850	0,861	8,76	0,249	35,1
95% CI	0,546 – 0,922	0,763 – 0,981	0,653 – 0,945	0,740 – 0,931	2,9 – 26,4	0,115 – 0,542	7,5 – 165,3	
KEB	TEP	0,917	0,698	0,537	0,957	3,040	0,119	25,5
	95% CI	0,730 – 0,989	0,568 – 0,808	0,438 – 0,632	0,853 – 0,988	2,05 – 4,51	0,031 – 0,454	5,4 – 119,3
	TEP kyčlí	-	-	-	-	-	-	-
	TEP kolen	0,954	0,765	0,724	0,963	4,06	0,059	68,3
95% CI	0,772 – 0,999	0,588 – 0,893	0,587 – 0,829	0,793 – 0,994	2,2 – 7,49	0,009 – 0,407	7,9 – 590	
sCRP	TEP	0,917	1,000	1,000	0,970	-	0,083	-
	95% CI	0,730 – 0,989	0,945 – 1,000		0,896 – 0,992		0,022 – 0,314	
	TEP kyčlí	0,667	1,000	1,000	0,939	-	0,333	-
	95% CI	0,223 – 0,957	0,888 – 1,000		0,833 – 0,979		0,108 – 1,034	
TEP kolen	0,944	1,000	1,000	0,971	-	0,056	-	
95% CI	0,727 – 0,999	0,897 – 1,000		0,835 – 0,996		0,008 – 0,373		
sIL-6	TEP	0,833	0,979	0,952	0,922	40	0,170	235
	95% CI	0,596 – 0,996	0,781 – 0,999	0,645 – 0,991	0,814 – 0,992	5,7 – 280,5	0,07 – 0,417	24,7 – 2236
	TEP kyčlí	0,833	0,956	0,833	0,956	19,17	0,174	110
	95% CI	0,359 – 0,996	0,781 – 0,999	0,416 – 0,972	0,756 – 0,992	2,73 – 134,7	0,029 – 1,045	5,8 – 2074
TEP kolen	0,889	0,960	0,941	0,923	22,2	0,116	192	
95% CI	0,653 – 0,986	0,796 – 0,999	0,699 – 0,991	0,764 – 0,978	3,23 – 152,7	0,031 – 0,429	16 – 2298	
sNGAL	TEP	1,000	1,000	1,000	1,000	-	-	-
	95% CI	0,753 – 1,000	0,815 – 1,000					

Tabulka 3.26: Diagnostické vlastnosti synoviálních biochemických markerů. PPV = prediktivní hodnota pozitivního výsledku, NPV = prediktivní hodnota negativního výsledku, LR+ = pozitivní věrohodnostní poměr, LR- = negativní věrohodnostní poměr, DOR = diagnostický poměr šancí, KEB = koeficient energetické bilance punktátu, sCRP = synoviální C-reaktivní protein, sIL-6 = synoviální interleukin 6, sNGAL = synoviální lipokalin asociovaný s želatinázou neutrofilů, TEP = totální endoproteýza

V další fázi byli ze souboru vyloučeni pacienti se systémovým zánětlivým onemocněním a vypočítány diagnostické vlastnosti vybraných testů pro zbytek souboru. Tyto hodnoty shrnuje tabulka 3.27.

Test	Hranice	Senzitivita	Specifická	LR+	LR-	DOR
sCRP	11,25 mg/l	0,947	1,000	---	0,05	---
sIL-6	21 349 ng/l	0,789	0,977	34,74	0,22	161,3

Tabulka 3.27: Diagnostické vlastnosti synoviálního CRP a synoviálního IL-6 po vyřazení pacientů se systémovým zánětlivým onemocněním ze souboru

Diagnostické vlastnosti kombinovaných testů. Byly testovány i diagnostické vlastnosti kombinací testů při jejich sdružení do dvojic ve smyslu AND a OR. Kombinace testů ve smyslu AND je pozitivní, pokud oba dva testy mají shodně pozitivní výsledek; v ostatních případech je kombinace negativní. Kombinace testů ve smyslu OR je pozitivní, pokud alespoň jeden z testů má pozitivní výsledek. Kombinace ve smyslu OR je negativní, pokud jsou výsledky obou dvou testů negativní. Jako rozdělovací hodnoty kombinovaných testů byly použity ideální rozdělovací hodnoty individuálních testů určené v předchozích krocích. Přehled diagnostických vlastností nejpřesnějších kombinací typu AND i typu OR přináší tabulka 3.28.

Test	Senzitivita	Specifická	PPV	NPV	LR+	LR-	DOR
sCRP AND laktát	0,652 0,427 – 0,836	1,000 0,945 – 1,000	1,000 -	0,890 0,823 – 0,934	- -	0,348 0,199 – 0,609	- -
Leukocyty AND laktát	0,727 0,498 – 0,893	0,984 0,915 – 0,999	0,941 0,692 – 0,991	0,912 0,839 – 0,953	45,8 6,45 – 325,6	0,277 0,14 – 0,549	165,3 18,6 – 1 473
%PMN AND laktát	0,591 0,364 – 0,793	1,000 0,943 – 1,000	1,000 -	0,875 0,809 – 0,920	- -	0,409 0,248 – 0,676	- -
sIL-6 AND laktát	0,565 0,345 – 0,768	1,000 0,926 – 1,000	1,000 -	0,828 0,751 – 0,884	- -	0,435 0,273 – 0,693	- -
Sérový IL-6 AND sCRP	0,737 0,488 – 0,909	1,000 0,912 – 1,000	1,000	0,889 0,790 – 0,944	-	0,263 0,124 – 0,558	-
Sérový IL-6 AND sIL-6	0,444 0,276 – 0,627	1,000 0,969 – 1,000	-	0,889 0,851 – 0,918	-	0,556 0,396 – 0,778	-
Sérový IL-6 OR leukocyty	0,910 0,833 – 0,954	0,887 0,824 – 0,929	0,835 0,761 – 0,889	0,940 0,889 – 0,968	8,020 5,03 – 12,78	0,101 0,052 – 0,197	79,1 32,4 – 193,3

Tabulka 3.28: Diagnostické vlastnosti kombinací synoviálních biochemických markerů. PPV = prediktivní hodnota pozitivního výsledku, NPV = prediktivní hodnota negativního výsledku, LR+ = pozitivní věrohodnostní poměr, LR- = negativní věrohodnostní poměr, DOR = diagnostický poměr šancí, sCRP = synoviální C-reaktivní protein, leukocyty = počet leukocytů ve výpotku, %PMN = podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku, sIL-6 = synoviální interleukin 6, laktát = hladina laktátu ve výpotku, TEP = totální endoprotéza

Sdružování námi zkoumaných testů do dvojic nepřináší zlepšení přesnosti diagnostiky, ani ve smyslu AND, ani ve smyslu OR. V případě kombinace testů ve smyslu AND je sice vyšší specifická než u každého z testů samotného, ale za cenu senzitivity kombinace, která je stejná nebo nižší než senzitivita méně senzitivního ze dvou samotných testů. Pokud kombinujeme testy ve smyslu OR, senzitivita vychází vyšší než u oddělených původních testů, ale specificko snižujeme pod úroveň méně specifického z obou testů. Praktické využití mají kombinace sCRP s laktátem, počet leukocytů s laktátem, podíl PMN s laktátem a sIL-6 s laktátem, které díky své vysoké specifické mohou IKN poměrně spolehlivě potvrdit. Podobně dobře dopadly i kombinace sérového IL-6 se synoviálním IL-6 a sérového IL-6 se synoviálním CRP. Je třeba mít na paměti, že tyto kombinace kvůli nízké senzitivitě nelze použít k vyloučení diagnózy IKN.

4. Diskuse

4.1. Experiment na zvířeti

Experiment na zvířeti je zatím stále neodmyslitelnou součástí výzkumu a spojovacím článkem přenosu *in vitro* dat do preklinické části výzkumu. Součástí experimentu na zvířeti u většiny testovaných léčiv je určení nejvýhodnější cesty podání, dávky a toxicity ještě před uvedením léčiva do preklinického testování. Účinnost antibakteriálních látek *in vitro* není zárukou účinnosti *in vivo*, protože uvnitř živého organismu působí množství faktorů jak ve prospěch přežívání a množení bakterií, tak proti nim. Jen namátkou jmenujme hostitelské neutrofile, imunoproteiny či cirkulaci krve a tkáňového moku. Bakteriím poskytují výhodu nekrotické tkáně, které se stávají cenným zdrojem živin, patologická imunitní reakce, kterou využívá speciálně *Staphylococcus aureus*, a možnost intracelulárního přežívání. Náš model akutní osteomyelitidy vychází z modelu, který publikoval Gahukamble [103]. Tento model je postaven na jednorázové infekční dávce, která simuluje nechtěnou peroperační inokulaci původce do operační rány a následnou akutní časnou pooperační infekci. Naproti tomu přichází v úvahu i model opakované inokulace malou infekční dávkou, který by simuloval hematogenní infekci. Experimentální model se musí co nejvíce přiblížit skutečné situaci, aby bylo možné získané informace aplikovat i v klinické praxi [318]. Už sám fakt, že pokusné zvíře se v mnoha biochemických, fyziologických i imunologických parametrech od člověka liší, vede k nepředvídatelným rozdílům ve schopnosti zvířete odolávat infekci v porovnání s odolností člověka.

Kritickému zhodnocení současné role infekčního modelu na zvířeti se věnují recentní práce Moriartyho a spol. [214]. Vyplývá z nich, že bychom měli dbát na důkladnou přípravu pokusu pomocí studií *in vitro* a pilotní studie, optimálně nastavit časový harmonogram pokusu, a ke stanovení účinnosti testované metody využít histologickou analýzu, sonikaci nebo pokročilé bakteriologické detekční metody (PCR, FISH). Autoři předkládají celou řadu doporučení ke zlepšení kvality pokusů na zvířatech, týkajících se experimentální IKN. V dnešní době je samozřejmostí princip 3R dle Russela a Burche: „**Reduce, Refine, Replace**“ – tedy redukce počtu pokusných zvířat, zdokonalení experimentálního protokolu a nahrazení pokusu na zvířeti pokusem *in vitro* všude tam, kde tímto nahrazením nesnížíme váhu důkazu.

Naše práce neprokázala výrazný protektivní účinek testovaných lipofosfonoxinů na rozvoj infekce *in vivo*. Při snížení infekční dávky se ovšem část zvířat infekci ubránila. Velikost infekční dávky tedy zjevně v patogenezi infekce hraje roli.

Dosud publikované výsledky studií *in vitro* byly velmi slibné. Látka DR5026 výrazně inhibuje růst *Staphylococcus epidermidis* na povrchu kostního cementu již po 3 hodinách, kdy lze pomocí sonikace kvantifikovat bakteriální nálož o 2 řády nižší než na povrchu neošetřeného cementu. Po 24 hodinách inkubace je rozdíl 7 řádů [321]. Podobné účinky mají i další lipofosfonoxiny I. a II. generace. Koncentrace pouhých 6,25 mg/l usmrcují všechny bakterie *Staphylococcus aureus* v planktonické formě po 6 – 24 hodinách. Redukce počtu bakterií je detekovatelná již po 15 minutách kontaktu s LPPO. I po přerušení kontaktu testovaných bakteriálních kmenů s lipofosfonoxinem vychází zpomalená růstová křivka s výrazným oddálením exponenciální fáze růstu [322].

Příčin negativních výsledků může být několik. V první řadě je to semikvantitativní udávání kultivačních výsledků. Ačkoliv intervenční i kontrolní skupiny mají všechny pozitivní kultivační výsledky, mohlo uniknout zjištění, že počet bakterií kolonizujících implantáty ošetřené LPPO a počet bakterií kolonizujících implantáty kontrolních skupin se možná o několik řádů liší. Podle makroskopických nálezů a kultivačních výsledků je pravděpodobné, že LPPO nedosáhly úplné sterilizace tkání u žádného zvířete.

Ve třetí fázi experimentu byla použita nižší infekční dávka než nejnižší dávka zkoušená v pilotní studii. Infekční dávka 10^4 CFU bezesporu musí být dostatečná pro vyvolání infekce související s cizím tělesem. V minulosti byly experimentálně vyvolány stafylokokové infekce po inokulaci 10^2 buněk stafylokoků na šicí materiál [152] nebo na kovový implantát [345]. Recentní systematický přehled uvádí jako infekční dávku nutnou ke spolehlivému vyvolání infekce spojené s osteosyntézou u králíka $6 \cdot 10^6$ CFU [318].

Staphylococcus aureus je pravidelně používán v drtivé většině (až 97,3 %) experimentálních infekcí ortopedických implantátů na zvířatech [318]. Tato rozšířenost v experimentální praxi sice nereprezentuje skutečné zastoupení tohoto původce v klinické praxi, ale nabízí možnost lepšího srovnání výsledků mezi jednotlivými studii. *Staphylococcus aureus* je navíc jednou z nejlépe prostudovaných bakterií a informace zjištěné na pokusech *in vivo* lze tedy snáze interpretovat ve vztahu k výsledkům mnoha studií *in vitro*.

Zkoumaná látka DR7030 i gentamicin jsou pravděpodobně schopné sterilizovat povrch implantátu, ale na sterilizaci celé dřevěné dutiny tibie již nestačí. Při eluci látek z kostního cementu nemůžeme čekat pokrytí celé tibiální dřevěné dutiny (vytvořené iatrogeně) jednak kvůli velkému distribučnímu objemu, jednak následkem ředění účinné látky krví a odplavení účinné látky dynamicky cirkulujícími tělními tekutinami. Pro tuto hypotézu svědčí fakt, že ve třetí fázi byla sonikace explantátu kultivačně negativní vždy, ale kultivace tkání odhalila přežívající bakterie u některých zvířat intervenční skupiny.

Ke zpřesnění modelu do budoucna se nabízejí různé možnosti, např. přesná kvantifikace CFU uvolněných z implantátu pomocí sonikace nebo pozorování bakteriálních kolonií na povrchu explantátu pomocí rastrovací elektronové mikroskopie nebo zkoumání biofilmu pomocí rastrovací laserové konfokální mikroskopie. Inokulace bakteriální suspenze mohla být v současném experimentu nepřesná u některých zvířat, která měla výrazné krvácení do dřevěné dutiny tibie. Krev vytlačila část bakteriální suspenze ven z tibie dříve, než se operačnímu týmu podařilo utěsnit otvor v tibiálním plateau kostním voskem. Použití vasokonstrikčních nebo antifibrinolytických látek nebylo součástí protokolu studie, nicméně v budoucnosti by pro podobný pokus bylo výhodou.

4.2. Přínos cytologické analýzy kloubního punktátu k diagnostice IKN

V naší studii byla stanovena rozdělovací hodnota **3450 leukocytů v 1 μ l výpotku** jako hranice mezi výpotkem pravděpodobně infekčním a výpotkem pravděpodobně aseptickým. Rozdělovací hodnota pro **podíl neutrofilů** v diferenciálním rozpočtu byla určena jako **74,6 %**, pro **podíl lymfocytů 14,6 %**. Výsledky jsou koherentní s výsledky většiny předešlých studií. Přehled jednotlivých rozdělovacích hodnot a jejich diagnostické vlastnosti obsahuje tabulka 4.1.

Synoviální leukocyty jsou v diagnostice IKN mnohem přesnějším ukazatelem než krevní leukocytóza. Krevní leukocyty nevypovídají o tom, co se děje uvnitř sledovaného kloubu. Souvislost mezi leukocytózou a elevací počtu synoviálních leukocytů je slabá (Pearsonův korelační koeficient $R = 0,28$) [349]. Senzitivita krevní leukocytózy pro IKN je 45 % a specifická 87 % [25]. Podobně slabý je i vztah mezi podílem neutrofilů, resp. lymfocytů, v diferenciálním rozpočtu leukocytů v krvi a v punktátu [349]. V diagnostice IKN se proto setkáváme už jen se synoviálními cytologickými parametry.

4.2.1. Výše rozdělovacích hodnot

Stanovení rozdělovací hodnoty, resp. jejích diagnostických vlastností, je matematickou operací, kterou ovlivňují pouze vstupní hodnoty (čtyřpolní kontingenční tabulka). V naší studii byla stanovena vyšší rozdělovací hodnota pro počet leukocytů ve výpotku TEP kyčle než rozdělovací hodnota pro počet leukocytů ve výpotku TEP kolena. K podobnému rozdílu dojdeme, i když srovnáme výsledky některých dalších studií zaměřených na TEP kyčlí [264][272] se studii TEP kolen. Tento jev se dá vysvětlit například tak, že různé klouby „podléhají“ trochu jinému typu zánětu a mají odlišný kryt měkkých tkání, případně tak, že bakterie mají určitou preferenci pro konkrétní klouby. *Staphylococcus aureus*, virulentní původce, se vyskytuje v kyčelních kloubech častěji než v kolenou, a proto jsou celkové počty leukocytů u TEP kyčlí průměrně vyšší než u kyčlí [293]. Schinsky udává rozdělovací hodnotu pro TEP kyčlí 4200 leukocytů/ μ l. Ghanem [116] má rozdělovací hodnotu pro TEP kolen pouze 1100 leukocytů/ μ l výpotku, Trampuz pouze 1700/ μ l [302]. Adekvátně tomu byl původce infekce TEP kyčlí u Schinského v 44 % *S. aureus*, zatímco u TEP kolen Ghanema pouze ve 20 % a u Trampuze ve 24 % případů.

Rozdělovací hodnoty pro počet leukocytů ve výpotku a podíl polymorfonukleárů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku byly stanoveny studii na TEP kolen a kyčlí. Na ostatní klouby ani na unikondylární náhrady kolenních kloubů je plošně použít nelze, protože ostatní klouby nebyly zařazeny do souborů zdrojového výzkumu [22]. V přehledové tabulce 4.1. je jedna studie na unikondylární náhrady kolen a rozdělovací hodnota pro počet leukocytů se opravdu výrazně odchyloje od obvyklých rozdělovacích hodnot pro TEP kolen [265]. Dle dat norského registru kloubních náhrad mají unikompartmentální artroplastiky kolen (UKA) nižší desetileté přežití než TEP kolen (80,1 % oproti 92,0 %), ovšem důvody k revizím jsou vesměs aseptické: progresivní artrózy v jiném kompartmentu, aseptické uvolnění, periprotetická fraktura nebo bolest neznámé příčiny. Infekce UKA je naopak výrazně vzácnější než u TEP; relativní riziko je 0,28 [100]. Nižší výskyt IKN u UKA ve srovnání s TEP je nejspíše způsoben tím, že kloub s UKA nabízí mnohem menší povrch implantátu, na kterém by se mohl tvořit biofilm. V souvislosti s tím je i stanovena rozdělovací hodnota synoviálních leukocytů pro diagnózu IKN výše než u TEP kolen, ale níže než u nativních kolen [265].

Jedna práce se svou rozdělovací hodnotou pro počet leukocytů výrazně vymyká. Spangehl zvolil rozdělovací hodnoty pro synoviální leukocyty 50 000/ μ l a pro podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu výpotku 80 %, protože to v té době byly aktuálně doporučované rozdělovací hodnoty pro diagnózu septické artritidy nativního kloubu [280].

Rozděľující hodnota celkového počtu leukocytů je u protetických kloubů výrazně nižší než u nativních kloubů. To se pravděpodobně odvíjí od skutečnosti, že bakteriální kmeny vyvolávající IKN tvoří biofilmy a jejich strategie přežití je spíše defenzivní [302]. IKN způsobují častěji kmeny méně virulentní, u nativních kloubů jsou častější virulentnější invazivní kmeny, které se rychle množí a tvoří více toxinů a vzbuzují silnější reakci organismu, která se projeví vyšším celkovým synoviálním počtem leukocytů.

4.2.2. Heterogenita studií

Srovnávat zmíněné studie cytologických parametrů synoviální tekutiny je obtížné, protože jednotlivé studie jsou značně heterogenní. Je to dáno nejen odlišnostmi v porovnávaných souborech pacientů, ale také odlišnými definicemi IKN, různými typy infekcí či anatomickou lokalitou. Pravidelně vycházejí **různé výsledky pro kolena a pro kyčle**. Kromě různých rozděľujících hodnot pro TEP kyčlí vychází obecně nižší senzitivita a vyšší specifita testu celkového počtu leukocytů ve výpotku než pro TEP kolen. Podíl neutrofilů ve výpotku je u TEP kolen senzitivnější i specifitější než u TEP kyčlí. Zajímavostí také je, že celkový počet leukocytů ve výpotku má mírně vyšší senzitivitu a nižší specifitu, pokud je stanoven **předoperačně, v porovnání s peroperačními vzorky**. Ostatní zdroje heterogenity zřejmě přispěly k celkové heterogenitě studií jen minimálně. Mezi ostatní zdroje heterogenity patří [376]:

1. Vyloučení pacientů se systémovým zánětlivým onemocněním
2. Vyloučení pacientů užívajících antibiotika v době odbírání vzorků
3. Vyloučení pacientů v časném pooperačním období
4. Velikost souboru
5. Design studie (prospektivní nebo retrospektivní)
6. Pacienti po sobě jdoucí nebo vybraní podle jiného klíče

Schinsky [264], Mason [206] a Spangehl [280] vyloučili ze svých studií pacienty, kteří **užívali antibiotika** v době odběru vzorků. Podání antibiotik před odběrem vzorků jistě ovlivní zánětlivou odpověď organismu na přítomnost bakterií v kloubu, tedy sníží počet leukocytů a podíl neutrofilů v kloubním výpotku. Trampuz tvrdí, že u žádného pacienta s probíhající infekcí kloubní náhrady podání ATB nesrazí počet leukocytů pod jím stanovenou rozděľující hodnotu 1700/μl a nesníží tedy senzitivitu cytologického vyšetření výpotku [302]. Vyloučení nebo nevyloučení pacientů užívajících antibiotika z cytologických diagnostických studií se neukázalo jako zdroj heterogenity studií [376].

