



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

**Základní mikrobiologické vyšetření hemokultur  
v automatickém hemokultivačním systému**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Hana Žáková

**Vedoucí práce:** prim. MUDr. Věra Kůrková

České Budějovice 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Základní mikrobiologické vyšetření hemokultur v automatickém hemokultivačním systému jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 12. 8. 2019

.....

### **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala prim. MUDr. Věře Kůrkové za vedení této bakalářské práce, odbornou pomoc při jejím zpracování a poskytnutí všech potřebných informací a dat. Také Nemocnici Písek, a.s., zvláště mikrobiologickému oddělení, kde probíhala praktická část práce. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu.

# **Základní mikrobiologické vyšetření hemokultur v automatickém hemokultivačním systému**

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce je zaměřena na téma vyšetření hemokultur v automatickém hemokultivačním systému. V teoretické části se věnuje zejména obecným pojmům přítomnosti bakterií v krvi a rozvoji sepse, dále popsání nejčastějších infekčních agens v hemokulturách u odlišných skupin pacientů a také různým typům hemokultivačních systémů od starších po nejnovější. Jsou popsány manuální systémy, jako např. Septi-Chek a Oxoid Signal systém, a automatizované systémy BACTEC a Bact/Alert, které pracují na odlišných principech. Rozebráno je také následné zpracování vzorků k identifikaci mikrobiálních původců a zjištění jejich citlivosti na antibiotika. Cílem je osvojit si praktické zpracování hemokultur v automatickém hemokultivačním systému BACTEC. Metodická část je věnována přípravě a zpracování vzorků pro hemokultivaci, následnému postupu inokulace na kultivační půdy a zhotovení mikroskopického preparátu barveného dle Grama. Dále se práce zabývá statistickým zpracováním dat poskytnutých na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Písek, a.s., kde probíhalo také osvojení zpracování hemokultur. Statistické šetření bylo prováděno za účelem zjištění mikrobiálního spektra v hemokulturách a procenta pozitivit k celkovému počtu odebraných hemokultur v letech 2014-2018. Za zkoumané období bylo vyšetřeno celkem 9136 hemokultur od 3027 pacientů. Z celkového počtu hemokultur bylo pozitivních 1663, tzn. 18 %. 82 % hemokultur bylo negativních, nevykazovaly růst mikroorganismů. Mikrobiální spektrum je velmi široké, k nejčastějším nálezům patří, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Klebsiella species*.

## **Klíčová slova**

Bakteriémie; sepse; infekce krevního řečiště; hemokultura; hemokultivační systém

# **The basic microbiological examination of blood cultures in the automated blood culture system**

## **Abstract**

This bachelor thesis is focused on examination of blood cultures in automatic blood culture system. In the theoretical part, it deals mainly with general terms of the presence of bacteria in the blood and the development of sepsis, as well as with the description of the most frequent infectious agents in blood cultures in different groups of patients and also with different types from the oldest to newest blood culture systems. Manual systems are described, such as Septi-Chek and Oxoid Signal System, and automated BACTEC and Bact / Alert systems that work on different principles. Also discussed is the subsequent processing of samples to identify microbial agents and determine their susceptibility to antibiotics. The aim was to acquire practical processing of blood cultures in automatic BACTEC hemocultivation system. The methodical part is devoted to the preparation and processing of samples for hemoculture, the subsequent procedure of inoculation on the cultivation soil and the preparation of a microscopic preparation stained by Gram. Furthermore, the thesis deals with the statistical processing of data provided at the microbiological department of the Nemocnice Písek, a.s. The statistical survey was carried out in order to determine the microbial spectrum in blood cultures and the percentage of positivity to the total number of collected blood cultures in 2014-2018. A total of 9136 blood cultures from 3027 patients were examined during the study period. Of the total number, 1663 were positive, i.e. 18 %. 82 % of blood cultures were negative, did not show growth of microorganisms. The microbial spectrum is very wide, with *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella species*.

## **Keywords**

Bacteraemia; sepsis; bloodstream infection; bloodculture; bloodculture system

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| Úvod.....   | 8  |
| 1 Teoretická část .....                                     | 9  |
| 1.1 Bakteriémie .....                                       | 9  |
| 1.2 Infekce krevního řečiště.....                           | 9  |
| 1.3 Sepse .....   | 9  |
| 1.4 Infekce krevního řečiště u různých skupin pacientů..... | 10 |
| 1.4.1 Ambulantní pacienti.....                              | 10 |
| 1.4.2 Nemocniční pacienti .....                             | 10 |
| 1.4.3 Novorozenci a děti .....                              | 11 |
| 1.4.4 Imunokompromitovaní pacienti.....                     | 11 |
| 1.5 Nejčastější původci infekcí krevního řečiště .....      | 11 |
| 1.5.1 Enterobakterie .....                                  | 11 |
| 1.5.2 Pyogenní koky .....                                   | 12 |
| 1.5.3 Grampozitivní tyčky .....                             | 15 |
| 1.5.4 Gramnegativní tyčky.....                              | 15 |
| 1.5.5 Anaerobní bakterie.....                               | 16 |
| 1.5.6 Kvasinky .....  | 17 |
| 1.6 Mikrobiologické vyšetření hemokultur .....              | 17 |
| 1.6.1 Odběr a transport hemokultur .....                    | 17