Další otázkou je použití zmíněných rozděľujících hodnot pro pacienty se **systémovým zánětlivým onemocněním**. Revmatici byli vyloučeni z většiny studií. Cipriano [45] určila, že při systémovém zánětlivém onemocnění jsou rozděľující hodnoty stejné, ale vychází nižší specifita cytologických testů. Vysvětluje to tím, že i po opakovaných synovektomiích může přetrvávající synovitida imitovat příznaky infekce kloubní náhrady, obzvláště v obdobích exacerbace. Nekontrolované systémové zánětlivé onemocnění elevuje i krevní parametry, takže už samotná punkce protetických kloubů u revmatiků je prováděna na základě falešně pozitivních testů CRP a sedimentace [45].

Mezinárodní konsenzus doporučuje pro pacienty se systémovým zánětlivým onemocněním používat stejné rozděľující hodnoty sedimentace erytrocytů, CRP, leukocytů ve výpotku i %PMN výpotku, jaké byly stanoveny pro pacienty bez systémového zánětlivého onemocnění [350]. Implicitně se ale počítá s tím, že testy budou mít nižší specifitu a v budoucnu bude třeba rozděľující hodnoty ověřit na větších souborech revmatiků.

Autor	Rok	Kloub	Pac.	Leukocyty			%PMN			Zahrnuti			Ref. standard				
				Hranice	Se	Sp	Hranice	Se	Sp	RA	ATB	Poop.	K	M	O	H	
Majors [199]	2019	Kolena	59	1804/ μ l	0,667	0,810	86 %	0,824	0,737		•	•	•	•			
Dinneen [74]	2013	Kyčle i kolena	75	1590/ μ l	0,895	0,913	65 %	0,897	0,866								
		TEP kyčle	27	1425/ μ l			65 %				•				•	•	•
		TEP kolena	48	1715/ μ l			54 %										
Cipriano [45]	2012	Kyčle i kolena	810	3450/ μ l	0,910	0,930	78 %	0,955	0,873								
			61	3444/ μ l	0,882	0,800	75 %	1,000	0,818	•	•		•	•	•	•	
Schwartz [265]	2012	UKA kolena	259	6200/ μ l	0,900	0,965	60 %	0,909	0,938	•	•	•	•	•	•	•	•
Zmistowski [349]	2012	TEP kolena	145	3000/ μ l	0,93	0,94	75 %	0,93	0,83	•	•	•	•	•	•		
Bedair [24]	2011	TEP kolena	146	27 800/ μ l	0,84	0,93	89 %	0,84	0,69			•			•	•	
				10 700/ μ l	0,95	0,91											
Kusuma [171]	2011	TEP kolena	76	1102,5/ μ l	0,75	0,61	71,5 %	0,75	0,66	•	•	•		•	•	•	
Shukla [272]	2010	TEP kyčle	87	3528/ μ l	0,78	0,96	79 %	0,78	0,82	•	•	•		•	•	•	
Lee [176]	2010	TEP kolena	56	3800/ μ l	0,86	0,79	89 %	0,72	0,62		•	•	•	•	•	•	
Schinski [264]	2008	TEP kyčle	201	4200/ μ l	0,84	0,93	80 %	0,84	0,82			•		•	•	•	
Ghanem [116]	2008	TEP kolena	429	1100/ μ l	0,907	0,881	64 %	0,950	0,947		•	•	•	•	•	•	
Ghanem [117]	2008	TEP kolena	128	1760/ μ l	0,945	0,890					•	•	•	•	•		
Nilsdotter [225]	2007	TEP kyčle	54	1700/ μ l	0,86	0,92					•	•	•	•			
Della Valle [67]	2007	TEP kolena	94	3000/ μ l	1,000	0,981	65 %	0,976	0,849	•	•	•		•	•	•	
Parvizi [237]	2006	Kyčle i kolena	168	1760/ μ l	0,90	0,99	73 %	0,93	0,95		•			•	•	•	
Trampuz [302]	2004	Kyčle i kolena	133	1700/ μ l	0,94	0,88	65 %	0,97	0,98		•			•	•	•	•
Mason [206]	2003	TEP kolena	86	2500/ μ l	0,69	0,98	60 %	0,75	0,9	•		•		•			•
Spangehl [280]	1999	TEP kyčle	183	50000/ μ l	0,36	0,99	80 %	0,89	0,85			•		•	•	•	•
Naše studie	2017	Kyčle i kolena	373	3450/ μ l	0,947	0,950	74,6 %	0,931	0,911								
			181	4100/ μ l	0,920	0,968	76,5 %	0,957	0,938	•	•	•	•	•	•	•	
			192	3200/ μ l	0,960	0,959	72,8 %	0,939	0,900								
Qu et al. [376] (metaanalýza)	2014	Kyčle i kolena	2787		0,88	0,93		0,9	0,88								
					0,73	0,96		0,85	0,83								
					0,90	0,91		0,90	0,88								
Konsenzus [243]	2018	Kyčle i kolena		3000/ μ l			80 %										

Tabulka 4.1: Srovnání výsledků naší cytologické studie s výsledky podobných studií, metaanalýzy a s doporučením Mezinárodního konsenzu 2018. Pac. = počet pacientů ve studii, %PMN = podíl polymorfonukleárních neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku, Se = Senzitivita, Sp = Specificita, RA = pacienti s revmatoidní artritidou nebo s jiným systémovým zánětlivým onemocněním, ATB = pacienti léčení antibiotiky v průběhu odběru vzorků, Poop. = pacienti krátce po implantaci, ref. standard = referenční standard, K = klinický nále, prostý snímek a krevní odběry, M = mikrobiologická kultivace, O = operační nále, H = histologický nále

Krátce po implantaci kloubní náhrady přetrvává zánětlivý stav podobně jako po každé operaci. Můžeme očekávat zvýšenou sedimentaci erytrocytů, CRP, leukocytózu, subfebrilie, a dokonce i elevaci synoviálních parametrů. Tento zánětlivý stav neznámá nutně infekci kloubní náhrady, ale vyskytuje se pravidelně více či méně výrazně u všech pacientů. Někteří autoři se rozhodli pacienty v pooperačním

období do svých studií nezahrnout. Dineen [74] vyloučil pacienty do 3 týdnů po implantaci, Cipriano [45] vyřadila pacienty v tříměsíčním pooperačním období a Parvizi [237] a Trampuz [302] toto období rozšířili až na 6 měsíců. Stejně jako u revmatiků nebo pacientů s antibiotickou terapií nasazenou již před odběrem vzorků, tyto rozdíly nemají vliv na heterogenitu výsledků. Mezinárodní konsenzus 2018 ovšem doporučuje v prvních 90 dnech od implantace používat jinou sadu rozdělovacích hodnot v případě podezření na akutní pooperační infekci kloubní náhrady. Bedair do své studie zahrnul pouze pacienty v období prvních 6 týdnů po primóimplantaci a doporučuje pro toto období rozdělovací hodnoty synoviálních leukocytů 27 800/μl a podíl PMN 89 %. Jeho doporučení v roce 2012 přejala IDSA [231].

Dvě studie pracovaly s pacienty po první době dvoudobé reimplantace a hledaly rozdělovací hodnotu pro predikci perzistence infekce před druhou dobou. V jejich souborech jsou tedy pacienti v pooperačním období, užívající antibiotika [171][272].

Některé studie nepracovaly s koagulovanými výpotky, protože z nich nešel odečíst počet leukocytů ani diferenciální rozpočet. I my jsme tyto vzorky ze studie vyloučili. Parvizi jako jediný o tomto postupu referuje. Trampuz ošetřoval koagulované výpotky hyaluronázou a potom je odečítal. Ostatní studie se o této problematice nezmiňují.

4.2.3. Ostatní typy buněk

Naše studie určila diagnostický přínos podílu neutrofilů a podílu lymfocytů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku. Snahou bylo určit, který z těchto parametrů je přesnější, nikoliv prosadit je do diagnostického algoritmu oba. Zjednodušeně lze říci, že součet podílu lymfocytů a podílu neutrofilů v diferenciálním rozpočtu kloubního výpotku se téměř vždy blíží 100 %, protože podíly ostatních typů buněk jsou zanedbatelné. Oba ukazatele jsou tedy těsně spjaté. Kdybychom aplikovali věrohodnostní poměry obou těchto testů na předtestovou pravděpodobnost infekce kloubní náhrady, dostali bychom zavádějící výsledek [101]. Podílem jiných buněk než neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku se také zabývali Parvizi [237] a Zmistowski [349].

4.2.4. Korekce kontaminace výpotku leukocyty z krve

Údaj o celkovém počtu leukocytů v kloubním punktátu může být značně zkreslen, pokud se při odběru výpotek kontaminuje větším množstvím krve. Ghanem navrhuje jednoduchou výpočetní korekci podle vzorce:

$$Leu_{corr} = Leu_s - Leu_k \cdot \frac{ES}{EK}$$

Leu _{corr}	...	korigovaný počet leukocytů v 1 μl výpotku
Leu _s	...	naměřený počet leukocytů v 1 μl výpotku
Leu _k	...	počet leukocytů v 1 μl krve
ES	...	počet erytrocytů v 1 μl výpotku
EK	...	počet erytrocytů v 1 μl krve

Podle tohoto vzorce se od naměřeného počtu leukocytů odečte počet leukocytů, který se vpravil do vzorku společně s krví při traumatickém odběru kloubního výpotku. Korekce počtu leukocytů nezvyšuje falešnou negativitu vyšetření, tedy infekční pacienti se po korekci obvykle nedostanou pod rozdělovací hodnotu. Aseptičtí pacienti, jejichž hodnota je těsně nad rozdělovací hodnotou, ovšem po

korekci nemají falešně pozitivní výsledky. Korekce zřejmě není úplně přesným nástrojem, protože se u některých aseptických pacientů stává, že počet leukocytů vyjde v záporných hodnotách – tedy odhad leukocytů vpravených do výpotku s krví je nadhodnocen. Ghanem to vysvětluje dvěma způsoby: Zaprvé se opravdu do kloubu vpraví tolik leukocytů, kolik je vypočítáno, avšak leukocyty adherují k synovii a v punktátu jsou v menší koncentraci než v kloubu. Zadruhé, během transportu vzorku do laboratoře propadávají leukocyty cytolýze rychleji než erytrocyty a naměřený počet leukocytů je nižší než skutečný [117]. Ať tak či onak, není známo, nakolik je navrhovaná korekce nadměrná, a v běžné praxi se neujala. Ostatní cytologické studie výpotku s ní nepočítají, nicméně mezinárodní konsenzus tuto korekci doporučuje [350].

4.2.5. Metalóza a ALTR

Metalóza rovněž způsobuje elevaci celkového počtu leukocytů ve výpotku [70]. U pacientů s kovovým povrchem obou artikulujících komponent vychází falešně pozitivní cytologické výsledky, pokud jsou odečítány na automatickém počítací buněk. Přístroj totiž identifikuje větší kovové částice jako leukocyty. Monocyty s fagocytovanými kovovými částicemi potom považuje za polymorfonukleární neutrofile [337]. Pokud má pacient artikulující pár kov na kov, je doporučeno odečítat cytologické parametry manuálně [293]. **Nepříznivá lokální tkáňová reakce** (ALTR, adverse local tissue reaction) je vyvolána kovovými otěrovými částicemi a svými klinickými příznaky může imitovat projevy IKN. ALTR a metalóza mohou způsobit lehký nárůst falešné positivity cytologických parametrů. Falešně pozitivní cytologie by potom mohla vést k mylné diagnóze. ALTR je vzácná komplikace popsána nejen u TEP kyčlí s artikulujícím párem kov na kov, ale i u modulárních typů TEP kyčlí, kde je vyvolána korozí a mikropohybem mezi kovovým krčkem a kovovou hlavičkou [49]. Parvizi referuje, že se při jeho studii leukocyty odečítaly manuálně. Ostatní autoři buď nereferují nebo odečítali pomocí automatu. V naší studii jsme odečítali na automatickém přístroji a v případě nesrovnalostí doplnili i manuální odečet.

4.3. Přínos stanovení sérového interleukinu 6 k diagnostice IKN

Stanovení sérového interleukinu 6 je relativně přesný test, který významně přispívá k diagnostice infekce kloubní náhrady. Vzhledem k tomu, že jeho senzitivita ani specifita nedosahuje 100 %, je nutné – stejně jako u dalších testů – hodnotit výsledek v kontextu s anamnézou, klinickým nálezem a výsledky dalších testů. Alespoň v případě kolenních endoprotéz však sérový interleukin 6 vykazuje takové hodnoty věrohodnostních poměrů, že dokáže výrazně proměnit předtestovou pravděpodobnost infekční diagnózy.

Sérový interleukin 6 není zařazen do souboru diagnostických kritérií Mezinárodního konsenzu z roku 2013 ani do nového souboru z roku 2018, ačkoliv má prokazatelně větší přesnost (a hlavně specifitu) než sedimentace erytrocytů. Sedimentace je zahrnuta nejen v souboru diagnostických kritérií Mezinárodního konsenzu z roku 2013, ale též v jeho verzi z roku 2018. Důvodem je možná fakt, že sérový interleukin 6 stimuluje sekreci CRP, a proto je v určité korelaci s jeho sérovou hladinou. Oba tyto ukazatele tedy nemohou být považovány za nezávislá kritéria infekce kloubní náhrady.

4.3.1. Srovnání s ostatními studii

Pro diagnózu infekce kloubní náhrady kolena nebo kyčle byla v naší studii stanovena rozdělovací hodnota interleukinu 6 v séru **12,55 ng/l**. Při analýze **TEP kyčlí** zvláště je rozdělovací hodnota **8,45 ng/l**, **u kolen 12,55 ng/l**. Senzitivita a specifita sérového IL-6 byla v naší studii stanovena mírně nižší než v některých dříve publikovaných studiích [25], ovšem tyto diagnostické vlastnosti vychází stále vyšší, než jsou souborné hodnoty uváděné v metaanalýze všech předchozích studií [391]. Tabulka 4.2. shrnuje výsledky předchozích diagnostických studií a dvou metaanalýz. Rozdíly mezi studii jsou dány hlavně rozdíly v designu jednotlivých studií, v laboratorní metodologii a ve výběru pacientů. Některé studie ze souboru vyřazovaly pacienty se systémovým zánětlivým onemocněním, pacienty v období prvních 3 měsíců po implantaci nebo pacienty s antibiotiky nasazenými již před odběrem vzorků k analýze. Naše studie všechny tyto pacienty v souboru ponechala (tabulka 4.2). Villacis [325], Buttaro [38] a Ettinger [87] ze své studie vyloučili nejen pacienty se systémovým zánětlivým onemocněním a antibiotickou léčbou nasazenou před odběrem vzorků, ale také HIV pozitivní, protože i bez infekce kloubní náhrady je u nich sérový interleukin 6 vysoko nad obvyklými rozdělovacími hodnotami pro IKN [144]. Ostatní studie o HIV pozitivních pacientech nereferují. Glehr [118] vyloučil všechny, kteří by kvůli preexistujícímu onemocnění mohli mít elevované zánětlivé parametry, tedy i kuřáky a pacienty s obezitou, malignitou, imunodeficitem a jaterní nebo renální insuficiencí.

Jednotlivé studie se též liší v použitém referenčním standardu, tedy ne každá srovnávala sérový IL-6 s kritérii Mezinárodního konsenzu z roku 2013 a ne každá by rozdělila pacienty stejně do infekčních a aseptických skupin, což vede ke vzniku určité klasifikační bias. Použitý referenční standard je schematicky vyznačen v tabulce 4.2. Někteří autoři provádějí svou vlastní ROC analýzu, jiní přejímají rozdělovací hodnoty předchozích studií. Publikované diagnostické vlastnosti zkoumaného testu potom nejsou optimální pro zkoumaný soubor pacientů.

Autor	Rok	Kloub	Pac.	Hranice	SE	SP	Zahrnutí			Ref. standard				
							RA	ATB	Poop.	K	M	O	H	C
Majors [199]	2019	Kolena	59	9,14	81 %	63 %		•	•	•	•			
Qu [375]	2019	Kyčle	86	8,12	38 %	88 %	•	•	•	•	•	•		
Erdemli [85]	2018	Kolena a kyčle	88	16,2	75 %	79 %	•		•	•	•	•	•	•
Hoell [140]	2015	Kolena a kyčle	55	8 – 13	67 %	90 %	•	•	•		•			
Ettinger [87]	2015	Kolena, kyčle a ramena	98	5,12	80 %	88 %					•	•	•	•
Villacis [325]	2014	Ramena	34	10	14 %	95 %			•		•	•	•	
Randau [377]	2014	Kolena a kyčle	120	2,6	79 %	58 %	•	•	•	•	•	•	•	•
				6,6	49 %	88 %								
Grosso [129]	2014	Ramena	69	5	12 %	93 %			•	•	•	•	•	
Elgeidi [83]	2014	Kolena a kyčle	40	10,4	100 %	91 %			•	•	•	•	•	
Gollwitzer [120]	2013	Kolena a kyčle	35	1,89	47 %	95 %					•	•		•
Glehr [118]	2013	Kolena a kyčle	124	2,55	94 %	53 %		•	•	•	•	•	•	•
				4,7	86 %	67 %								
Worthington [335]	2010	Kyčle	46	9	81 %	77 %			•	•				
Buttaro [38]	2010	Kyčle	69	10	36 %	94 %		•	•		•		•	
Bottner [32]	2007	Kolena a kyčle	78	12	95 %	87 %	•	•	•		•		•	
Di Cesare [72]	2005	Kolena a kyčle	58	10	100 %	95 %			•		•		•	
Berberi [25] Metaanalýza	2010	Kolena a kyčle			97 %	91 %								
Xie [391] Metaanalýza	2017	Kolena, kyčle a ramena	731		72 %	89 %								
Naše práce	2018	Kolena a kyčle	197	12,55	87 %	90 %	•	•	•	•	•	•	•	•

Tabulka 4.2: Srovnání výsledků sérového IL-6 v naší studii s výsledky předchozích diagnostických studií a metaanalýz. Pac. = počet pacientů ve studii, Se = Senzitivita, Sp = Specificita, RA = pacienti s revmatoidní artritidou nebo s jiným systémovým zánětlivým onemocněním, ATB = pacienti léčení antibiotiky v průběhu odběru vzorků, Poop. = pacienti krátce po implantaci, ref. standard = referenční standard, K = klinický nález, prostý snímek a krevní odběry, M = mikrobiologická kultivace, O = operační nález, H = histologický nález, C = cytologické parametry kloubního punktu

4.3.2. Zvláštnosti chování testu u konkrétních kloubů

Sérový interleukin 6 má jako ukazatel infekce kloubní náhrady výbornou specificitu, ale v mnoha studiích se potýká s nízkou senzitivitou. Nejhorší senzitivitu opakovaně vykazují studie TEP ramen, což se vysvětluje vyšším zastoupením nízké virulentních kmenů, které nevyvolávají intenzivní zánětlivou reakci hostitele, konkrétně *Cutibacterium acnes* [325]. U TEP ramen je navíc výrazně nižší senzitivita sedimentace erytrocytů a sérového CRP než u nosných kloubů. Pohybuje se mezi 40 a 50 %. Senzitivita sérového IL-6 u infekcí TEP ramen je však ještě mnohem nižší (12 – 14 %). Specificita

sérového IL-6 je výborná a není ještě vyšší hlavně proto, že IL-6 je elevován u pacientů se systémovým zánětlivým onemocněním, s Pagetovou chorobou, malignitou nebo s imunodeficitem [377]. U těchto pacientů stoupají hodnoty sérového IL-6 běžně až do výše kolem 10 ng/l i bez infekce kloubní náhrady [199].

Zůstává stále otázkou, proč má sérový interleukin 6 výrazně lepší přesnost u TEP kolen než u TEP kyčlí (což je nejlépe vidět na hodnotách věrohodnostních poměrů). Důvodem může být například skutečnost, že přesnost testu se mění v závislosti na klinické situaci a předtestové pravděpodobnosti infekce. Dále je třeba zohlednit to, že pacienti s TEP kyčle mají suché kloubní punkce daleko častěji než pacienti s TEP kolen, a tudíž byli častěji vyloučeni ze studie, protože nebylo možné stanovit diagnózu na základě kritérií Mezinárodního konsenzu z roku 2013 a zařadit pacienty do konkrétní výzkumné skupiny. Jaké procento z takto vyloučených pacientů mělo infekci kloubní náhrady, není známo, a tak zde vzniká prostor pro selekční bias.

4.3.3. Detekce časně pooperační infekce

Sérový interleukin 6 je vhodný pro vyloučení časně akutní pooperační infekce kloubní náhrady již 4 dny po implantaci. Sedimentace ani CRP tak brzy nemají žádnou vypovídající hodnotu. Na souboru 30 pacientů bylo prokázáno, že po bezproblémové implantaci TEP kolena nebo kyčle sérová hladina CRP roste na 138 mg/l a tohoto maxima dosahuje druhý pooperační den. CRP potom pozvolna klesá s poločasem 62 hodin a normálních hodnot dosahuje za 2 – 3 týdny po operaci [332].

IL-6 je daleko pružnějším ukazatelem. Maxima 399 ng/l dosahuje již za 6 hodin po operaci a potom klesá s poločasem 15 hodin, aby se vrátil do normálních hodnot v řádu dní [332]. Tento průběh pooperačního sérového CRP a IL-6 potvrdila i další studie na 50 pacientech z roku 2019 [202].

Po nekomplikované implantaci TEP kolena nejpomaleji roste sedimentace erytrocytů, která nabývá maxima teprve po 14 dnech od operace a do normálního rozmezí se vrací 26 týdnů po operaci [145]. Je třeba mít na paměti, že sedimentace erytrocytů je elevovaná i po operacích nebo zánětech jinde v těle, a proto bývá z hlediska diagnostiky IKN často falešně pozitivní.

Leukocytóza je v pooperačním období běžná, a proto je stanovení krevních leukocytů pro diagnostiku časně IKN hrubě nespecifické: senzitivita 79,2 % a specificita 46,3 % [66].

4.4. Přínos stanovení synoviálních biochemických markerů k diagnostice IKN

V naší studii byly stanoveny základní diagnostické vlastnosti pro vyšetření glukózy, laktátu, KEB, CRP, IL-6 a NGAL v kloubním punktátu při diagnostice infekce kloubní náhrady. Stanovení glukózy a laktátu ve výpotku ani výpočet koeficientu energetické bilance nejsou přínosem pro diagnostiku infekce kloubní náhrady, protože tyto testy mají nízkou přesnost. Přijatelné parametry jsou senzitivita koeficientu energetické bilance a specifická laktátu ve výpotku. Nízká přesnost glukózy jako ukazatele IKN je podmíněna skutečností, že hladina glukózy ve výpotku je ovlivněna mnoha různými faktory, nejen infekcí kloubní náhrady.

Marker	Autor	Rok	Hranice	AUC	Senzitivita	Specifická	LR+	LR-
Glukóza [mmol/l]	De Vecchi [69]	2016	semikv.	-	0,778	0,814	4,18	0,27
	Lenski [181]	2015	2,78	0,588	0,556	0,645	1,57	0,69
	Lenski [179]	2014	2,44	0,829	0,792	0,786	3,69	0,27
	Naše studie	2018	2,6	0,811	0,720	0,831	4,25	0,34
Laktát [mmol/l]	Lenski [181]	2015	5,3	0,76	0,733	0,667	2,20	0,40
	Lenski [179]	2014	8,3	0,844	0,714	0,880	5,95	0,33
	Naše studie	2018	8,87	0,861	0,680	0,954	14,73	0,34

Tabulka 4.3: Srovnání diagnostických vlastností synoviální glukózy a laktátu s výsledky jiných studií. AUC = plocha pod ROC křivkou, LR+ = pozitivní věrohodnostní poměr, LR- = negativní věrohodnostní poměr

Role synoviální glukózy a laktátu v diagnostice IKN se v minulosti zabývalo jen několik málo výzkumníků (Tabulka 4.3). Rozdělovací hodnoty glukózy a laktátu jsou podobné. Rozdíly v diagnostických vlastnostech testů jsou opět dané různou definicí infekce kloubní náhrady v různých studiích a nejednotou designu studií. Doktorandovi se nepodařilo v literatuře najít starší studii, která by stanovila rozdělovací hodnotu a diagnostické vlastnosti koeficientu energetické bilance jako ukazatele infekce kloubní náhrady. Tento ukazatel se v praxi používá například u mozkomíšního moku, kde hodnoty nad 28 svědčí pro normální stav a hodnoty pod 10 jsou podezřelé z probíhajícího anaerobního metabolismu glukózy a zvýšené aktivity profesionálních fagocytů [29]. Naše studie určila rozdělovací hodnotu 4,7. Pro potvrzení bude třeba ještě další studie na větším souboru pacientů.

Historicky není synoviální glukóza příliš důvěryhodným markerem, protože instinktivně předpokládáme, že je ovlivněna glykemií. Omar [228] zjistil, že neexistuje souvislost mezi krevní a synoviální hladinou glukózy (Pearsonův korelační koeficient $r^2 = 0,02$). Pokles hladiny glukózy v synoviální tekutině tedy není maskován hyperglykemií u diabetika. Nespecifičnost synoviální glukózy jako markeru infekce kloubní náhrady pramení z toho, že glukózu spotřebovávají nejen bakterie žijící uvnitř kloubu, ale také imunitní a synoviální buňky. Hladina glukózy tedy nutně musí poklesnout při jakémkoliv artritidě, například exacerbaci revmatoidní artritidy [271]. Synoviální laktát je velmi citlivým ukazatelem infekční artritidy nativního kloubu a diagnostikuje ji přesněji než například kyselina močová, glukóza, IL-6 nebo počet leukocytů ve výpotku [179]. V diagnostice infekce kloubní náhrady

však není zdaleka tak přesný jako dnes již rutinně užívané cytologické a biochemické markery. Nilsdotter-Augustinsson [225] ve studii na 85 uvolněných TEP kyčlí neprokázala schopnost synoviálního laktátu diskriminovat mezi IKN, asepticky selhávajícími TEP a osteoartrózou bez TEP.

sCRP [mg/l]	Rok	Metoda	Kloub	Hranice	SE	SP	LR+	LR-
De Vecchi [70]	2018	T	Kolena a kyčle	7,0	0,875	0,970	29,2	0,129
				10,0	0,813	0,971	28,0	0,193
Sousa [278]	2018	N	Kolena a kyčle	6,7	0,783	0,938	12,63	0,231
De Vecchi [69]	2016	T	Kolena a kyčle	10,0	0,815	0,941	13,81	0,197
Omar [229]	2015	N	Kyčle	2,5	0,955	0,933	14,25	0,048
Buttaro [39]	2015	K	Kyčle	9,5	0,90	0,94	15,0	0,106
Deirmengian [64]	2014	E	Kolena a kyčle	12,2	0,90	0,97	30	0,103
Deirmengian [65]	2014	E	Kolena a kyčle	3,0	0,973	0,786	4,55	0,034
Tetreault [296]	2014	T	Kolena a kyčle	6,6	0,880	0,850	5,87	0,141
Ronde-Oustau [260]	2014	T + N	Kolena	5,365	0,900	0,909	9,9	0,11
Vanderstappen [317]	2013	T	Kolena	1,8	1,000	0,849	6,62	-
				2,8	0,909	0,939	14,9	0,086
Parvizi [239]	2012	M	Kolena	3,65	0,858	0,868	6,51	0,164
		E		0,06	0,700	1,000	-	0,300
Parvizi [240]	2012	T	Kolena a kyčle	9,5	0,850	0,952	17,7	0,158
Jacovides [147]	2011	M	Kolena a kyčle	3,605	0,871	0,977	37,9	0,132
Deirmengian [63]	2010	M	Kolena a kyčle	10	0,86	0,71	2,97	0,197
Naše studie	2018	T	Kolena a kyčle	8,8	0,917	1,000	-	0,083

Tabulka 4.4: Srovnání diagnostických vlastností synoviálního CRP v naší studii s výsledky jiných studií. SE = senzitivita, SP = specificita, LR+ = pozitivní věrohodnostní poměr, LR- = negativní věrohodnostní poměr. I = automatizovaná imunoturbidimetrická esej, E = enzyme-linked immunosorbent assay, K = kinetická infračervená turbidimetrická imunoesej, N = nefelometrie, M = multiplex ELISA. Rozděluující hodnoty jsou udány v mg/l.

V posledních letech se diagnostika IKN stále více zaměřuje na analýzu kloubního výpotku. Výpotek je v kontaktu se synoviální tkání, eventuálními bakteriemi a imunitními buňkami a jeho složení nejlépe vypovídá o dějích uvnitř kloubu. Synoviální koncentrace CRP má lepší přesnost s ohledem na IKN než sérová hladina. CRP ovšem vzniká v játrech a do kloubního prostoru difunduje skrz synovii, která v reakci na úrazové nebo infekční poškození mění svou propustnost [356]. CRP vzniká v menší míře i v ledvinách, dýchacím traktu, adipocytech, neuronech a aterosklerotických plátech tepen [240]. Tvorba CRP uvnitř kloubu zatím objevena nebyla [260]. Sérový CRP je ovlivněn i zánětlivými procesy lokalizovanými jinde než ve sledovaném kloubu a systémovými zánětlivými onemocněními, proto jeho

hladina není specifická pro IKN. Mezi sérovou a synoviální hladinou CRP existuje výrazná korelace ($r = 0,76$), což se vysvětluje zvýšenou nitrokloubní potřebou CRP, který hraje mimo jiné i roli aktivátoru komplementu a modulátoru fagocytózy [296]. Sérový CRP může být falešně negativní v případě low-grade infekce kloubní náhrady [278].

sIL-6 [ng/l]	Rok	Kloub	Hranice	SE	SP	LR+	LR-
Frangiamore [97]	2017	Ramena	453,6	0,82	0,87	6,4	0,20
Frangiamore (96)	2015	Ramena	359,3	0,865	0,898	8,45	0,15
Lenski [180]	2014	Kolena, kyčle a loket	30 750	0,905	0,948	17,27	0,10
Randau [377]	2014	Kolena a kyčle	2100	0,623	0,858	4,37	0,44
			9000	0,473	0,976	19,70	0,54
Deirmengian [64]	2014	Kolena a kyčle	2300	0,89	0,97	29,7	0,113
Gollwitzer [120]	2013	Kolena a kyčle	1897	0,600	0,947	11,3	0,422
Jacovides [147]	2011	Kolena a kyčle	4270	0,871	1,000	-	0,129
Deirmengian [63]	2010	Kolena a kyčle	13 350	1,000	1,000	-	-
Nilsdotter [225]	2007	Kyčle	10 000	0,693	0,930	9,86	0,33
Xie [391] <small>Metaanalýza</small>	2017			0,91	0,90	9,1	0,1
Naše studie	2018	Kolena a kyčle	20 988	0,833	0,979	40,0	0,170

Tabulka 4.5: Srovnání diagnostických vlastností synoviálního IL-6 v naší studii s výsledky jiných studií. SE = senzitivita, SP = specifická, LR+ = pozitivní věrohodnostní poměr, LR- = negativní věrohodnostní poměr

Naše studie stanovila velmi vysoké diagnostické kvality synoviálního CRP a IL-6. Výsledky jsou koherentní s výsledky podobných studií (Tabulky 4.4 a 4.5). Zatímco rozdělovací hodnoty pro synoviální CRP se drží v poměrně úzkém rozpětí 1,8 – 12,2 mg/l, navrhované rozdělovací hodnoty pro IL-6 se u různých studií liší až o 2 řády. Příčina tohoto obecného nesouladu není známá, nicméně rozdělovací hodnota stanovená v naší studii se z tohoto rozpětí nevymyká. Vysvětlení je možné hledat v zastoupení různě virulentních původců v různých studiích/zemích, designu studie, výběrových kritériích i načasování odběru vzorků. Signální molekuly mají krátký biologický poločas a z kloubu jsou rychle odbourávány. Proto hraje pravděpodobně roli i to, jak dlouhá doba uplynula od začátku příznaků nebo nasazení antibiotik. Tato tvrzení se ale musí ověřit.

Nejvyšší rozdělovací hodnotu pro synoviální IL-6 stanovil Lenski [180]. Kontrolní skupinou jsou ve většině studií pacienti s aseptickým selháním implantátu, kteří podstupují operační léčbu podobně jako infekční případy. Lenski se liší tím, že kontrolní skupinu vytvořil z pacientů s bolestivým protetickým kloubem, jejichž stav se upravil během hospitalizace bez provedení revizní operace. Mohlo se tedy poměrně snadno stát, že zařadil mezi kontroly low-grade infekci, která se převedla do stádia remise po antibiotické supresi. Podstatné je, že peroperační vzorky těchto kontrol nejsou k dispozici pro porovnání. Pacienti z kontrolní skupiny mohli mít rovněž exacerbaci revmatoidní artritidy, která by přispěla k vyšším zánětlivým parametrům v kontrolní skupině.

Rozpětí rozdělovacích hodnot synoviálního CRP mezi studii již není tak velké jako v případě IL-6. Vanderstappen v roce 2013 vyslovil hypotézu, že stanovená výše rozdělovací hodnoty se nejvíce odvíjí od použité laboratorní metodiky a není to absolutně dané číslo [317]. Tehdy srovnával Vanderstappen svou práci s předchozími výsledky Parvizioho [239], resp. výsledky automatizované imunoturbidimetrické eseje s výsledky metody ELISA. Ve světle výsledků novějších prací se již nejeví, že by ELISA opakovaně přinášela nižší nebo vyšší rozdělovací hodnoty v porovnání s imunoturbidimetrií. ELISA je spjata s nejnižší [239] i s nejvyšší určenou rozdělovací hodnotou [64]. V naší práci byl synoviální CRP stanoven imunoturbidimetrickou esejí, což je dle Tabulky 4.4 nejčastěji používaná metoda. V Tabulce 4.4 je metoda stanovení sérového CRP vyznačena.

Výborné diagnostické vlastnosti prokázal test hladiny NGAL v kloubním výpotku. Rozdělovací hodnota na hladině 998 µg/l na použitém malém souboru diskriminovala IKN od neinfekčních pacientů se 100% přesností. Naše výsledky jsou v souladu s výsledky předchozích studií (Tabulka 4.6).

sNGAL [µg/l]	Rok	Kloub	Hranice	SE	SP	LR+	LR-
Gómez [121]	2019	Kolena a kyčle	152	0,863	0,772	3,79	0,177
Deirmengian [64]	2014	Kolena a kyčle	2200	1,000	1,000	-	-
Naše studie	2018	Kolena a kyčle	998	1,000	1,000	-	-

Tabulka 4.6: Srovnání diagnostických vlastností synoviálního NGAL v naší studii s výsledky jiných studií. SE = senzitivita, SP = specifická, LR+ = pozitivní věrohodnostní poměr, LR- = negativní věrohodnostní poměr

Nevýhodou biochemické analýzy punktátu je bezpochyby fakt, že biomarkery nelze stanovit u příliš viskózních, koagulovaných, hemolytických výpotků nebo ve výpotcích kontaminovaných pacientovou krví. Parvizi nemohl vyšetřit 4,8 % vzorků [240]. Tetreault udává, že nebylo možné odečíst celou šestinu vzorků [296]. Ve studii Vanderstappen to bylo 45,3 % případů [317], podobně jako 48,6 % v naší práci (Graf 3.5).

Protože žádný synoviální biomarker nevykázal opakovaně ve více studiích 100% přesnost, mnozí autoři doporučují kombinace dvou biomarkerů pro zvýšení přesnosti vyšetření a zachování jednoduchosti v porovnání se souborem kritérií Mezinárodního konsenzu. Opakovaně je navrhovaná kombinace testu **synoviálního CRP se synoviálním α -defensinem**, čímž lze dosáhnout velice zajímavé diagnostické přesnosti. Deirmengian uvádí senzitivitu 97,3 % a specifickou 100 % s poznámkou, že koexistence systémového zánětlivého onemocnění, metalózy nebo současná léčba antibiotiky nemá na přesnost kombinovaného testu vliv [65]. Stone dokládá senzitivitu kombinace synoviálního CRP a synoviálního α -defensinu (typu AND) 73,0 % a její specifickou 99,3 %. Při kombinaci stejných testů typu OR potom uvádí senzitivitu 91,9 % a specifickou 79,5 % [287].

Smysl má kombinovat pouze testy laboratorních hodnot, které nejsou v korelaci, jinak kombinovaný test nepřinese žádnou novou informaci v porovnání s individuálními testy. Pokud se na příklad elevace IL-6 a elevace CRP (ať už v séru nebo v synoviální tekutině) vyskytuje vždy pohromadě, nemůžeme při diagnostikování IKN jen slepě vynásobit věrohodnostní poměry obou těchto testů, ale musíme použít jen jeden z nich. Synoviální biomarkery α -defensin a NGAL spolu nejsou v korelaci. Ani jeden z těchto parametrů není v korelaci s jinými synoviálními biomarkery či s počtem leukocytů ve výpotku [64]. Další často testované kombinace jsou sérový IL-6 a synoviální CRP nebo sérový IL-6 a

počet leukocytů ve výpotku. Již nyní jsou k dispozici diagnostické kalkulačky (algoritmy), které lékaře v klinické praxi vedou (např. diagnostický algoritmus Mezinárodního konsenzu ve Philadelphii 2018), včetně zamezení nesprávných kombinací.

5. Shrnutí výsledků doktorské disertační práce

Prokázali jsme silnou diagnostickou hodnotu stanovení synoviálních leukocytů (LR+ 19,0, LR- 0,06) v diagnostice infekce kloubní náhrady. Podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku má také vysokou přesnost (LR+ 10,4, LR- 0,076), stejně jako v podobných studiích jiných autorů. Podíl lymfocytů v diferenciálním rozpočtu je o něco méně přesný než podíl neutrofilů (LR+ 9,5, LR- 0,092) a s tímto ukazatelem má výraznou korelaci. Proto se v diagnostice IKN nepoužívá. V naší studii byly stanoveny rozdělující hodnoty 3450 leukocytů v 1 μ l výpotku, 74,6 % pro podíl neutrofilů a 14,6 % pro podíl lymfocytů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku.

Sérový interleukin 6 dokáže poměrně spolehlivě predikovat infekci kloubní náhrady (LR+ 8,24, LR- 0,15). Rozdělující hodnota byla stanovena na 12,55 ng/l. Pro vyšší přesnost lze použít rozdělující hodnoty specifikované pro jednotlivé klouby: 8,45 ng/l pro TEP kyčlí a 12,55 ng/l pro TEP kolen. Test je přesnější pro TEP kolen (LR+ 10,12, LR- 0,065) než pro TEP kyčlí (LR+ 4,44, LR- 0,079).

Synoviální markery infekce kloubní náhrady měly stanoveny následující rozdělující hodnoty: glukóza 2,6 mmol/l, laktát 8,87 mmol/l, koeficient energetické bilance +4,7, CRP 8,8 mg/l, IL-6 20 988 ng/l a NGAL 998 μ g/l ve výpotku. Stanovení hladiny glukózy v kloubním výpotku je jednoduchou a levnou metodou, diagnostický přínos je však limitovaný (LR+ 4,430, LR- 0,301). Synoviální laktát je dobrým nástrojem k potvrzení diagnózy IKN, ale ne k jejímu vyloučení (LR+ 15,35, LR- 0,306). Koeficient energetické bilance výpotku nemá srovnatelné diagnostické vlastnosti jako v současnosti běžně používané synoviální metody diagnostiky infekce kloubní náhrady (LR+ 3,040, LR- 0,119). Synoviální IL-6 vykazuje poměrně vysokou přesnost (LR+ 40,0, LR- 0,170) a synoviální CRP má vynikající výsledky (senzitivita 0,917, specifická 1,000). Podobně i synoviální NGAL (přesnost 1,000). Negativní výsledek sNGAL, sCRP nebo kombinace sérového IL-6 se synoviálním CRP nebo IL-6 prakticky vylučuje přítomnost IKN. Chování synoviálního NGAL bude nutné ověřit na větším počtu pacientů, zejména se selhávající TEP kyčle.

Na zvířecím modelu se nám nepodařilo za podmínek stanovených v našem protokolu prokázat, že by látka DR7030 (lipofosfonoxin III. generace) impregnovaná do kostního cementu dokázala zabránit akutní osteomyelitidě indukované *Staphylococcus aureus* v dávkách 10^7 , 10^6 resp. 10^4 CFU. Při infekční dávce 10^4 CFU byly projevy infekčního zánětu u intervenční skupiny méně výrazné než u skupiny negativních kontrol. Při vyšších infekčních dávkách rozdíl nebyl nalezen. Účinek testovaných látek *in vivo* tím není vyloučen. Je třeba upravit model tak, aby se účinek ztlačněji projevil.

Summary

We demonstrated excellent diagnostic utility of synovial fluid white cell count in diagnostics of prosthetic joint infection (LR+ 19,0, LR- 0,06). Neutrophil percentage exhibited high accuracy as well (LR+ 10.4, LR- 0.076). Our results are in accordance with the other authors' results. Lymphocyte percentage is slightly less accurate than neutrophil percentage (LR+ 9.5, LR- 0.092) and there is a strong correlation between these two markers. Thus, lymphocyte percentage is not used in the diagnosis of PJI. The cut-off values obtained in the current study are 3,450 leukocytes per μL of synovial fluid, 74.6% neutrophilia and 14.6% lymphocytes.

Serum IL-6 is an effective tool in prediction of prosthetic joint infection (LR+ 8.24, LR- 0.15). Its cut-off value was determined as 12.55 ng/L. Two cut-off values were assessed according to location of implants: 8.45 ng/L for total hip arthroplasty and 12.55 ng/L for total knee arthroplasty. This test is more accurate in total knee replacement (LR+ 10.12, LR- 0.065) than in total hip replacement (LR+ 4.44, LR- 0.079).

The cut-off values of the synovial markers of prosthetic joint infection were determined as follows: glucose 2.6 mmol/L, lactate 8.87 mmol/L, coefficient of energy balance +4.7, CRP 8.8 mg/L, IL-6 20,988 ng/L and NGAL 998 $\mu\text{g/L}$. Synovial glucose is a simple and cheap test. However, its diagnostic utility is limited (LR+ 4.430, LR- 0.301). Synovial lactate is specific enough to rule in the diagnosis of PJI, but it is no good ruling it out (LR+ 15.35, LR- 0.306). Synovial coefficient of energy balance is inferior to today's routine examination tests (LR+ 3.040, LR- 0.119). Synovial IL-6 exhibits high accuracy (LR+ 40.0, LR- 0.170) and synovial CRP is an excellent marker of PJI (sensitivity 0.917, specificity 1.000), as well as synovial NGAL (accuracy 1.000). Negative result of synovial NGAL, synovial CRP, negative combination of serum IL-6 with synovial IL-6, or negative combination of serum IL-6 with synovial CRP exclude the finding of PJI. More studies are needed to determine the diagnostic utility of synovial NGAL.

We failed to prove that DR7030 impregnated bone cement (cement with third-generation lipophosphonoxin) could prevent foreign body-related osteomyelitis induced by *Staphylococcus aureus* at infection doses 10^7 , 10^6 and 10^4 CFU, respectively. Infection dose 10^4 CFU elicited slightly milder inflammatory reaction in the intervention group contrary to the negative control group. No difference between the intervention group and the control groups was seen at higher infection doses. The *in vivo* effect of the tested compounds is not strictly excluded. The animal model needs modifications to demonstrate the antimicrobial efficacy *in vivo*.

Seznam použitých zkratek

95% CI	95% interval spolehlivosti
^{99m} Tc-HMPAO	hexamethylpropylenaminoxim značený metastabilním techneciem
^{99m} Tc-MDP	komplex methyledifosfonátu s metastabilním techneciem
AAC	antibody-antibiotic conjugate
AAOS	American Academy of Orthopaedic Surgeons
AAOS	American Association of Orthopaedic Surgeons
AC	přesnost
<i>Agr</i>	accessory gene regulator
AJRR	American Joint Replacement Registry
ALTR	adverse local tissue reaction, nepříznivá lokální tkáňová reakce na otěrové částice
ATB	antibiotikum, antibiotický
ATP	adenosintrifosfát
AUC	area under the curve, plocha pod křivkou
BMI	body mass index, index tělesné hmotnosti
CFU	colony-forming unit, jednotka tvořící kolonii
CNS	centrální nervový systém
CRP	C-reaktivní protein
CT	výpočetní tomografie
CTP	cytidintrifosfát
č.j.	číslo jednací
ČR	Česká republika
ČSOT	Česká společnost pro ortopedii a traumatologii
ČLS JEP	Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
DAC	defensive antibacterial coating
DAIR	débridement, antibiotika, irigace a retence implantátu (operační výkon)
DNA	deoxyribonucleic acid, kyselina deoxyribonukleová
DOR	diagnostický poměr šancí
DTT	dithiothreitol
eDNA	extracelulární kyselina deoxyribonukleová
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay

FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
FN	falešná negativita
FP	falešná pozitivita
FW	sedimentace erytrocytů (Fahræus-Westergrenova metoda)
GEN	gentamicin
G-MDSC	granulocytární myeloidní supresorová buňka
GTP	guanosintrifosfát
HIV	human immunodeficiency virus, virus lidské imunodeficiency
HACC	hydroxypropyltrimethyl amonium chlorid chitosan
i.m.	intramuskulárně
i.v.	intravenózně
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IKN	infekce kloubní náhrady
IL-6	interleukin 6
iNOS	indukovatelné NO syntetázy
K-drát	Kirschnerův drát
KEB	koeficient energetické bilance
KNS	koaguláza-negativní stafylokoky
LE	leukocytová esteráza
LPPO	lipofosfonoxin
LR+	pozitivní věrohodnostní poměr
LR-	negativní věrohodnostní poměr
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MDSC	myeloid-derived supressor cells – myeloidní supresorové buňky
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRI	magnetic resonance imaging, zobrazení magnetickou resonancí
MRSA	metilicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MSIS	Musculoskeletal Infection Society
MSSA	metilicilin-senzitivní <i>Staphylococcus aureus</i>
MŠMT	Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin, lipokalin asociovaný s želatinázou neutrofilů, lipokalin 2
NGS	sekvenování příští generace (next-generation sequencing)

NIS	Nationwide Inpatient Sample
NPV	prediktivní hodnota negativního výsledku
OA	osteoartróza
p.o.	perorálně
PAD	perorální antidiabetika
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PET/CT	kombinace pozitronové emisní tomografie a výpočetní tomografie
PMMA	polymethylmetakrylát
PMN	polymorfonukleární neutrofil
PMN%	podíl polymorfonukleárních neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů
PPV	prediktivní hodnota pozitivního výsledku
PSM	phenol-soluble modulin, modulin rozpustný ve fenolu
RANKL	receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand
RNA	ribonucleic acid, kyselina ribonukleová
ROC	receiver operating characteristic
RTG	rentgen, rentgenový, prostý rentgenový snímek
s.c.	subkutánně
sCRP	synoviální C-reaktivní protein, hladina C-reaktivního proteinu ve výpotku
SE	senzitivita
sIL-6	synoviální interleukin 6, hladina interleukinu 6 ve výpotku
SLIM	synovium-like interface membrane
sNGAL	synoviální lipokalin 2, hladina lipokalinu 2 ve výpotku
SP	specifická
SPF	specific pathogen free
TEP	totální endoprotéza
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
TSST-1	toxin stafylokokového toxického šoku 1
UKA	unikompartmentální artroplastika, unikondylární náhrada kolenního kloubu
UPOL	Univerzita Palackého v Olomouci
USA	Spojené státy americké
UTP	uridintrifosfát

Seznam obrázků, grafů, schémat a tabulek

Obrázky

Obrázek 1.1:	Stádia vývoje biofilmu	13
Obrázek 1.2:	Biofilm <i>Staphylococcus epidermidis</i> na kovovém terčíku Ti ₆ Al ₄ V	14
Obrázek 1.3:	Typický klinický projev infekce kloubní náhrady	56
Obrázek 1.4:	Fulminantní průběh MRSA infekce revizní kloubní náhrady	57
Obrázek 1.5:	Osteolýza a heterotopické osifikace u TEP kyčle	59
Obrázek 1.6:	<i>Staphylococcus epidermidis</i> na krevním agaru	62
Obrázek 1.7:	Peroperační makroskopický nález při revizi infikované TEP kolena	65
Obrázek 1.8:	První doba dvoudobé reimplantace	75
Obrázek 1.9:	Nitrodřeňový hřeb pro distanční dézu kolenního kloubu	76
Obrázek 1.10:	Distanční déza kolenního kloubu nitrodřeňovým hřebem	76
Obrázek 2.1:	Implantace cementového válečku do dřeňové dutiny pravé tibie	90
Obrázek 2.2:	Makroskopický nitrokloubní nález po eutanázii	93

Grafy

Graf 1.1:	Počty primárních a revizních TEP kyčlí registrovaných do Národního registru kloubních náhrad České republiky v letech 2003 až 2018	19
Graf 1.2:	Důvody k revizím TEP kyčle podle výstupu z Národního registru kloubních náhrad České republiky za léta 2003 – 2012	20
Graf 1.3:	Důvody k revizím TEP kolen podle výstupu z Národního registru kloubních náhrad České republiky za léta 2015 – 2019	21
Graf 1.4:	Srovnání zastoupení jednotlivých indikací k revizím TEP kyčlí v různých národních registrech	24
Graf 1.5:	Srovnání zastoupení jednotlivých indikací k revizím TEP kolen v různých národních registrech	24
Graf 1.6:	Vývoj hodnoty infekčního břemene v letech 2010 – 2015	26
Graf 1.7:	Zastoupení původců IKN v různých zemích	29
Graf 1.8:	Ideální rozložení naměřených hodnot ve zdravé a nemocné populaci	53
Graf 1.9:	Rozložení naměřených hodnot ve zdravé a nemocné populaci v praxi	53

Graf 1.10:	Receiver operating curve a hledání ideální rozdělující hodnoty	54
Graf 3.1:	Vývojový diagram demonstrující počty pacientů zahrnutých do cytologické studie	102
Graf 3.2:	ROC křivky pro počet leukocytů ve výpotku, podíl neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů a podíl lymfocytů v diferenciálním rozpočtu leukocytů	107
Graf 3.3:	Vývojový diagram demonstrující počty pacientů zahrnutých do studie sérového IL-6	110
Graf 3.4:	ROC křivky pro sérový IL-6	113
Graf 3.5:	Vývojový diagram zobrazující distribuci pacientů do skupin ve studii synoviálních markerů IKN	117
Graf 3.6:	ROC křivky pro synoviální interleukin 6	122
Graf 3.7:	ROC křivka pro synoviální NGAL	123

Schémata

Schéma 1.1:	Diagnostický algoritmus IDSA z roku 2012	50
Schéma 1.2:	Diagnostický algoritmus Mezinárodního konsenzu z roku 2013	51
Schéma 2.1:	Časový průběh experimentu	89
Schéma 2.2:	Obecná struktura lipofosfonoxinů	96

Tabulky

Tabulka 1.1:	Detailní rozpis jednotlivých indikací k revizi TEP kyčle a jejich poměrné zastoupení	22
Tabulka 1.2:	Detailní rozpis jednotlivých indikací k revizím TEP kolen a jejich poměrné zastoupení	23
Tabulka 1.3:	Infekční břemeno dle dat vybraných národních registrů kloubních náhrad	25
Tabulka 1.4:	Četnost původců infekce kloubní náhrady v Německu a v USA	28
Tabulka 1.5:	Souhrn nejdůležitějších rizikových faktorů infekce kloubní náhrady	31
Tabulka 1.6:	Celkové kompromitující faktory pacienta podle McPhersona	35
Tabulka 1.7:	Lokální kompromitující faktory pacienta podle McPhersona	35
Tabulka 1.8:	Diagnostická kritéria MSIS z roku 2011	45
Tabulka 1.9:	Diagnostická kritéria Mezinárodního konsenzu ve Philadelphii z roku 2013	46
Tabulka 1.10:	Rozdělující hodnoty k posouzení výsledků vyšetření zahrnutých do kritérií Mezinárodního konsenzu ve Philadelphii z roku 2013	47

Tabulka 1.11:	Diagnostická kritéria Mezinárodního konsenzu ve Philadelphii z roku 2018	47
Tabulka 1.12:	Diagnostické vlastnosti různých referenčních standardů	48
Tabulka 1.13:	Rozděľující hodnoty k posouzení výsledků vyšetření zahrnutých do kritérií Mezinárodního konsenzu ve Philadelphii z roku 2018	48
Tabulka 1.14:	Obecná kontingenční tabulka	52
Tabulka 1.15:	Četnost výskytu nejčastějších klinických příznaků mezi pacienty s infekcí kloubní náhrady	57
Tabulka 1.16:	Klasifikace periprotetické membrány (SLIM)	69
Tabulka 1.17:	Doporučené antibiotické protokoly	77
Tabulka 1.18:	Doporučená antibiotika pro dlouhodobou antibiotickou supresní terapii	80
Tabulka 2.1:	Histologické hodnocení osteomyelitidy HOES	91
Tabulka 2.2:	Výsledky histologické analýzy vzorků z kolenního kloubu a tibiální dřevňové dutiny zvířat zahrnutých do pilotní a verifikační fáze validační studie	92
Tabulka 2.3:	Kultivační výsledky tkání, punktátů a sonikace implantátů	94
Tabulka 2.4:	Závěrečná interpretace výsledků	95
Tabulka 2.5:	Interpretace výsledků fáze 1	97
Tabulka 2.6:	Interpretace výsledků fáze 2	98
Tabulka 2.7:	Interpretace výsledků fáze 3	99
Tabulka 3.1:	Grafické zpracování diagnostických kritérií referenčního standardu cytologické studie	101
Tabulka 3.2:	Charakteristika skupiny infekcí kloubních náhrad v cytologické studii	103
Tabulka 3.3:	Charakteristika skupin aseptických revizí v cytologické studii	104
Tabulka 3.4:	Četnost jednotlivých původců izolovaných z peroperačních vzorků tkání a výpotků	105
Tabulka 3.5:	Podíl zastoupení jednotlivých typů infekcí kloubních náhrad	105
Tabulka 3.6:	Výsledky sledovaných ukazatelů u infekčních a neinfekčních skupin	106
Tabulka 3.7:	Kontingenční tabulka pro test leukocytů ve výpotku	107
Tabulka 3.8:	Diagnostické vlastnosti počtu leukocytů ve výpotku	107
Tabulka 3.9:	Kontingenční tabulka pro test podílu polymorfonukleárních neutrofilů v diferenciálním rozpočtu výpotku	108
Tabulka 3.10:	Kontingenční tabulka pro test podílu lymfocytů v diferenciálním rozpočtu výpotku	108
Tabulka 3.11:	Diagnostické vlastnosti podílu neutrofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku	108

Tabulka 3.12:	Diagnostické vlastnosti podílu lymfocytů v diferenciálním rozpočtu leukocytů ve výpotku	108
Tabulka 3.13:	Charakteristika pacientů v souboru studie sérového IL-6	111
Tabulka 3.14:	Četnost jednotlivých původců izolovaných z peroperačních vzorků tkání a výpotků	112
Tabulka 3.15:	Podíl zastoupení jednotlivých typů infekcí kloubních náhrad	113
Tabulka 3.16:	Kontingenční tabulka srovnávající pozitivitu a negativitu sérového IL-6 ve vztahu k pozitivitě a negativitě kritérií Mezinárodního konsenzu 2013	114
Tabulka 3.17:	Diagnostické vlastnosti sérového interleukinu 6	114
Tabulka 3.18:	Charakteristika pacientů v infekčních a aseptických skupinách studie synoviálních markerů IKN	119
Tabulka 3.19:	Výsledky biochemických vyšetření pacientů z infekčních a aseptických skupin	120
Tabulka 3.20:	Kontingenční tabulka pro diagnostický test glukózy v kloubním punktátu	120
Tabulka 3.21:	Kontingenční tabulka pro diagnostický test laktátu v kloubním punktátu	121
Tabulka 3.22:	Kontingenční tabulka pro KEB kloubního punktátu	121
Tabulka 3.23:	Kontingenční tabulka pro diagnostický test CRP v kloubním punktátu	122
Tabulka 3.24:	Kontingenční tabulka pro diagnostický test IL-6 v kloubním punktátu	122
Tabulka 3.25:	Kontingenční tabulka pro diagnostický test NGAL v kloubním punktátu	123
Tabulka 3.26:	Diagnostické vlastnosti synoviálních biochemických markerů	124
Tabulka 3.27:	Diagnostické vlastnosti synoviálního CRP a synoviálního IL-6 po vyřazení pacientů se systémovým zánětlivým onemocněním ze souboru	125
Tabulka 3.28:	Diagnostické vlastnosti kombinací synoviálních biochemických markerů	125
Tabulka 4.1:	Srovnání výsledků naší cytologické studie s výsledky podobných studií, metaanalýzy a konsenzem 2018	131
Tabulka 4.2:	Srovnání výsledků naší studie sérového IL-6 s výsledky podobných diagnostických studií a metaanalýz	135
Tabulka 4.3:	Srovnání diagnostických vlastností synoviální glukózy a laktátu s výsledky jiných studií	137
Tabulka 4.4:	Srovnání diagnostických vlastností synoviálního CRP v naší studii s výsledky jiných studií	138
Tabulka 4.5:	Srovnání diagnostických vlastností synoviálního IL-6 v naší studii s výsledky jiných studií	139
Tabulka 4.6:	Srovnání diagnostických vlastností synoviálního NGAL v naší studii s výsledky jiných studií	140

Použitá literatura

Tištěné zdroje:

1. **Aggarwal V**, Bakhshi H, Ecker N, Parvizi J, Gehrke T, Kendoff D. Organism Profile in Periprosthetic Joint Infection: Pathogens Differ at Two Arthroplasty Infection Referral Centers in Europe and in the United States. *Journal of Knee Surgery*. 2014;27(05):399-406. doi:10.1055/s-0033-1364102.
2. **Ahmad SS**, Shaker A, Saffarini M, Chen AF, Hirschmann MT, Kohl S. Accuracy of diagnostic tests for prosthetic joint infection: a systematic review. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2016;24(10):3064-3074. doi:10.1007/s00167-016-4230-y.
3. **Akgün D**, Müller M, Perka C, Winkler T. A positive bacterial culture during re-implantation is associated with a poor outcome in two-stage exchange arthroplasty for deep infection. *The Bone & Joint Journal*. 2017;99-B(11):1490-1495. doi:10.1302/0301-620x.99b11.bjj-2017-0243-r1.
4. **Akgün D**, Müller M, Perka C, Winkler T. The serum level of C-reactive protein alone cannot be used for the diagnosis of prosthetic joint infections, especially in those caused by organisms of low virulence. *The Bone & Joint Journal*. 2018;100-B(11):1482-1486. doi:10.1302/0301-620x.100b11.bjj-2018-0514.r1.
5. **Alamanda VK**, Springer BD. The prevention of infection. *The Bone & Joint Journal*, 2019;101-B(1_Supple_A), 3–9. doi:10.1302/0301-620X.101B1.BJJ-2018-0233.R1
6. **Alt V**, Bitschnau A, Bohner F, Heerich KE, Magesin E, Sewing A, Pavlidis T, Szalay G, Heiss C, Thormann U, Hartmann S, Pabst W, Wenisch S, Schnettler R. Effects of gentamicin and gentamicin-RGD coatings on bone ingrowth and biocompatibility of cementless joint prostheses: an experimental study in rabbits. *Acta Biomater*. 2011;7(3):1274–80. doi:10.1016/j.actbio.2010.11.012.
7. **Alvand A**, Rezapoor M, Parvizi J. The Role of Biomarkers for the Diagnosis of Implant-Related Infections in Orthopaedics and Trauma. A Modern Approach to Biofilm-Related Orthopaedic Implant Infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2017:69-79. doi:10.1007/5584_2017_11.
8. **An YH**, Bradley J, Powers DL, Friedman RJ. The prevention of prosthetic infection using a cross-linked albumin coating in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Br*. 1997;79:816–819. doi:10.1302/0301-620X.79B5.7228
9. **Anderson JM**, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*. 2008;20(2):86-100. doi:10.1016/j.smim.2007.11.004.
10. **Arciola CR**, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*. 2012;33(26):5967-5982. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.031.
11. **Arciola CR**, Campoccia D, Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol* 2018;16:397–409. doi: 10.1038/s41579-018-0019-y
12. **Ashton NN**, Allyn G, Porter ST, et al. In vitro testing of a first-in-class tri-alkyl-norspermidine-biaryl antibiotic in an anti-biofilm silicone coating. *Acta Biomaterialia*. 2019;93:25-35. doi:10.1016/j.actbio.2019.02.010.
13. **Askar M**, Bloch B, Bayston R. Small-colony variant of Staphylococcus lugdunensis in prosthetic joint infection. *Arthroplast Today*. 2018;4(3):257–260. doi:10.1016/j.artd.2018.06.003

14. **Atkins GJ**, Alberdi MT, Beswick A, Blaha JD, Bingham J, et al. General Assembly, Prevention, Surgical Site Preparation: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. *The Journal of Arthroplasty*. 2019 Feb;34(2S):S85-S92. doi:10.1016/j.arth.2018.09.057
15. **Atkins BL**, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DW, Simpson H, Peto TE, McLardy-Smith P, Berendt AR. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol* 1998;36(10):2932-2939. PMID: PMC105090. PMID: 9738046
16. **Aubry-Damon H**, Soussy CJ, Courvalin P. Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2590-2594. PMID: PMC105902. PMID: 9756760
17. **Austin MS**, Ghanem E, Joshi A, Lindsay A, Parvizi J. A simple, cost-effective screening protocol to rule out periprosthetic infection. *J Arthroplasty* 2008;23:65-68. doi:10.1016/j.arth.2007.09.005.
18. **Awan O**, Chen L, Resnik CS. Imaging evaluation of complications of hip arthroplasty: review of current concepts and imaging findings. *Can Assoc Radiol J*. 2013;64(4):306-13. doi: 10.1016/j.carj.2012.08.003.
19. **Azzam K**, Parvizi J, Jungkind D, et al. Microbiological, Clinical, and Surgical Features of Fungal Prosthetic Joint Infections: A Multi-Institutional Experience. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2009;91(Suppl 6):142-149. doi:10.2106/jbjs.i.00574.
20. **Balwit JM**, Langevelde PV, Vann JM, Proctor RA. Gentamicin-Resistant Menadione And Hemin Auxotrophic *Staphylococcus Aureus* Persist Within Cultured Endothelial Cells. *Journal of Infectious Diseases*. 1994;170(4):1033-1037. doi:10.1093/infdis/170.4.1033.
21. **Barberán J**, Aguilar L, Carroquino G, Giménez MJ, Sánchez B, Martínez D, Prieto J. Conservative treatment of staphylococcal prosthetic joint infections in elderly patients. *Am J Med* 2006;119:e997-e910. doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.036
22. **Beam E**, Osmon D. Prosthetic Joint Infection Update. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2018;32(4):843-859. doi:10.1016/j.idc.2018.06.005.
23. **Beck S**, Sehl C, Voortmann S, et al. Sphingosine is able to prevent and eliminate *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation on different orthopedic implant materials in vitro. *Journal of Molecular Medicine*. 2019;98(2):209-219. doi:10.1007/s00109-019-01858-x.
24. **Bedair H**, Ting N, Jacovides C, et al. The Mark Coventry Award: diagnosis of early postoperative TKA infection using synovial fluid analysis. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(1):34-40. doi:10.1007/s11999-010-1433-2
25. **Berbari E**, Mabry T, Tsaras G, et al. Inflammatory Blood Laboratory Levels as Markers of Prosthetic Joint Infection. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2010;92(11):2102-2109. doi:10.2106/jbjs.i.01199.
26. **Bernard L**, Legout L, Zürcher-Pfund L, Stern R, Rohner P, Peter R, Assal M, Lew D, Hoffmeyer P, Uçkay I. Six weeks of antibiotic treatment is sufficient following surgery for septic arthroplasty. *J Infect* 2010;61:125-132. doi:10.1016/j.jinf.2010.05.005.
27. **Bhattacharya M**, Wozniak DJ, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(12):1499-1516. doi:10.1586/14787210.2015.1100533
28. **Blanc P**, Bonnet E, Giordano G, Monteil J, Salabert AS, Payoux P. The use of labelled leucocyte scintigraphy to evaluate chronic periprosthetic joint infections: a retrospective multicentre study on 168 patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(9):1625-1631. doi:10.1007/s10096-019-03587-y

29. **Bořecká K**, Adam P, Sobek O, Hajduková L, Lánská V, Nekola P. Coefficient of energy balance: effective tool for early differential diagnosis of CNS diseases. *BioMed Res Int.* 2013;2013:745943. doi: 10.1155/2013/745943
30. **Borens O**, Corvec S, Trampuz A. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infections. *HIP International.* 2012;22(8_suppl):9-14. doi:10.5301/hip.2012.9565.
31. **Bori G**, Muñoz-Mahamud E, Garcia S, Mallofre C, Gallart X, Bosch J, Garcia E, Riba J, Mensa J, Soriano A. Interface membrane is the best sample for histological study to diagnose prosthetic joint infection. *Mod. Pathol.* 2011;24:579–584. doi:10.1038/modpathol.2010.219
32. **Bottner F**, Wegner A, Winkelmann W, Becker K, Erren M, Götze C. Interleukin-6, procalcitonin and TNF- α . *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume.* 2007;89-B(1):94-99. doi:10.1302/0301-620x.89b1.17485.
33. **Brady RA**, O'may GA, Leid JG, Prior ML, Costerton JW, Shirtliff ME. Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. *Infect Immun.* 2011;79(4):1797–1803. doi:10.1128/IAI.00451-10.
34. **Brauner A**, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology.* 2016;14(5):320-330. doi:10.1038/nrmicro.2016.34.
35. **Brook I**. The Importance of Lactic Acid Levels in Body Fluids in the Detection of Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases.* 1981;3(3):470-478. doi:10.1093/clinids/3.3.470.
36. **Brown TS**, Fehring KA, Ollivier M, Mabry TM, Hanssen AD, Abdel MP. Repeat two-stage exchange arthroplasty for prosthetic hip re-infection. *The Bone & Joint Journal.* 2018;100-B(9):1157-1161. doi:10.1302/0301-620x.100b9.bjj-2018-0470.r1.
37. **Burke JF**. The effective period of preventive antibiotic action in experimental incisions and dermal lesions. *Surgery.* 1961 Jul;50:161-8. PMID: 16722001
38. **Buttaro MA**, Tanoira I, Comba F, Piccaluga F. Combining C-reactive protein and interleukin-6 may be useful to detect periprosthetic hip infection. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(12):3263–3267. doi:10.1007/s11999-010-1451-0
39. **Buttaro MA**, Martorell G, Quinteros M, Comba F, Zanotti G, Piccaluga F. Intraoperative synovial C-reactive protein is as useful as frozen section to detect periprosthetic hip infection. *Clin Orthop Relat Res.* 2015;473(12):3876–3881. doi:10.1007/s11999-015-4340-8
40. **Byren I**, Bejon P, Atkins BL, et al. One hundred and twelve infected arthroplasties treated with DAIR (debridement, antibiotics and implant retention): antibiotic duration and outcome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2011;66(5):1203-1203. doi:10.1093/jac/dkr063.
41. **Campoccia D**, Montanaro L, Arciola CR. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* 2013;34:8533–8554
42. **Chalmers BP**, Weston JT, Osmon DR, Hanssen AD, Berry DJ, Abdel MP. Prior hip or knee prosthetic joint infection in another joint increases risk three-fold of prosthetic joint infection after primary total knee arthroplasty. *The Bone & Joint Journal.* 2019;101-B(7_Supple_C):91-97. doi:10.1302/0301-620x.101b7.bjj-2018-1189.r1.
43. **Charnley J**. SECTION II GENERAL ORTHOPAEDICS Postoperative Infection after Total Hip Replacement with Special Reference to Air Contamination in the Operating Room. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 1972;87(9):167. doi:10.1097/00003086-197209000-00020.
44. **Cheng AG**, Dedent AC, Schneewind O, Missiakas D. A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends in Microbiology.* 2011;19(5):225-232. doi:10.1016/j.tim.2011.01.007.

45. **Cipriano CA**, Brown NM, Michael AM, Moric M, Sporer SM, Della Valle CJ. Serum and synovial fluid analysis for diagnosing chronic periprosthetic infection in patients with inflammatory arthritis. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94:594–600. doi:10.2106/JBJS.J.01318
46. **Cipriano C**, Maiti A, Hale G, Jiranek W. The host response: Toll-like receptor expression in periprosthetic tissues as a biomarker for deep joint infection. *J Bone Joint Surg Am* 2014;96:1692–1698. doi:10.2106/JBJS.M.01295.
47. **Cisek AA**, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, Wyżewski Z. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Curr Microbiol.* 2017;74(2):277–283. doi:10.1007/s00284-016-1166-x
48. **Clauditz A**, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect Immun.* 2006;74(8):4950–4953. doi:10.1128/IAI.00204-06
49. **Cooper HJ**, Della Valle CJ, Berger RA, et al. Corrosion at the head-neck taper as a cause for adverse local tissue reactions after total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(18):1655–1661. doi:10.2106/jbjs.k.01352
50. **Corvec S**, Furustrand T, Tafin U, Betrisey B, Borens O, Trampuz A. Activities of fosfomycin, tigecycline, colistin, and gentamicin against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a foreign-body infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57:1421–1427. doi:10.1128/AAC.01718-12
51. **Costerton JW**. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science.* 1999;284(5418):1318–1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318
52. **Costerton JW**. *The Biofilm Primer*. Springer, Berlin, Heidelberg; 2007. 5-15. ISBN 978-3-540-68021-5. doi: 10.1007/b136878
53. **Costerton JW**, Post JC, Ehrlich GD, Hu FZ, Kreft R, Nistico L, et al. New methods for the detection of orthopedic and other biofilm infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2011;61(2):133–140. doi:10.1111/j.1574-695x.2010.00766.x
54. **Coventry MB**. Treatment of infections occurring in total hip surgery. *Orthop Clin North Am.* 1975;6(04):991–1003. PMID:1178168
55. **Cyteval C**, Bourdon A. Imaging orthopedic implant infections. *Diagnostic and Interventional Imaging.* 2012;93(6):547-557. doi:10.1016/j.diii.2012.03.004.
56. **Darouiche RO**, Dhir A, Miller AJ, Landon GC, Raad II, Musher DM. Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *J Infect Dis* 1994;170:720–723. doi:10.1093/infdis/170.3.720.
57. **Darouiche RO**, Hamill RJ. Antibiotic penetration of and bactericidal activity within endothelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(5):1059–1064. doi:10.1128/aac.38.5.1059
58. **Darouiche RO**. Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *New England Journal of Medicine*, 2004;350(14), 1422–1429. doi:10.1056/nejmra035415
59. **Darouiche RO**, Mansouri MD, Zakarevicz D, Alsharif A, Landon GC. In vivo efficacy of antimicrobial-coated devices. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89(4):792–7. doi:10.2106/JBJS.F.00414
60. **Dastgheyb SS**, Parvizi J, Shapiro IM, Hickok NJ, Otto M. Effect of biofilms on recalcitrance of staphylococcal joint infection to antibiotic treatment. *J Infect Dis* 2015;211:641–650. doi:10.1093/infdis/jiu514.
61. **Dastgheyb SS**, Villaruz AE, Le KY, et al. Role of Phenol-Soluble Modulins in Formation of *Staphylococcus aureus* Biofilms in Synovial Fluid. *Infect Immun.* 2015;83(7):2966–2975. doi:10.1128/IAI.00394-15
62. **Davison SP**, Reisman NR, Pellegrino ED, Larson EE, Dermody M, Hutchison PJ. Perioperative Guidelines for Elective Surgery in the Human Immunodeficiency Virus–Positive Patient.

- Plastic and Reconstructive Surgery*. 2008;121(5):1831-1840. doi:10.1097/prs.0b013e31816b143b.
63. **Deirmengian C**, Hallab N, Tarabishy A, Della Valle C, Jacobs JJ, Lonner J, et al. Synovial fluid biomarkers for periprosthetic infection. *Clinical orthopaedics and related research*. 2010; 468(8):2017–2023. doi:10.1007/s11999-010-1298-4
 64. **Deirmengian C**, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Parvizi J. Diagnosing periprosthetic joint infection: has the era of the biomarker arrived?. *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472(11):3254–3262. doi:10.1007/s11999-014-3543-8
 65. **Deirmengian C**, Kardos K, Kilmartin P, Cameron A, Schiller K, Parvizi J. Combined measurement of synovial fluid alpha-Defensin and C-reactive protein levels: highly accurate for diagnosing periprosthetic joint infection. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2014; 96(17):1439–1445. doi:10.2106/JBJS.M.01316
 66. **Deirmengian GK**, Zmistowski B, Jacovides C, O'Neil J, Parvizi J. Leukocytosis is common after total hip and knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(11):3031–3036. doi:10.1007/s11999-011-1887-x
 67. **Della Valle CJ**, Sporer SM, Jacobs JJ, Berger RA, Rosenberg AG, Paprosky WG. Preoperative Testing for Sepsis Before Revision Total Knee Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*. 2007;22(6):90-93. doi:10.1016/j.arth.2007.04.013.
 68. **Della Valle CJ**, Parvizi J, Bauer TW, et al. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infections of the Hip and Knee. *American Academy of Orthopaedic Surgeon*. 2010;18(12):760-770. doi:10.5435/00124635-201012000-00006.
 69. **De Vecchi E**, Villa F, Bortolin M, Toscano M, Tacchini L, Romano CL, Drago L. Leucocyte esterase, glucose and C-reactive protein in the diagnosis of prosthetic joint infections: a prospective study. *Clin Microbiol Infec*. 2016;22:555-560. doi:10.1016/j.cmi.2016.03.020.
 70. **De Vecchi E**, Romanò CL, Grandi RD, Cappelletti L, Villa F, Drago L. Alpha defensin, leukocyte esterase, C-reactive protein, and leukocyte count in synovial fluid for pre-operative diagnosis of periprosthetic infection. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2018;32:205873841880607. doi:10.1177/2058738418806072.
 71. **Diaz-Ledezma C**, Espinosa-Mendoza R, Gallo J, et al. General Assembly, Diagnosis, Imaging: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. *The Journal of Arthroplasty*. 2019;34(2):215-223 doi:10.1016/j.arth.2018.09.073.
 72. **Di Cesare PE**, Chang E, Preston CF, Liu C-J. Serum Interleukin-6 As A Marker Of Periprosthetic Infection Following Total Hip And Knee Arthroplasty. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2005;87(9):1921-1927. doi:10.2106/00004623-200509000-00003.
 73. **Diekema DJ**, Pfaller MA, Schmitz, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis*. 2001;32(Suppl. 2):S114-S132. doi: 10.1086/320184
 74. **Dinneen A**, Guyot A, Clements J, Bradley N. Synovial fluid white cell and differential count in the diagnosis or exclusion of prosthetic joint infection. *The Bone & Joint Journal*. 2013;95-B(4):554-557. doi:10.1302/0301-620x.95b4.30388.
 75. **Donlan RM**. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in Microbiology*. 2009;17(2):66-72. doi:10.1016/j.tim.2008.11.002.
 76. **Doroshenko N**, Tseng BS, Howlin RP, et al. Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(12):7273–7282. doi: 10.1128/AAC.03132-

77. **Drago L**, Boot W, Dimas K, et al. Does implant coating with antibacterial-loaded hydrogel reduce bacterial colonization and biofilm formation in vitro?. *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472(11):3311–3323. doi:10.1007/s11999-014-3558-1
78. **Driffield K**, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;61(5), 1053–1056. doi:10.1093/jac/dkn044
79. **Dunne WM Jr**, Mason EO Jr, Kaplan SL. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(12):2522–2526. doi:10.1128/aac.37.12.2522
80. **Eckhart L**, Fischer H, Barken KB, Tolker-Nielsen T, Tschachler E. DNase1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Dermatology*, 2007;156(6), 1342–1345. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.07886.x
81. **Ehrensberger MT**, Tobias ME, Nodzo SR, Hansen LA, Luke-Marshall NR, Cole RF, Wild LM, Campagnari AA. Cathodic voltage-controlled electrical stimulation of titanium implants as treatment for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* periprosthetic infections. *Biomaterials*. 2015;41:97–105. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.11.013.
82. **Ensing GT**, Roeder BL, Nelson JL, Van Horn JR, Van Der Mei HC, Busscher HJ, Pitt WG. Effect of pulsed ultrasound in combination with gentamicin on bacterial viability in biofilms on bone cements in vivo. *J Appl Microbiol*. 2005;99(3):443–448. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02643.x
83. **Elgeidi A**, Elganainy AE, Abou Elkhier N, Rakha S. Interleukin-6 and other inflammatory markers in diagnosis of periprosthetic joint infection. *International Orthopaedics*. 2014;38(12), 2591–2595. doi:10.1007/s00264-014-2475-y
84. **Ellsworth B**, Kamath AF. Malnutrition and Total Joint Arthroplasty. *J Nat Sci*. 2016;2(3):e179. PMID: 27376151
85. **Erdemli B**, Özbek EA, Başarir K, Karahan ZC, Öcal D, Biriken D. Proinflammatory biomarkers' level and functional genetic polymorphisms in periprosthetic joint infection. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2018;52(2):143–147. doi:10.1016/j.aott.2017.11.002
86. **Estellés A**, Woischnig AK, Liu K, et al. A High-Affinity Native Human Antibody Disrupts Biofilm from *Staphylococcus aureus* Bacteria and Potentiates Antibiotic Efficacy in a Mouse Implant Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(4):2292–2301. doi:10.1128/AAC.02588-15
87. **Ettinger M**, Calliess T, Kielstein JT, et al. Circulating Biomarkers for Discrimination Between Aseptic Joint Failure, Low-Grade Infection, and High-Grade Septic Failure. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;61(3):332-341. doi:10.1093/cid/civ286.
88. **Evans JT**, Walker RW, Evans JP, Blom AW, Sayers A, Whitehouse MR. How long does a knee replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up. *The Lancet*. 2019;393(10172), 655–663. doi:10.1016/s0140-6736(18)32531-5
89. **Evans JT**, Evans JP, Walker RW, Blom AW, Whitehouse MR, Sayers A. How long does a hip replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up. *The Lancet*. 2019b;393(10172), 647–654. doi:10.1016/s0140-6736(18)31665-9
90. **Fassel TA**, Edmiston CE. [15] Bacterial biofilms: Strategies for preparing glycocalyx for electron microscopy. *Biofilms Methods in Enzymology*. 1999:194-203. doi:10.1016/s0076-6879(99)10017-x.

91. **Fillerová R**, Gallo J, Radvanský M, Kraiczová V, Kudelka M, Kriegová E. Excellent Diagnostic Characteristics for Ultrafast Gene Profiling of DEFA1-IL1B-LTF in Detection of Prosthetic Joint Infections. *J Clin Microbiol.* 2017;55(9):2686–2697. doi:10.1128/JCM.00558-17
92. **Flemming HC**, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology.* 2010;8(9), 623–633. doi:10.1038/nrmicro2415
93. **Flo T**, Smith K, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature.* 432, 917–921 (2004). doi: 10.1038/nature03104
94. **Forrest KY**, Stuhldreher WL. Prevalence and correlates of vitamin D deficiency in US adults. *Nutr Res* 2011;31:48–54. doi:10.1016/j.nutres.2010.12.001.
95. **Foruria AM**, Fox TJ, Sperling JW, Cofield RH. Clinical meaning of unexpected positive cultures (UPC) in revision shoulder arthroplasty. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery.* 2013;22(5): 620–627. doi:10.1016/j.jse.2012.07.017
96. **Frangiamore SJ**, Saleh A, Farias Kovac M, Grosso MJ, Zhang X, Bauer TW, et al. Synovial fluid interleukin-6 as a predictor of periprosthetic shoulder infection. *The Journal of bone and joint surgery American volume.* 2015; 97(1):63–70. doi:10.2106/JBJS.N.00104
97. **Frangiamore SJ**, Saleh A, Grosso MJ, Farias Kovac M, Zhang X, Daly TM, et al. Neer Award 2015: Analysis of cytokine profiles in the diagnosis of periprosthetic joint infections of the shoulder. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery.* 2017;26(2):186–196. doi:10.1016/j.jse.2016.07.017
98. **Frank KL**, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(3):888–895. doi:10.1128/AAC.01052-06
99. **Freney J**, Brun Y, Bes M, et al. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., Two Species from Human Clinical Specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1988;38(2):168-172. doi:10.1099/00207713-38-2-168.
100. **Furnes O**, Espehaug B, Lie SA, et al. Failure mechanisms after unicompartmental and tricompartmental primary knee replacement with cement. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:519. doi:10.2106/JBJS.F.00210
101. **Furukawa TA**, Strauss SE, Bucher HC, Agoritsas T, Guyatt G. Diagnostic tests. In: User's Guides to the medical literature. 3rd edition. Guyatt G, editor. New York: McGraw-Hill Professional; 2014. 345-357
102. **Fux CA**, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology.* 2005;13(1): 34–40. doi:10.1016/j.tim.2004.11.010
103. **Gahukamble AD**, McDowell A, Post V, et al. *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus lugdunensis* cause pyogenic osteomyelitis in an intramedullary nail model in rabbits. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1595–1606. doi:10.1128/JCM.03197-13
104. **Galat DD**, McGovern SC, Larson DR, Harrington JR, Hanssen AD, Clarke HD. Surgical Treatment of Early Wound Complications Following Primary Total Knee Arthroplasty. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume.* 2009;91(1):48–54. doi:10.2106/jbjs.g.01371
105. **Gallardo-Moreno AM**, Pacha-Olivenza MA, Saldaña L, et al. In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation. *Acta Biomater* 2009;5:181–192. doi: 10.1016/j.actbio.2008.07.028
106. **Gallo J**, Landor I, Vavřík P. Současné možnosti prevence infekcí kloubních náhrad. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Českoslovaca.* 2006;73(4)229-236.
107. **Gallo J**, Kolář M, Dendis M, Lovečková Y, Sauer P, Zapletalová J, Koukalová D. Culture and PCR analysis of joint fluid in the diagnosis of prosthetic joint infection. *New Microbiol* 2008;31(1):97-104. PMID:18437847

108. **Gallo J**, Smižanský M, Kolář M. Recidiva nebo reinfekce TEP kyčelního kloubu? Příspěvek k diskusi o patogenezi periprotetické infekce. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Českoslovaca*. 2009;76(3):243-246.
109. **Gallo J**, Smižanský M, Radová L, Potomková J. Porovnání léčebných postupů používaných v terapii infekce kloubních náhrad kyčle a kolena. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Českoslovaca*. 2009;76(4):302-309
110. **Gallo J**, Holinka M, Moucha CS. Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants. *Int J Mol Sci* 2014;15:13849–13880. doi: 10.3390/ijms150813849
111. **Gallo J**, Jurášková J, Svoboda M, Zapletalová J. Excellent AUC for joint fluid cytology in the detection/exclusion of hip and knee prosthetic joint infection. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2017;161(3): 310-319. doi: 10.5507/bp.2017.021.
112. **Gallo J**. Předoperační diagnostika infekcí kloubních náhrad. *Ortopedie*. 2017;11(2):75-81
113. **Gao G**, Lange D, Hilpert K, Kindrachuk J, Zou Y, Cheng JTJ, et al. The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides. *Biomaterials*. 2011;32(16), 3899–3909. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.013
114. **Gbejuade HO**, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthop*. 2015;86(2):147–158. doi:10.3109/17453674.2014.966290
115. **Ghanem E**, Parvizi J, Clohisy J, Burnett S, Sharkey PF, Barrack R. Perioperative antibiotics should not be withheld in proven cases of periprosthetic infection. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;461:44-47.
116. **Ghanem E**, Parvizi J, Burnett RSJ, Sharkey PF, Keshavarzi N, Aggarwal A, Barrack RL. Cell Count and Differential of Aspirated Fluid in the Diagnosis of Infection at the Site of Total Knee Arthroplasty. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 2008;90(8): 1637–1643. doi:10.2106/jbjs.g.00470
117. **Ghanem E**, Houssock C, Pulido L, Han S, Jaber FM, Parvizi J. Determining “True” Leukocytosis in Bloody Joint Aspiration. *The Journal of Arthroplasty*, 2008;23(2):182–187. doi:10.1016/j.arth.2007.08.016
118. **Glehr M**, Friesenbichler J, Hofmann G, et al. Novel biomarkers to detect infection in revision hip and knee arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res*. 2013;471(8):2621–2628. doi:10.1007/s11999-013-2998-3
119. **Goldring SR**, Schiller AL, Roelke M, Rourke SM, O’Neil DA, Harris WH. The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg Am* 1983;65:575–584. doi:10.2106/00004623-198365050-00001
120. **Gollwitzer H**, Dombrowski Y, Proding PM, Peric M, Summer B, Hapfelmeier A, et al. Antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines in periprosthetic joint infection. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2013; 95(7):644–651. doi:10.2106/JBJS.L.00205 PMID: 23553300.
121. **Gómez AV**, Fernández-Pittol MJ, Muñoz-Mahamud E, Morata L, Bosch J, Vila J, et al. Evaluation of Lipocalin-2 as a biomarker of periprosthetic joint infection. *The Journal of Arthroplasty*. 2019;34(1):123-125. doi:10.1016/j.arth.2018.09.047
122. **Gomez E**, Cazanave C, Cunningham SA, Greenwood-Quaintance KE, Steckelberg JM, Uhl JR, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Osmon DR, Berbari EF, Mandrekar J, Patel R. Prosthetic joint infection diagnosis using broad-range PCR of biofilms dislodged from knee and hip arthroplasty surfaces using sonication. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3501–3508. 10.1128/JCM.00834-12

123. **Gómez-Barrena E**, Esteban J, Medel F, Molina-Manso D, Ortiz-Pérez A, et al. Bacterial adherence to separated modular components in joint prosthesis: a clinical study. *J Orthop Res*. 2012;30(10):1634-1639. doi: 10.1002/jor.22114.
124. **Goodman SB**, Yao Z, Keeney M, Yang F. The future of biologic coatings for orthopaedic implants. *Biomaterials*. 2013;34(13):3174–83.
125. **Goodman SM**, Springer B, Guyatt G, Abdel MP, Dasa V, George M, et al. 2017 American College of Rheumatology/American Association of Hip and Knee Surgeons Guideline for the Perioperative Management of Antirheumatic Medication in Patients With Rheumatic Diseases Undergoing Elective Total Hip or Total Knee Arthroplasty. *Arthritis & Rheumatology*. 2017;69(8):1538–1551. doi:10.1002/art.40149
126. **Goswami K**, Parvizi J. Culture-negative periprosthetic joint infection: is there a diagnostic role for next-generation sequencing? *Expert Rev Mol Diagn*. 2020;20(3):269-272. doi: 10.1080/14737159.2020.1707080.
127. **Gries CM**, Kielian T. Staphylococcal Biofilms and Immune Polarization During Prosthetic Joint Infection. *J Am Acad Orthop Surg*. 2017;25 Suppl 1(Suppl 1):S20–S24. doi:10.5435/JAAOS-D-16-00636
128. **Gristina AG**, Naylor P, Myrvik Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Medical Progress through Technology*. 1988-1989;14(3-4):205-224. PMID:2978593
129. **Grosso MJ**, Frangiamore SJ, Saleh A, Kovac MF, Hayashi R, et al. Poor utility of serum interleukin-6 levels to predict indolent periprosthetic shoulder infections. *J Shoulder Elbow Surg*. 2014;23(9):1277-1281. doi: 10.1016/j.jse.2013.12.023.
130. **Guenther F**, Stroh P, Wagner C, Obst U, Hänsch GM. Phagocytosis of staphylococci biofilms by polymorphonuclear neutrophils: *S. aureus* and *S. epidermidis* differ with regard to their susceptibility towards the host defense. *Int J Artif Organs* 2009;32: 565–573. doi:10.1177/039139880903200905
131. **Gundtoft PH**, Overgaard S, Schønheyder HC, Møller JK, Kjærsgaard-Andersen P, Pedersen AB. The "true" incidence of surgically treated deep prosthetic joint infection after 32,896 primary total hip arthroplasties: a prospective cohort study. *Acta Orthop*. 2015;86(3):326–334. doi:10.3109/17453674.2015.1011983
132. **Günther F**, Wabnitz GH, Stroh P, Prior B, Obst U, Samstag Y, et al. Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms infection: phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Mol. Immunol*. 2009;46, 1805–1813. 10.1016/j.molimm.2009.01.020
133. **Hall-Stoodley L**, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95–108.
134. **Hanke ML**, Heim CE, Angle A, Sanderson SD, Kielian T. Targeting Macrophage Activation for the Prevention and Treatment of *Staphylococcus aureus* Biofilm Infections. *The Journal of Immunology*. 2013;190(5):2159-2168. doi:10.4049/jimmunol.1202348.
135. **Hanssen AD**, Osmon DR. The Use of Prophylactic Antimicrobial Agents During and After Hip Arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1999;369:124-138. doi:10.1097/00003086-199912000-00013.
136. **Hardes J**, Ahrens H, Gebert C, et al. Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans. *Biomaterials*. 2007;28(18):2869-2875. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.02.033.
137. **Heilmann C**, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol*. 1996;20(5):1083–1091.

138. **Heim CE**, Vidlak D, Scherr TD, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Contribute to Staphylococcus aureus Orthopedic Biofilm Infection. *The Journal of Immunology*. 2014; 192(8):3778-3792. doi:10.4049/jimmunol.1303408.
139. **Hexter AT**, Hislop SM, Blunn GW, Liddle AD. The effect of bearing surface on risk of periprosthetic joint infection in total hip arthroplasty. *The Bone & Joint Journal*. 2018;100-B(2): 134–142. doi:10.1302/0301-620x.100b2.bjj-2017-0575.r1
140. **Hoell S**, Borgers L, Gosheger G, Dieckmann R, Schulz D, Gerss J, Harges J. Interleukin-6 in two-stage revision arthroplasty. *The Bone & Joint Journal*. 2015;97-B(1):71–75. doi:10.1302/0301-620x.97b1.33802
141. **Hoenders CSM**, Harmsen MC, van Luyn MJA. The local inflammatory environment and microorganisms in “aseptic” loosening of hip prostheses. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;86:291–301. doi:10.1002/jbm.b.30992
142. **Højiby N**, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;35(4):322–332. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
143. **Holinka J**, Bauer L, Hirschl AM, Graninger W, Windhager R, Presterl E. Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection. *J Orthop Res* 2011;29(4):617-622. doi: 10.1002/jor.21286.
144. **Honda M** et al. Quantitative analysis of serum IL-6 and its correlation with increased levels of serum IL-2R in HIV-induced diseases. *The Journal of Immunology*. 1990;145(12):4059-4064. PMID:2258606
145. **Honsawek S**, Deepaisarnsakul B, Tanavalee A, et al. Relationship of serum IL-6, C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, and knee skin temperature after total knee arthroplasty: a prospective study. *Int Orthop*. 2011;35(1):31–35. doi:10.1007/s00264-010-0973-0
146. **Inabathula A**, Dilley JE, Ziemba-Davis M, Warth LC, Azzam KA, Ireland PH, Meneghini RM. Extended Oral Antibiotic Prophylaxis in High-Risk Patients Substantially Reduces Primary Total Hip and Knee Arthroplasty 90-Day Infection Rate. *J Bone Joint Surg Am*. 2018; 100(24):2103-2109. doi: 10.2106/JBJS.17.01485
147. **Jacovides CL**, Parvizi J, Adeli B, Jung KA. Molecular markers for diagnosis of periprosthetic joint infection. *The Journal of arthroplasty*. 2011;26(6 Suppl):99–103 doi:10.1016/j.arth.2011.03.025
148. **Jafari SM**, Coyle C, Mortazavi SM, Sharkey PF, Parvizi J. Revision hip arthroplasty: infection is the most common cause of failure. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468(8):2046–2051. doi: 10.1007/s11999-010-1251-6
149. **Jahoda D**, Nyč O, Pokorný D, Landor I, Sosna A. Antibiotika v prevenci infekčních komplikací u operací kloubních náhrad. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae čechoslovaca*. 2006;73:108–114. PMID:16735008
150. **Jahoda D**, Nyč O, Šimša J, Kučera E, Hanek P, et al. Pozdní hematogenní infekce kloubních náhrad. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Čechoslovaca*. 2008;75(2):89-92
151. **Jahoda D**, Landor I, Judl T, Vavřík P, Pokorný D, Jahodová I. Záchrané operace při infekci náhrady kolenního kloubu. *Ortopedie*. 2017;11(2):82-88
152. **James RC**, MacLeod CJ. Induction of staphylococcal infections in mice with small inocula introduced on sutures. *Br J Exp Pathol*. 1961;42(3):266–277. PMID: 13789320
153. **Jennings JA**, Carpenter DP, Troxel KS, Beenken KE, Smeltzer MS, Courtney HS, Haggard WO. Novel antibiotic-loaded point-of-care implant coating inhibits biofilm. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473(7):2270–2282. doi: 10.1007/s11999-014-4130-8.

154. **John AK**, Baldoni D, Haschke M, Rentsch K, Schaerli P, Zimmerli W, Trampuz A. Efficacy of daptomycin in implant-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of combination with rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(7):2719–2724. doi: 10.1128/AAC.00047-09.
155. **Junka A**, Szymczyk P, Ziółkowski G, et al. Bad to the Bone: On In Vitro and Ex Vivo Microbial Biofilm Ability to Directly Destroy Colonized Bone Surfaces without Participation of Host Immunity or Osteoclastogenesis. *Plos One.* 2017;12(1). doi:10.1371/journal.pone.0169565.
156. **Kapadia BH**, Cherian JJ, Issa K, Jagannathan S, Daley JA, Mont MA. Patient Compliance with Preoperative Disinfection Protocols for Lower Extremity Total Joint Arthroplasty. *Surg Technol Int.* 2015 May;26:351-4. PMID:26055031
157. **Kapadia BH**, Elmallah RK, Mont MA. A Randomized, Clinical Trial of Preadmission Chlorhexidine Skin Preparation for Lower Extremity Total Joint Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty.* 2016;31(12):2856–2861. doi:10.1016/j.arth.2016.05.043
158. **Kapadia BH**, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhave A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *Lancet.* 2016;387(10016):386-394. doi:10.1016/S0140-6736(14)61798-0.
159. **Kaplan JB**. Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes. *Int J Artif Organs.* 2009;32(9):545–54. doi: 10.1177/039139880903200903
160. **Karbysheva S**, Grigoricheva L, Golnik V, Popov S, Renz N, Trampuz A. Influence of retrieved hip- and knee-prosthesis biomaterials on microbial detection by sonication. *European Cells and Materials.* 2019;37:16–22. doi:10.22203/ecm.v037a02
161. **Katz J** et al. Association between Hospital and Surgeon Procedure Volume and the Outcomes of Total Knee Replacement. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume.* 2004;6(9):1909–1916. doi:10.2106/00004623-200409000-00008
162. **Kazemzadeh-Narbat M**, Kindrachuk J, Duan K, Jenssen H, Hancock RE, Wang R. Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials.* 2010;31(36):9519–9526. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.035.
163. **Kim K**, Zhu M, Cavadino A, Munro JT, Young SW. Failed Debridement and Implant Retention Does Not Compromise the Success of Subsequent Staged Revision in Infected Total Knee Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty.* 2019;34(6):1214-1220. doi:10.1016/j.arth.2019.01.066.
164. **Kluytmans J**, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3): 505–520. PMID:9227864
165. **Kuhn DM**, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1773–1780. doi:10.1128/aac.46.6.1773-1780.2002
166. **Kucharíková S**, et al. Covalent immobilization of antimicrobial agents on titanium prevents *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* colonization and biofilm formation. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(4):936–945. doi: 10.1093/jac/dkv437
167. **Kurtz S**, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume.* 2007;89(4):780-785. doi:10.2106/00004623-200704000-00012.
168. **Kurtz SM**, Ong KL, Schmier J, et al. Future Clinical and Economic Impact of Revision Total Hip and Knee Arthroplasty. *The Journal of Bone & Joint Surgery.* 2007;89(suppl 1):144-151. doi:10.2106/jbjs.g.00587.

169. **Kurtz SM**, Lau E, Schmier J, Ong KL, Zhao K, Parvizi J. Infection Burden for Hip and Knee Arthroplasty in the United States. *The Journal of Arthroplasty*. 2008;23(7):984–991. doi:10.1016/j.arth.2007.10.017
170. **Kurtz SM**, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic Burden of Periprosthetic Joint Infection in the United States. *The Journal of Arthroplasty*. 2012;27(8):61–65. doi:10.1016/j.arth.2012.02.022
171. **Kusuma SK**, Ward J, Jacofsky M, Sporer SM, Della Valle CJ. What is the role of serological testing between stages of two-stage reconstruction of the infected prosthetic knee?. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(4):1002–1008. doi:10.1007/s11999-010-1619-7
172. **Kutateladze M**, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*. 2010;28(12):591–595. doi:10.1016/j.tibtech.2010.08.001
173. **Lass R**, Giurea A, Kubista B, Hirschl AM, Graninger W, Presterl E, et al. Bacterial adherence to different components of total hip prosthesis in patients with prosthetic joint infection. *International Orthopaedics*. 2014;38(8):1597–1602. doi:10.1007/s00264-014-2358-2
174. **Lastinger A**, McLeod N, Dietz MJ, Guilfoose J, Sarwari AR. Clinical Experience with Tigecycline in the Treatment of Prosthetic Joint Infections. *J Bone Jt Infect*. 2019;4(3):126–132. doi:10.7150/jbji.34866
175. **Lawrence JR**, Neu TR. Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Methods Enzymol*. 1999;310:131–144. doi: 10.1016/s0076-6879(99)10011-9
176. **Lee SC**, Jung KA, Yoon JY, Nam CH, Hwang SH, Park IS. Analysis of synovial fluid in culture-negative samples of suspicious periprosthetic infections. *Orthopedics*. 2010;33(10):725. doi: 10.3928/01477447-20100826-13.
177. **Lehar SM**, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, et al. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*. 2015;527(7578):323–328. doi:10.1038/nature16057
178. **Lenguerrand E**, Whitehouse MR, Beswick AD, et al. Risk factors associated with revision for prosthetic joint infection after hip replacement: a prospective observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:1004–1014. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30755-2
179. **Lenski M**, Scherer MA. Analysis of synovial inflammatory markers to differ infectious from gouty arthritis. *Clin Biochem*. 2014;47:49-55. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.10.019.
180. **Lenski M**, Scherer MA. Synovial IL-6 as inflammatory marker in periprosthetic joint infections. *The Journal of arthroplasty*. 2014; 29(6):1105–1109. doi:10.1016/j.arth.2014.01.014
181. **Lenski M**, Scherer MA. Diagnostic potential of inflammatory markers in septic arthritis and periprosthetic joint infections: a clinical study with 719 patients. *Infect Dis (Lond)*. 2015;47:399-409. doi: 10.3109/00365548.2015.1006674.
182. **Lentino JR**. Prosthetic Joint Infections: Bane of Orthopedists, Challenge for Infectious Disease Specialists. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;36(9):1157–1161. doi:10.1086/374554
183. **Leonard HA**, Liddle AD, Burke O, Murray DW, Pandit H. Single- or two-stage revision for infected total hip arthroplasty? A systematic review of the literature. *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472:1036–1042. doi: 10.1007/s11999-013-3294-y.
184. **Lesens O**, Ferry T, Forestier E, et al. Should we expand the indications for the DAIR (debridement, antibiotic therapy, and implant retention) procedure for *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infections? A multicenter retrospective study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2018;37(10):1949-1956. doi:10.1007/s10096-018-3330-7.

185. **Lévy P-Y**, Fenollar F. The role of molecular diagnostics in implant-associated bone and joint infection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(12):1168-1175. doi:10.1111/1469-0691.12020.
186. **Lichstein P**, Gehrke T, Lombardi A, Romano C, Stockley I, Babis G, et al. One-stage versus two-stage exchange. *Journal of Orthopaedic Research*. 2014;29(2,supplement):108-111. doi:10.1002/jor.22558.
187. **Lie SA**, Havelin LI, Furnes ON, Engesæter LB, Vollset SE. Failure rates for 4762 revision total hip arthroplasties in the Norwegian Arthroplasty Register. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume*. 2004;86-B(4):504-509. doi:10.1302/0301-620x.86b4.14799.
188. **Lindström D**, Azodi OS, Wladis A, et al. Effects of a Perioperative Smoking Cessation Intervention on Postoperative Complications. *Annals of Surgery*. 2008;248(5):739-745. doi:10.1097/sla.0b013e3181889d0d.
189. **Lo CW**, Lai YK, Liu YT, Gallo RL, Huang CM. *Staphylococcus aureus* hijacks a skin commensal to intensify its virulence: immunization targeting β -hemolysin and CAMP factor. *J Invest Dermatol*. 2011;131(2):401–409. doi:10.1038/jid.2010.319
190. **Lora-Tamayo J**, et al. A Large Multicenter Study of Methicillin–Susceptible and Methicillin–Resistant *Staphylococcus aureus* Prosthetic Joint Infections Managed With Implant Retention. *Clinical Infectious Diseases*. 2013;56(2):182–194. doi:10.1093/cid/cis746.
191. **Lora-Tamayo J**, Murillo O, Bergen PJ, Nation RL, Poudyal A, Luo X, et al. Activity of colistin combined with doripenem at clinically relevant concentrations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro dynamic biofilm model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(9):2434–2442. doi:10.1093/jac/dku151
192. **Lora-Tamayo J**, Murillo O, Ariza J. Clinical Use of Colistin in Biofilm-Associated Infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology. Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*. 2019:181-195. doi:10.1007/978-3-030-16373-0_13.
193. **Love C**, Marwin SE, Palestro CJ. Nuclear Medicine and the Infected Joint Replacement. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2009;39(1):66–78. doi:10.1053/j.semnuclmed.2008.08.007
194. **Luo J**, Xiong C. Youden index and Associated Cut-points for Three Ordinal Diagnostic Groups. *Communications in Statistics - Simulation and Computation*. 2013;42(6):1213-1234. doi:10.1080/03610918.2012.661906.
195. **Lutonský M**, Kučera T, Karpaš K. Komplikace po totální endoprotéze kolenního kloubu u pacientů s revmatoidní artritidou. *Čes. Revmatol*. 2006;14(4):149–153
196. **Luu A**, Syed F, Raman G, Bhalla A, Muldoon E, Hadley S, et al. Two-Stage Arthroplasty for Prosthetic Joint Infection. *The Journal of Arthroplasty*. 2013;28(9):1490–1498. doi:10.1016/j.arth.2013.02.035
197. **Maduka-Ezeh AN**, Greenwood-Quaintance KE, Karau MJ, Barbari EF, Osmon DR, Hanssen AD, et al. Antimicrobial susceptibility and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* small colony variants associated with prosthetic joint infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012;74(3), 224–229. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.029
198. **Mah TFC**, O’Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. 2001;9(1), 34–39. doi:10.1016/s0966-842x(00)01913-2
199. **Majors I**, Jagadale VS. Serum interleukin 6 could be a valuable initial diagnostic tool in prosthetic knee joint infections. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*. 2019;29(8):1781-1788. doi:10.1007/s00590-019-02519-y.
200. **Malchau H**, Herberts P, Eisler T, Garellick G, Söderman P. The Swedish Total Hip Replacement Register. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84-A Suppl 2:2-20. doi:10.2106/00004623-200200002-00002

201. **Mandell GL**, Vest TK. Killing of intraleukocytic *Staphylococcus aureus* by rifampin: in-vitro and in-vivo studies. *J Infect Dis* 1972;125:486–490. doi: 10.1093/infdis/125.5.486
202. **Maniar RN**, Navaneedhan G, Ranvir S, Maniar AR, Dhiman A, Agrawal A. What Is the Normal Trajectory of Interleukin-6 and C-reactive Protein in the Hours and Days Immediately After TKA?. *Clin Orthop Relat Res.* 2019;477(1):41–46. doi:10.1097/CORR.0000000000000332
203. **Marchant MH Jr**, Viens NA, Cook C, Vail TP, Bolognesi MP. The impact of glycemic control and diabetes mellitus on perioperative outcomes after total joint arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91-A:1621–1629. doi:10.2106/JBJS.H.00116.
204. **Marin M**, Garcia-Lechuz JM, Alonso P, Villanueva M, Alcalá L, Gimeno M, Cercenado E, Sanchez-Somolinos M, Radice C, Bouza E. Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* 2012;50:583–589. doi:10.1128/JCM.00170-11
205. **Marson BA**, Deshmukh SR, Grindlay DJC, Scammell BE. Alpha-defensin and the Synovasure lateral flow device for the diagnosis of prosthetic joint infection. *The Bone & Joint Journal.* 2018;100-B(6): 703–711. doi:10.1302/0301-620x.100b6.bjj-2017-1563.r1
206. **Mason JB**, Fehring TK, Odum SM, Griffin WL, Nussman DS. The value of white blood cell counts before revision total knee arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty.* 2003;18(8):1038–1043. doi:10.1016/s0883-5403(03)00448-0
207. **Mauerhan DR**, Nelson CL, Smith DL, et al. Prophylaxis against infection in total joint arthroplasty. One day of cefuroxime compared with three days of cefazolin. *The Journal of Bone & Joint Surgery.* 1994;76(1):39-45. doi:10.2106/00004623-199401000-00006.
208. **McPherson EJ**, Woodson C, Holtom P, Roidis N, Shufelt C, Patzakis M. Periprosthetic total hip infection. Outcomes using a staging system. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;403:8–15. PMID: 12360001
209. **Mitchell J**, Tristan A, Foster TJ. Characterization of the fibrinogen-binding surface protein Fbl of *Staphylococcus lugdunensis*. *Microbiology.* 2004;150(11):3831-3841. doi:10.1099/mic.0.27337-0.
210. **Montanaro L**, Speziale P, Campoccia D, Ravaioli S, Cangini I, Pietrocola G, et al. Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiology.* 2011;6(11):1329–1349. doi:10.2217/fmb.11.117
211. **Morawietz L**, Classen RA, Schröder JH, Dynybil C, Perka C, Skwara A, et al. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol.* 2006;59:591–597. doi:10.1136/jcp.2005.027458
212. **Morawietz L**, Tiddens O, Mueller M, et al. Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. *Histopathology.* 2009;54(7):847–853. doi:10.1111/j.1365-2559.2009.03313.x.
213. **Morgenstern M**, Post V, Erichsen C, et al. Biofilm formation increases treatment failure in *Staphylococcus epidermidis* device-related osteomyelitis of the lower extremity in human patients. *Journal of Orthopaedic Research.* 2016;34(11):1905–1913. doi: 10.1002/jor.23218.
214. **Moriarty TF**, Harris LG, Mooney RA, Wenke JC, Riool M, et al. Recommendations for design and conduct of preclinical in vivo studies of orthopedic device-related infection. *J Orthop Res.* 2019;37(2):271-287. doi: 10.1002/jor.24230.
215. **Morris J**, Kelly N, Elliott L, Grant A, Wilkinson M, Hazratwala K, McEwen P. Evaluation of Bacteriophage Anti-Biofilm Activity for Potential Control of Orthopedic Implant-Related Infections Caused by *Staphylococcus Aureus*. *Surgical Infections.* 2019;20(1):16-24. doi:10.1089/sur.2018.135

216. **Musil D**, Balejová M, Horníková M, Chrdle A, Mallátová N, Nyč O, Chmelík V, Gallo J, Jahoda D, Stehlík J. Infekce endoprotéz – doporučení antibiotické léčby Společné doporučení České společnosti pro ortopedii a traumatologii a Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. 2017;84(3):219–230
217. **Musil D**, Stehlík J, Abrman K. Algoritmus diagnostiky a léčby u infekce kloubních náhrad. *Ortopedie*. 2017;11(2):89-96
218. **Musil D**, Šnorek M, Gallo J, Jahoda D, Stehlík J. Ekonomická analýza nákladů na hospitalizaci pacientů s infekční komplikací totální náhrady. 1. část: totální náhrada kolenního kloubu. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Czechoslovaca*. 2019;86(3):173-180
219. **Musil D**, Šnorek M, Gallo J, Jahoda D, Stehlík J. Ekonomická analýza nákladů na hospitalizaci pacientů s infekční komplikací totální náhrady. 2. část: totální náhrada kyčelního kloubu. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Czechoslovaca*. 2019;86(4):241-248
220. **Nablo BJ**, Rothrock AR, Schoenfisch MH. Nitric oxide-releasing sol-gels as antibacterial coatings for orthopedic implants. *Biomaterials*. 2005;26(8):917–924. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.03.031
221. **Nagoya S**, Kaya M, Sasaki M, Tateda K, Yamashita T. Diagnosis of peri-prosthetic infection at the hip using triple-phase bone scintigraphy. *J Bone Joint Surg Br*. 2008;90:140–144. doi: 10.1302/0301-620X.90B2.19436
222. **Namba RS**, Inacio MC, Paxton EW. Risk Factors Associated with Deep Surgical Site Infections After Primary Total Knee Arthroplasty. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2013;95(9):775–782. doi:10.2106/jbjs.l.00211
223. **Neoh KG**, Kang ET. Combating bacterial colonization on metals via polymer coatings: relevance to marine and medical applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2011;3(8):2808–2819. doi: 10.1021/am200646t.
224. **Neut D**, van Horn JR, van Kooten TG, van der Mei HC, Busscher HJ. Detection of Biomaterial-Associated Infections in Orthopaedic Joint Implants. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2003;413:261–268. doi:10.1097/01.blo.0000073345.50837.84
225. **Nilsson A**, Augustinsson A, Briheim G, Herder A, Ljunghusen O, Wahlstrom O, Ohman L. Inflammatory response in 85 patients with loosened hip prostheses: a prospective study comparing inflammatory markers in patients with aseptic and septic prosthetic loosening. *Acta Orthopaedica*. 2007;78(5):629-639. doi: 10.1080/17453670710014329
226. **Nilsson M**, Bjerketorp J, Wiebensjo A, Ljungh A, Frykberg L, Guss B. A von Willebrand factor-binding protein from *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol. Lett*. 2004;234:155-161. doi: 10.1016/j.femsle.2004.03.024
227. **Ochsner PE**, et al. Infektionen des Bewegungsapparates. Přepřacovaný dotisk 2. vydání. Grandvaux, Eigenverlag swiss orthopaedics, 2016. Str. 96-97
228. **Omar M**, Ettinger M, Reichling M, Petri M, Lichtinghagen R, Guenther D, Suero EM, Jagodzinski M, Krettek C. Preliminary results of a new test for rapid diagnosis of septic arthritis with use of leukocyte esterase and glucose reagent strips. *J Bone Joint Surg Am*. 2014;96:2032-2037. doi: 10.2106/JBJS.N.00173.
229. **Omar M**, Ettinger M, Reichling M, Petri M, Guenther D, Gehrke T, et al. Synovial C-reactive protein as a marker for chronic periprosthetic infection in total hip arthroplasty. *The Bone & Joint Journal*. 2015;97-B(2):173–176. doi:10.1302/0301-620x.97b2.34550
230. **Ortega-Peña S**, Vargas-Mendoza CF, Franco-Cendejas R, et al. sesA, sesB, sesC, sesD, sesE, sesG, sesH, and embp genes are genetic markers that differentiate commensal isolates of *Staphylococcus epidermidis* from isolates that cause prosthetic joint infection. *Infectious Diseases*. 2019;51(6):435-445. doi:10.1080/23744235.2019.1597276.

231. **Osmon DR**, Berbari EF, Berendt AR, et al. Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;56(1):e1-e25. doi:10.1093/cid/cis803.
232. **Otto M**. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(8):555–567. doi:10.1038/nrmicro2182
233. **Pajarinen J**, Jamsen E, Konttinen YT, Goodman SB. Innate immune reactions in septic and aseptic osteolysis around hip implants. *J Long-Term Eff Med Implants*. 2014;24:283–296. doi:10.1615/JLongTermEffMedImplants.2014010564
234. **Panousis K**, Grigoris P, Butcher I, Rana B, Reilly JH, Hamblen DL. Poor predictive value of broad-range PCR for the detection of arthroplasty infection in 92 cases. *Acta Orthop*. 2005;76:341–346. doi: 10.1080/00016470510030805
235. **Park KH**, Greenwood-Quaintance KE, Mandrekar J, Patel R. Activity of tedizolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental foreign body-associated osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:6568–6572. doi:10.1128/AAC.01248-16.
236. **Partridge DG**, Winnard C, Townsend R, Cooper R, Stockley I. Joint aspiration, including culture of reaspirated saline after a “dry tap”, is sensitive and specific for the diagnosis of hip and knee prosthetic joint infection. *The Bone & Joint Journal*. 2018;100-B(6), 749–754. doi:10.1302/0301-620x.100b6.bjj-2017-0970.r2
237. **Parvizi J**. Periprosthetic Infection: What Are the Diagnostic Challenges? *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)*. 2006;88(suppl_4):138-147. doi:10.2106/jbjs.f.00609.
238. **Parvizi J**, Zmistowski B, Berbari EF, et al. New definition for periprosthetic joint infection: from the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin Orthop Relat Res* 2011;469:2992–2994. doi: 10.1007/s11999-011-2102-9
239. **Parvizi J**, Jacovides C, Adeli B, Jung KA, Hozack WJ, Mark B. Coventry Award: synovial C-reactive protein: a prospective evaluation of a molecular marker for periprosthetic knee joint infection. *Clinical orthopaedics and related research*. 2012;470(1):54–60. doi:10.1007/s11999-011-1991-y
240. **Parvizi J**, McKenzie JC, Cashman JP. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection Using Synovial C-Reactive Protein. *The Journal of Arthroplasty*. 2012;27(8), 12–16. doi:10.1016/j.arth.2012.03.018
241. **Parvizi J**, Gehrke T. Definition of Periprosthetic Joint Infection. *The Journal of Arthroplasty*. 2014;29(7):1331. doi:10.1016/j.arth.2014.03.009
242. **Parvizi J**, Fassihi SC, Enayatollahi MA. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection Following Hip and Knee Arthroplasty. *Orthopedic Clinics of North America*. 2016;47(3), 505–515. doi:10.1016/j.ocl.2016.03.001
243. **Parvizi J**, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, Chen AF, Shoha N. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *The Journal of Arthroplasty*. 2018;33(5), 1309–1314. doi:10.1016/j.arth.2018.02.078
244. **Peel TN**, Cheng AC, Buising KL, Choong PF. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective?. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2386–2391. doi:10.1128/AAC.06246-11
245. **Pérez-Prieto D**, Portillo ME, Puig-Verdié L, Alier A, Martínez S, Sorlí L, et al. C-reactive protein may misdiagnose prosthetic joint infections, particularly chronic and low-grade infections. *International Orthopaedics*. 2017;41(7):1315–1319. doi:10.1007/s00264-017-3430-5
246. **Piper KE**, Jacobson MJ, Cofield RH, et al. Microbiologic diagnosis of prosthetic shoulder infection by use of implant sonication. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6):1878–1884. doi:10.1128/JCM.01686-08

247. **Polk HC**, Miles AA. The decisive period in the primary infection of muscle by *Escherichia coli*. *Br J Exp Pathol*. 1973;54(1):99–109. PMID: 4570251
248. **Portillo ME**, Salvado M, Trampuz A, Plasencia V, Rodriguez-Villasante M, Sorli L, Puig L, Horcajada JP. 2013. Sonication versus vortexing of implants for diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol*. 51:591–594. doi:10.1128/JCM.02482-12
249. **Proctor RA**, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology*, 2006;4(4):295–305. doi:10.1038/nrmicro1384
250. **Proček T**, Ryšková L, Kučera T, Šrot J, Šponer P, Gallo J, Plíšková L. Zhodnocení významu ready-made spaceru s gentamicinem ve vztahu k bakteriologickým nálezům u pacientů s infekcí kloubní náhrady. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol*. 2014;63(2):142-148
251. **Pruzansky JS**, Bronson MJ, Grelsamer RP, Strauss E, Moucha CS. Prevalence of Modifiable Surgical Site Infection Risk Factors in Hip and Knee Joint Arthroplasty Patients at an Urban Academic Hospital. *The Journal of Arthroplasty*. 2014;29(2):272–276. doi:10.1016/j.arth.2013.06.019
252. **Puhto A-P**, Puhto T, Syrjala H. Short-course antibiotics for prosthetic joint infections treated with prosthesis retention. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(11):1143-1148. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03693.x.
253. **Puig-Verdié L**, Alentorn-Geli E, González-Cuevas A, Sorlí L, Salvadó M, Alier A, et al. Implant sonication increases the diagnostic accuracy of infection in patients with delayed, but not early, orthopaedic implant failure. *The Bone & Joint Journal*. 2013;95-B(2):244–249. doi:10.1302/0301-620x.95b2.30486
254. **Qu X**, Zhai Z, Wu C, Jin F, Li H, Wang L, Liu G, Liu X, Wang W, Zhang X, Zhu Z, Dai K. 2013. Preoperative aspiration culture for preoperative diagnosis of infection in total hip or knee arthroplasty. *J Clin Microbiol*. 51:3830–3834. doi:10.1128/JCM.01467-13
255. **Rani SA**, Pitts B, Beyenal H, Veluchamy RA, Lewandowski Z, Davison WM, et al. (2007). Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol*. 2007;189:4223–4233. doi:10.1128/JB.00107-07
256. **Rapi J**, Tomáš T. Artikulační spacer kolenního kloubu jako metoda volby při sanaci infekce totální endoprotézy kolene. *Ortopedie*. 2017;11(2):69-72
257. **Rejman D**, Rabatinová A, Pombinho AR, Kovačková S, Pohl R, Zborníková E, et al. Lipophosphonoxins: New Modular Molecular Structures with Significant Antibacterial Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2011;54(22):7884–7898. doi:10.1021/jm2009343
258. **Ricciardi BF**, Muthukrishnan G, Masters E, Ninomiya M, Lee CC, Schwarz EM. *Staphylococcus aureus* Evasion of Host Immunity in the Setting of Prosthetic Joint Infection: Biofilm and Beyond. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2018;11(3):389–400. doi:10.1007/s12178-018-9501-4
259. **Rochford ET**, Richards RG, Moriarty TF. Influence of material on the development of device-associated infections. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(12):1162–7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.04002.x.
260. **Ronde-Oustau C**, Diesinger Y, Jenny JY, Antoni M, Gaudias J, Boeri C, et al. Diagnostic accuracy of intra-articular C-reactive protein assay in periprosthetic knee joint infection—a preliminary study. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2014;100(2):217–220. doi:10.1016/j.otsr.2013.10.017
261. **Rowan FE**, Donaldson MJ, Pietrzak JR, Haddad FS. The Role of One-Stage Exchange for Prosthetic Joint Infection. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2018;11(3):370–379. doi:10.1007/s12178-018-9499-7

262. **Sambri A**, Cadossi M, Giannini S, Pignatti G, Marcacci M, Neri MP, et al. Is treatment with dithiothreitol more effective than sonication for the diagnosis of prosthetic joint infection? *Clin Orthop Relat Res*. 2018;476:137–145. doi:10.1007/s11999-0000000000000060
263. **Scherr TD**, Roux CM, Hanke ML, Angle A, Dunman PM, et al. Global transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to innate immune cells. *Infect Immun*. 2013;81:4363–4376. doi:10.1128/IAI.00819-13
264. **Schinsky MF**, Della Valle CJ, Sporer SM, Paprosky WG. Perioperative Testing for Joint Infection in Patients Undergoing Revision Total Hip Arthroplasty. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2008;90(9):1869–1875. doi:10.2106/jbjs.g.01255
265. **Schwartz AJ** et al. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection After Unicompartamental Knee Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*. 2012;27(8):46–50. doi:10.1016/j.arth.2012.03.033
266. **Sendi P**, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants in Prosthetic Joint Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2006;43(8):961–967. doi:10.1086/507633
267. **Sendi P**, Banderet F, Graber P et al. Clinical comparison between exogenous and haematogenous periprosthetic joint infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1098–1100. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03510.x.
268. **Shah NB**, Osmon DR, Steckelberg JM, et al. Pseudomonas Prosthetic Joint Infections: A Review of 102 Episodes. *J Bone Jt Infect*. 2016;1:25–30. doi:10.7150/jbji.15722
269. **Shahi A**, Kheir MM, Tarabichi M, Hosseinzadeh HRS, Tan TL, Parvizi J. Serum d-dimer test is promising for the diagnosis of periprosthetic joint infection and timing of reimplantation. *J Bone Joint Surg Am*. 2017;99:1419–1427. doi:10.2106/JBJS.16.01395.
270. **Shih LY**, Wu JJ, Yang DJ. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein values in patients with total hip arthroplasty. *Clin Orthop*. 1987;225:238-46. PMID:3677512
271. **Shmerling RH**, Delbanco TL, Tosteson AN, Trentham DE. Synovial fluid tests. What should be ordered? *JAMA J Am Med Assoc*. 1990;264:1009-1014. PMID:2198352
272. **Shukla SK**, Ward JP, Jacofsky MC, Sporer SM, Paprosky WG, Della Valle CJ. Perioperative Testing for Persistent Sepsis Following Resection Arthroplasty of the Hip for Periprosthetic Infection. *The Journal of Arthroplasty*. 2010;25(6):87–91. doi:10.1016/j.arth.2010.05.006
273. **Sims NA**, Walsh NC. GP130 cytokines and bone remodelling in health and disease. *BMB Rep*. 2010;43(8):513-523. doi:10.5483/bmbrep.2010.43.8.513
274. **Singh R**, Ray P, Das A, Sharma M. Enhanced production of exopolysaccharide matrix and biofilm by a menadione-auxotrophic *Staphylococcus aureus* small-colony variant. *Journal of Medical Microbiology*. 2010;59(5), 521–527. doi:10.1099/jmm.0.017046-0
275. **Skråmm I**, Fossum Moen AE, Årøen A, Bukholm G. Surgical Site Infections in Orthopaedic Surgery Demonstrate Clones Similar to Those in Orthopaedic *Staphylococcus aureus* Nasal Carriers. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2014;96(11):882–888. doi:10.2106/jbjs.m.00919
276. **Sloan M**, Premkumar A, Sheth NP. Projected Volume of Primary Total Joint Arthroplasty in the U.S., 2014 to 2030. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2018;100(17):1455–1460. doi:10.2106/jbjs.17.01617
277. **Sorrentino R**, Cochis A, Azzimonti B, et al. Reduced bacterial adhesion on ceramics used for arthroplasty applications. *J Eur Ceram Soc* 2018;38:963–970. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2017.10.008
278. **Sousa R**, Serrano P, Gomes Dias J, Oliveira JC, Oliveira A. Improving the accuracy of synovial fluid analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection with simple and inexpensive

- biomarkers. *The Bone & Joint Journal*. 2017;99-B(3):351–357. doi:10.1302/0301-620x.99b3.bjj-2016-0684.r1
279. **Spagnolo AM**, Ottria G, Amicizia D, Perdelli F, Cristina ML. Operating theatre quality and prevention of surgical site infections. *J Prev Med Hyg*. 2013;54(3):131–137. PMID: 24783890
280. **Spangehl MJ**, Masri BA, O’Connell JX, Duncan CP. Prospective analysis of pre-operative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Am*. 1999; 81-A:672–83. doi:10.2106/00004623-199905000-00008
281. **Spiliopoulou AI**, Kolonitsiou F, Krevvata MI, Leontsinidis M, Wilkinson TS, Mack D, et al. Bacterial adhesion, intracellular survival and cytokine induction upon stimulation of mononuclear cells with planktonic or biofilm phase *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol. Lett*. 2012;330:56–65. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02533.x
282. **Spirit AA**, Assal A, Hansen ST. Complication and failure after total ankle arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86: 1172–1178. doi: 10.2106/00004623-200406000-00008
283. **Springer BD**, Cahue S, Etkin CD, Lewallen DG, McGrory BJ. Infection burden in total hip and knee arthroplasties: an international registry-based perspective. *Arthroplast Today*. 2017;3(2):137–140. doi:10.1016/j.artd.2017.05.003
284. **Steckelberg JM**, Osmon DR. Prosthetic joint infection. In: Waldvogel FA, Bisno AL, eds. *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*. Washington, DC: ASM Press, 2000; 173–209.
285. **Stefánsdóttir A**, Johansson D, Knutson K, Lidgren L, Robertsson O. Microbiology of the infected knee arthroplasty: report from the Swedish Knee Arthroplasty Register on 426 surgically revised cases. *Scand J Infect Dis*. 2009;41(11-12):831–840. doi:10.3109/00365540903186207.
286. **Stewart PS**, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358:135–138. doi:10.1016/s0140-6736(01)05321-1
287. **Stone WZ**, Gray CF, Parvataneni HK, Al-Rashid M, Vlasak RG, Horodyski M, Prieto HA. Clinical Evaluation of Synovial Alpha Defensin and Synovial C-Reactive Protein in the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2018;100(14):1184–1190. doi:10.2106/jbjs.17.00556
288. **Stoodley P**, Conti SF, DeMeo PJ, Nistico L, Melton-Kreft R, Johnson S, et al. Characterization of a mixed MRSA/MRSE biofilm in an explanted total ankle arthroplasty. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2011;62(1):66–74. doi:10.1111/j.1574-695x.2011.00793.x
289. **Svoboda M**, Gallo J, Zapletalová J, Prošková J, Juráňová J, Lovečková Y. Stanovení hladiny glukózy, laktátu, NGAL a KEB výpotku u infekcí TEP kyčlí a kolen. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae čechoslovaca*. 2020;
290. **Šponer P**, Kučera T, Pellar D. Komplikace endoprotéz u diabetiků. *Vnitř Lék* 2015;61(6):567-570
291. **Tan H**, Peng Z, Li Q, Xu X, Guo S, Tang T. The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus. *Biomaterials*. 2012;33(2):365–77. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.084.
292. **Tan TY**, Ng SY, He J. Microbiological characteristics, presumptive identification, and antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus lugdunensis*. *J Clin Microbiol*. 2008;46(7):2393–2395. doi: 10.1128/JCM.00740-08
293. **Tande AJ**, Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(2):302–345. doi:10.1128/CMR.00111-13

294. **Taneja A**, El-Bakoury A, Khong H, Railton P, Sharma R, Johnston KD, et al. Association between Allogeneic Blood Transfusion and Wound Infection after Total Hip or Knee Arthroplasty: A Retrospective Case-Control Study. *Journal of Bone and Joint Infection*. 2019;4(2):99–105. doi:10.7150/jbji.30636
295. **Tetreault MW**, Wetters NG, Aggarwal VK, Moric M, Segreti J, Huddleston JI, III, Parvizi J, Della Valle CJ. Should draining wounds and sinuses associated with hip and knee arthroplasties be cultured? *J Arthroplasty*. 2013;28:133–136. doi:10.1016/j.arth.2013.04.057
296. **Tetreault MW**, Wetters NG, Moric M, Gross CE, Della Valle CJ. Is synovial C-reactive protein a useful marker for periprosthetic joint infection? *Clinical orthopaedics and related research*. 2014;472(12):3997–4003. doi:10.1007/s11999-014-3828-y
297. **Tomáš T**, Nachtnabl L, Ondrůšek Š, Rapi J, Langer R. Léčba periprotetické infekce pomocí debridement s ponecháním implantátu. *Ortopedie*. 2017;11(2):60–66.
298. **Toms AD**, Davidson D, Masri BA, Duncan CP. The management of peri-prosthetic infection in total joint arthroplasty. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*. 2006;88-B(2):149–155. doi:10.1302/0301-620x.88b2.17058
299. **Tornero E**, Morata L, Martinez-Pastor JC, Angulo S, Combalia A, Bori G, Garcia-Ramiro S, Bosch J, Mensa J, Soriano A. Importance of selection and duration of antibiotic regimen in prosthetic joint infections treated with debridement and implant retention. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1395–1401. doi:10.1093/jac/dkv481
300. **Trampuz A**, Osmon DR, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R. Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;414:69–88. doi:10.1097/01.blo.0000087324.60612.93
301. **Trampuz A**, Steckelberg JM, Osmon DR, Cockerill FR, Hanssen AD, Patel R. Advances in the laboratory diagnosis of prosthetic joint infection. *Reviews in Medical Microbiology*. 2003;14(1):1–14. doi:10.1097/00013542-200301000-00001.
302. **Trampuz A**, Hanssen AD, Osmon DR, Mandrekar J, Steckelberg JM, Patel R. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. *The American Journal of Medicine*. 2004;117(8):556–562. doi:10.1016/j.amjmed.2004.06.022
303. **Trampuz A**, Piper KE, Hanssen AD, et al. Sonication of Explanted Prosthetic Components in Bags for Diagnosis of Prosthetic Joint Infection Is Associated with Risk of Contamination. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(2):628–631. doi:10.1128/jcm.44.2.628-631.2006.
304. **Trampuz A**, Zimmerli W. Antimicrobial agents in orthopaedic surgery: Prophylaxis and treatment. *Drugs*. 2006;66(8):1089–1105. doi:10.2165/00003495-200666080-00005
305. **Trampuz A**, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. (2007). Sonication of Removed Hip and Knee Prostheses for Diagnosis of Infection. *New England Journal of Medicine*. 357(7):654–663. doi:10.1056/nejmoa061588
306. **Trampuz A**, Murphy CK, Rothstein DM, Widmer AF, Landmann R, Zimmerli W. Efficacy of a novel rifamycin derivative, ABI-0043, against *Staphylococcus aureus* in an experimental model of foreign-body infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(7):2540–2545. doi:10.1128/AAC.00120-07
307. **Trampuz A**, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis. *Current Infectious Disease Reports*. 2008;10(5):394–403. doi:10.1007/s11908-008-0064-1
308. **Trindade R**, Albrektsson T, Tengvall P, Wennerberg A. Foreign body reaction to biomaterials: on mechanisms for buildup and breakdown of osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016;18:192–203. doi:10.1111/cid.12274

309. **Tsaras G**, Osmon DR, Mabry T, et al. Incidence, secular trends, and outcomes of prosthetic joint infection: a population-based study, olmsted county, Minnesota, 1969-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012;33(12):1207–1212. doi:10.1086/668421
310. **Tsaras G**, Maduka-Ezeh A, Inwards CY, Mabry T, Erwin PJ, Murad MH, Montori VM, West CP, Osmon DR, Barbari EF. Utility of intraoperative frozen section histopathology in the diagnosis of periprosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94:1700–1711. doi:10.2106/JBJS.J.00756
311. **Tsukayama DT**, Estrada R, Gustilo RB. Infection after total hip arthroplasty. A study of one hundred and six infections. *J Bone Joint Surg Am.* 1996;78:512–23. doi: 10.2106/00004623-199604000-00005
312. **Tsukayama DT**, Goldberg VM, Kyle R. Diagnosis and management of infection after total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A01:75–80. doi: 10.2106/00004623-200300001-00014
313. **Tyner H**, Patel R. *Propionibacterium acnes* biofilm – A sanctuary for *Staphylococcus aureus*? *Anaerobe.* 2016;40:63–67. doi:10.1016/j.anaerobe.2016.05.014
314. **Valour F**, Dutronc H, Dinh A, Cazorla C, Pavèse P, Lesens O, et al. Difficult-to-treat Gram-negative bone and joint infections: efficacy and safety of prolonged intravenous colistin. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2013;41(2):197–199. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.09.016
315. **Vandenesch F**, Etienne J, Reverdy ME, Eykyn SJ. Endocarditis Due to *Staphylococcus lugdunensis*: Report of 11 Cases and Review. *Clinical Infectious Diseases.* 1993;17(5):871-876. doi:10.1093/clinids/17.5.871.
316. **van der Mee-Marquet N**, Achard A, Mereghetti L, Danton A, Minier M, Quentin R. *Staphylococcus lugdunensis* Infections: High Frequency of Inguinal Area Carriage. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003;41(4):1404-1409. doi:10.1128/jcm.41.4.1404-1409.2003.
317. **Vanderstappen C**, Verhoeven N, Bellemans J. Intra-articular versus serum C-reactive protein analysis in suspected periprosthetic knee joint infection. *Acta Orthop Belg.* 2013;79:326-330. PMID:23926737
318. **Vanvelk N**, Morgenstern M, Moriarty TF, Richards RG, Nijs S, Metsemakers WJ. Preclinical in vivo models of fracture-related infection: a systematic review and critical appraisal. *Eur Cell Mater.* 2018;36:184-199. doi: 10.22203/eCM.v036a14.
319. **Vasso M**, Schiavone Panni A. Low-grade periprosthetic knee infection: diagnosis and management. *Journal of Orthopaedics and Traumatology.* 2014;16(1):1–7. doi:10.1007/s10195-014-0294-y
320. **Vavřík P**, et al. The national register of joint replacements of the Czech republic. *Acta Chir. orthop. Traum. čech.* 2014;81 Suppl. 3-68. PMID:25105887
321. **Večeřová R**, Bogdanová K, Rejman D, Gallo J, Kolář M. Vliv lipofosfonoxinů na inhibici bakteriální kolonizace kostních cementů. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2016;65(3):171-176
322. **Večeřová R**. Možnosti testování antimikrobní aktivity stávajících a nově vyvíjených látek. Doktorská disertační práce. 2017. Univerzita Palackého v Olomouci. https://theses.cz/id/b5vgfx/DP_final.pdf
323. **Verbeken G**, Pirnay JP, Lavigne R, et al. Call for a dedicated European legal framework for bacteriophage therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014;62(2):117–129. doi:10.1007/s00005-014-0269-y
324. **Vicenti G**, et al. Serum biomarkers in the diagnosis of periprosthetic joint infection: consolidated evidence and recent developments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;23(2 Suppl):43-50. doi:10.26355/eurrev_201904_17473

325. **Villacis D**, Merriman JA, Yalamanchili R, Omid R, Itamura J, Rick Hatch GF. Serum Interleukin-6 as a Marker of Periprosthetic Shoulder Infection. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2014;96(1):41–45. doi:10.2106/jbjs.l.01634
326. **von Eiff C, Peters G, Heilmann C**. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect. Dis*. 2002;2:677–685. doi:10.1016/s1473-3099(02)00438-3
327. **Vuong C**, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, et al. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol*. 2004;6:269–275. doi:10.1046/j.1462-5822.2004.00367.x
328. **Wafa H**, Grimer RJ, Reddy K, Jeys L, Abudu A, Carter SR, Tillman RM. Retrospective evaluation of the incidence of early periprosthetic infection with silver-treated endoprostheses in high-risk patients: case-control study. *Bone Joint J*. 2015;97-B(2):252–257. doi: 10.1302/0301-620X.97B2.34554.
329. **Wertheim HF**, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JA, et al. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *The Lancet*, 2004;364(9435):703–705. doi:10.1016/s0140-6736(04)16897-9
330. **Williams DL**, Costerton JW. Using biofilms as initial inocula in animal models of biofilm-related infections. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2011;100B(4):1163–1169. doi:10.1002/jbm.b.31979
331. **Wimmer MD**, Ploeger MM, Friedrich MJ, Bornemann R, Roessler PP, Gravius S, et al. The QuickLine IL-6 lateral flow immunoassay improves the rapid intraoperative diagnosis of suspected periprosthetic joint infections. *Technol Health Care*. 2016;24(6):927–932. doi:10.3233/THC-161247
332. **Wirtz DC**, Heller KD, Miltner O, Zilkens KW, Wolff JM. Interleukin-6: a potential inflammatory marker after total joint replacement. *Int Orthop*. 2000;24(4):194–196. doi:10.1007/s002640000136
333. **Wittebole X**, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*. 2014;5(1):226–235. doi:10.4161/viru.25991
334. **Wolcott RD**, Rhoads DD, Bennett ME, Wolcott BM, Gogokhia L, Costerton JW, Dowd SE. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *Journal of Wound Care*. 2010;19(2):45–53. doi:10.12968/jowc.2010.19.2.46966
335. **Worthington T**, Dunlop D, Casey A, Lambert P, Luscombe J, Elliott T. Serum procalcitonin, interleukin-6, soluble intercellular adhesin molecule-1 and IgG to shortchain exocellular lipoteichoic acid as predictors of infection in total joint prosthesis revision. *British Journal of Biomedical Science*. 2010;67(2):71–76. doi:10.1080/09674845.2010.11730294
336. **Wouthuyzen-Bakker M**, Ploegmakers JJW, Ottink K, Kampinga GA, Wagenmakers-Huizenga L, Jutte PC, Kobold ACM. Synovial Calprotectin: An Inexpensive Biomarker to Exclude a Chronic Prosthetic Joint Infection. *J Arthroplasty*. 2018;33(4):1149–1153. doi: 10.1016/j.arth.2017.11.006.
337. **Wyles CC**, Larson DR, Houdek MT, Sierra RJ, Trousdale RT. Utility of Synovial Fluid Aspirations in Failed Metal-On-Metal Total Hip Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*. 2013;28(5):818–823. doi:10.1016/j.arth.2012.11.006
338. **Xie K**, Qu X, Yan M. Procalcitonin and α -Defensin for Diagnosis of Periprosthetic Joint Infections. *The Journal of Arthroplasty*. 2017;32(4):1387–1394. doi:10.1016/j.arth.2016.10.001

339. **Yilmaz C**, Colak M, Yilmaz BC, Ersoz G, Kutateladze M, Gozlugol M. Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95(2):117–125. doi: 10.2106/JBJS.K.01135.
340. **Yokogawa N**, Ishikawa M, Nishitani K, et al. Immunotherapy synergizes with debridement and antibiotic therapy in a murine 1-stage exchange model of MRSA implant-associated osteomyelitis. *J Orthop Res*. 2018;36(6):1590–1598. doi:10.1002/jor.23801
341. **Yoon BH**, Ha YC, Lee YK, Koo KH. Postoperative Deep Infection After Cemented Versus Cementless Total Hip Arthroplasty: A Meta-Analysis. *The Journal of Arthroplasty*. 2015;30(10):1823–1827. doi:10.1016/j.arth.2015.04.041
342. **Zapotoczna M**, McCarthy H, Rudkin JK, O’Gara JP, O’Neill E. An essential role for coagulase in *Staphylococcus aureus* biofilm development reveals new therapeutic possibilities for device-related infections. *J Infect Dis*. 2015;212:1883–1893. doi:10.1093/infdis/jiv319
343. **Zatorska B**, Groger M, Moser D, Diab-Elschahawi M, Lusignani LS, Presterl E. Does Extracellular DNA Production Vary in Staphylococcal Biofilms Isolated From Infected Implants versus Controls? *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2017;475(8):2105–2113. doi: 10.1007/s11999-017-5266-0.
344. **Zeller V**, Ghorbani A, Strady C, Leonard P, Mamoudy P, Desplace, N. *Propionibacterium acnes*: An agent of prosthetic joint infection and colonization. *Journal of Infection*. 2007;55(2):119–124. doi:10.1016/j.jinf.2007.02.006
345. **Zimmerli W**, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger UE. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis*. 1982;146:487–497. doi:10.1093/infdis/146.4.487
346. **Zimmerli W**, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-Joint Infections. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(16):1645–1654. doi:10.1056/nejmra040181
347. **Zimmerli W**. Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *Journal of Internal Medicine*. 2014;276(2):111–119. doi:10.1111/joim.12233
348. **Zmistowski B**, Fedorka CJ, Sheehan E, Deirmengian G, Austin MS, Parvizi J. Prosthetic Joint Infection Caused by Gram-Negative Organisms. *The Journal of Arthroplasty*. 2011;26(6):104–108. doi:10.1016/j.arth.2011.03.044
349. **Zmistowski B**, Restrepo C, Huang R, Hozack WJ, Parvizi J. Periprosthetic Joint Infection Diagnosis. *The Journal of Arthroplasty*. 2012;27(9):1589–1593. doi:10.1016/j.arth.2012.03.059
350. **Zmistowski B**, et al. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *J Orthop Res*. 2014;32: 98–107. doi:10.1002/jor.22553
351. **Zmistowski B**, Della Valle C, Bauer TW, Malizos KN, Alavi A, Bedair H, et al. Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *The Journal of Arthroplasty*. 2014;29(2):77–83. doi:10.1016/j.arth.2013.09.040

Internetové zdroje:

352. **Americký registr kloubních náhrad**. Výroční zpráva 2018. Fifth AJRR Annual Report on Hip and Knee Arthroplasty Data, AAOS, AJRR, 2018 http://ajrr.net/images/annual_reports/AAOS-AJRR-2018-Annual-Report-final.pdf?hsCtaTracking=c794b145-8b50-405a-af5c-666a0841a730%7C6996bb53-5b74-4d65-bb51-b24f37c55c9d
353. **Bottagisio M**, Soggiu A, Piras C, et al. Proteomic Analysis Reveals a Biofilm-Like Behavior of Planktonic Aggregates of *Staphylococcus epidermidis* Grown Under Environmental Pressure/Stress. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10. doi:10.3389/fmicb.2019.01909.

354. **Cao Y**, Su B, Chinnaraj S, et al. Nanostructured titanium surfaces exhibit recalcitrance towards *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Sci Rep* 2018;8:1071 doi: 10.1038/s41598-018-19484-x
355. **Carcinogens** Report Adds Seven Agents. *Cancer Discovery*. <https://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/7/1/5.1>. Published January 1, 2017. Accessed February 18, 2020
356. **Catterall JB**, Stabler TV, Flannery CR, Kraus VB. Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(6):R229. doi:10.1186/ar3216
357. **Chopra R**, Shaikh S, Chatzinoff Y, et al. Employing high-frequency alternating magnetic fields for the non-invasive treatment of prosthetic joint infections. *Sci Rep*. 2017;7(1):7520. doi:10.1038/s41598-017-07321-6
358. **Flammier S**, Rasigade JP, Badiou C, Henry T, Vandenesch F, Laurent F, et al. Human monocyte-derived osteoclasts are targeted by staphylococcal pore-forming toxins and superantigens. *PLoS One* 2016;11:e0150693. doi:10.1371/journal.pone.0150693
359. **Gallo J**, Svoboda M, Zapletalová J, Prošková J, Juráňová J. Serum IL-6 in combination with synovial IL-6/CRP shows excellent diagnostic power to detect hip and knee prosthetic joint infection. *PLoS ONE*. 2018;13(6):e0199226. doi:10.1371/journal.pone.0199226
360. **Gutiérrez D**, Hidalgo-Cantabrana C, Rodríguez A, García P, Ruas-Madiedo P. Monitoring in Real Time the Formation and Removal of Biofilms from Clinical Related Pathogens Using an Impedance-Based Technology. *PLoS ONE*. 2016;11(10). doi:10.1371/journal.pone.0163966
361. **Heim CE**, West SC, Ali H, Kielian T. Heterogeneity of Ly6G Ly6C Myeloid-Derived Suppressor Cell Infiltrates during *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection. *Infection and Immunity*. 2018;86(12). doi:10.1128/iai.00684-18.
362. **Huang J**, Zhang Y, Wang Z, et al. The serum level of D-Dimer is not suitable for distinguishing between prosthetic joint infection and aseptic loosening. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2019;14(1). doi:10.1186/s13018-019-1461-x.
363. **Ibáñez de Aldecoa AL**, Zafra O, González-Pastor JE. Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8. doi:10.3389/fmicb.2017.01390.
364. **Jørgensen NP**, Skovdal SM, Meyer RL, Dagnæs-Hansen F, Fuursted K, Petersen E. Rifampicin-containing combinations are superior to combinations of vancomycin, linezolid and daptomycin against *Staphylococcus aureus* biofilm infection in vivo and in vitro. *Pathog Dis*. 2016;74(4) doi:10.1093/femspd/ftw019.
365. **Josse J**, Velard F, Gangloff SC. *Staphylococcus aureus* vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015;5:85. doi:10.3389/fcimb.2015.00085.
366. **Josse J**, Valour F, Maali Y, et al. Interaction Between Staphylococcal Biofilm and Bone: How Does the Presence of Biofilm Promote Prosthesis Loosening? *Frontiers in Microbiology*. 2019;10. doi:10.3389/fmicb.2019.01602.
367. **Lenguerrand E**, Whitehouse MR, Beswick AD, Toms AD, Porter ML, Blom AW. Description of the rates, trends and surgical burden associated with revision for prosthetic joint infection following primary and revision knee replacements in England and Wales: an analysis of the National Joint Registry for England, Wales, Northern Ireland and the Isle of Man. *BMJ Open*. 2017;7(7). doi:10.1136/bmjopen-2016-014056.
368. **Li C**, Ojeda-Thies C, Trampuz A. Culture of periprosthetic tissue in blood culture bottles for diagnosing periprosthetic joint infection. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2019;20(1). doi:10.1186/s12891-019-2683-0.
369. **Li C**, Margaryan D, Ojeda-Thies C, et al. Meta-analysis of serum and/or plasma D-dimer in the diagnosis of periprosthetic joint infection. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*.

2020. doi:10.21203/rs.2.21286/v1+ (Před tištěným vydáním publikováno elektronicky, dostupné na Research Square)
370. **Löwik CAM**, Parvizi J, Jutte PC, et al. Debridement, antibiotics and implant retention is a viable treatment option for early periprosthetic joint infection presenting more than four weeks after index arthroplasty. *Clinical Infectious Diseases*. 2019. doi:10.1093/cid/ciz867. (Před tištěným vydáním publikováno elektronicky)
 371. **National Joint Registry of England, Wales, Northern Ireland, and the Isle of Man**. Výroční zpráva 2018. https://reports.njrcentre.org.uk/hips-all-procedures-activity/H03v2NJR?reportid=FFCEA144-54BC-486D-81A6-C6A58DDCA079&defaults=DC__Reporting_Period__Date__Range=%22MAX%22,JYS__Filter__Calendar_Year__From__To=%22min-max%22,R__Filter__Country=%22All%22,H__Filter__Joint=%22Hip%22
 372. **Panova N**, Zborníková E, Šimák O, Pohl R, Kolář M, Bogdanová K, et al. Insights into the Mechanism of Action of Bactericidal Lipophosphonoxins. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145918. doi:10.1371/journal.pone.0145918
 373. **Peel TN**. Studying Biofilm and Clinical Issues in Orthopedics. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10. doi:10.3389/fmicb.2019.00359.
 374. **Peng K-T**, Hsieh C-C, Huang T-Y, et al. *Staphylococcus aureus* biofilm elicits the expansion, activation and polarization of myeloid-derived suppressor cells in vivo and in vitro. *Plos One*. 2017;12(8). doi:10.1371/journal.pone.0183271.
 375. **Qu PF**, Xu C, Fu J, Li R, Chai W, Chen JY. Does serum interleukin-6 guide the diagnosis of persistent infection in two-stage hip revision for periprosthetic joint infection?. *J Orthop Surg Res*. 2019;14(1):354. doi:10.1186/s13018-019-1448-7
 376. **Qu X**, Zhai Z, Liu X, et al. Evaluation of white cell count and differential in synovial fluid for diagnosing infections after total hip or knee arthroplasty. *PLoS One*. 2014;9(1):e84751. doi:10.1371/journal.pone.0084751
 377. **Randau TM**, Friedrich MJ, Wimmer MD, Reichert B, Kuberra D, Stoffel-Wagner B, et al. Interleukin-6 in serum and in synovial fluid enhances the differentiation between periprosthetic joint infection and aseptic loosening. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e89045. doi:10.1371/journal.pone.0089045
 378. **Ratka C**, Weigl P, Henrich D, Koch F, Schlee M, Zipprich H. The Effect of In Vitro Electrolytic Cleaning on Biofilm-Contaminated Implant Surfaces. *J Clin Med*. 2019;8(9):1397. Published 2019 Sep 6. doi:10.3390/jcm8091397
 379. **Romanò CL**, Scarponi S, Gallazzi E, Romanò D, Drago L. Antibacterial coating of implants in orthopaedics and trauma: a classification proposal in an evolving panorama. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2015;10(1). doi:10.1186/s13018-015-0294-5.
 380. **Scherr TD**, Hanke ML, Huang O, et al. *Staphylococcus aureus* Biofilms Induce Macrophage Dysfunction Through Leukocidin AB and Alpha-Toxin. *mBio*. 2015;6(4):e01021-15. doi:10.1128/mbio.01021-15.
 381. **Schwartz K**, Syed AK, Stephenson RE, Rickard AH, Boles BR. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog*. 2012;8:e1002744. doi:10.1371/journal.ppat.1002744
 382. **Stewart PS**. Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiol Spectr*. 2015;3:MB-0010-2014. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014.
 383. **Šťáhelová A**, Mrázek F, Smižanský M, Petřek M, Gallo J. Variation in the IL1B, TNF and IL6 genes and individual susceptibility to prosthetic joint infection. *BMC Immunol*. 2012;13:25. Published 2012 May 8. doi:10.1186/1471-2172-13-25

384. **Surveillance of surgical site infections in NHS hospitals in England.** April 2016 to March 2017. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/666465/SSI_annual_report_NHS_hospitals_2016-17.pdf
385. **Swedish Hip Arthroplasty Registry.** Annual Report 2017. https://registercentrum.blob.core.windows.net/shpr/r/Eng_Arsrapport_2017_Hoftprotes_final-Syx2fJPhMN.pdf
386. **Swedish Knee Arthroplasty Register.** Annual Report 2018. <http://www.myknee.se/en/start/207-annual-report-2019-english-version>
387. **Tan J, Wang J, Yang C, et al.** Antimicrobial characteristics of Berberine against prosthetic joint infection-related *Staphylococcus aureus* of different multi-locus sequence types. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2019;19(1). doi:10.1186/s12906-019-2558-9.
388. **Tiemann A, Hofmann GO, Krukemeyer MG, Krenn V, Langwald S.** Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score (HOES) - an innovative approach to histopathological diagnostics and scoring of osteomyelitis. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW*. 2014;3:Doc08. Published 2014 Oct 20. doi:10.3205/iprs000049
389. **Výstup z českého Národního registru kloubních náhrad** <http://www.uzis.cz/registry-nzis/nrkn>
390. **Wollenberg MS, et al.** Propionibacterium-produced coproporphyrin III induces *Staphylococcus aureus* aggregation and biofilm formation. *mBio*. 2014;5(4):p.e01286 doi:10.1128/mBio.01286-14
391. **Xie K, Dai K, Qu X, Yan M.** Serum and Synovial Fluid Interleukin-6 for the Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection. *Scientific reports*. 2017;7(1):1496. doi:10.1038/s41598017-01713-4
392. **Yan Q, Karau MJ, Raval YS, Patel R.** Evaluation of Oritavancin Combinations with Rifampin, Gentamicin, or Linezolid against Prosthetic Joint Infection-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms by Time-Kill Assays. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(10):e00943-18. doi:10.1128/AAC.00943-18
393. **Zatorska B, Arciola CR, Haffner N, Segagni Lusignani L, Presterl E, Diab-Elschahawi M.** Bacterial Extracellular DNA Production Is Associated with Outcome of Prosthetic Joint Infections. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1067413. doi:10.1155/2018/1067413
394. **Zhu H, Guo Z, Liu W.** Adhesion behaviors on superhydrophobic surfaces. *Chemical Communications*. 2014;50(30):3900. doi:10.1039/c3cc47818a.
395. **Zimmerli W, Sendi P.** Role of Rifampin against Staphylococcal Biofilm Infections In Vitro, in Animal Models, and in Orthopedic-Device-Related Infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(2):e01746-18. doi:10.1128/AAC.01746-18

Seznam příloh – publikace autora disertační práce

1. Gallo J, Juráňová J, Svoboda M, Zapletalová J (2017). Excellent AUC for joint fluid cytology in the detection/exclusion of hip and knee prosthetic joint infection. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 2017;161(3):310-319. doi: 10.5507/bp.2017.021.
Impaktový faktor 2017: **1,22**
2. Gallo J, Svoboda M, Zapletalová J, Prošková J, Juráňová J. Serum IL-6 in combination with synovial IL-6/CRP shows excellent diagnostic power to detect hip and knee prosthetic joint infection. *PLoS One*. 2018;13(6):e0199226. Published 2018 Jun 21. doi:10.1371/journal.pone.0199226
Impaktový faktor 2018: **2,776**
3. Diaz-Ledezma C, Espinosa-Mendoza R, Gallo J, Glaudemans A, Gómez-García F, Goodman S, ... Svoboda M (2018). General Assembly, Diagnosis, Imaging: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. *The Journal of Arthroplasty*. 2018;34(2):215-223. doi:10.1016/j.arth.2018.09.073
Impaktový faktor 2018: **3,524**
4. Svoboda M, Gallo J, Mrňková M. Antibiotika v kostním cementu. *Klin Farmakol Farm* 2017;31(4):18-24
5. Svoboda M, Gallo J, Zapletalová J, Prošková J, Juráňová J, Lovečková Y. Stanovení hladiny glukózy, laktátu, NGAL a KEB ve výpotku u infekcí TEP kolen a kyčlí. Přijato redakcí *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae čechoslovaca*.
Impaktový faktor 2018: **0,456**

Souhrnný impaktový faktor všech prací: 7,976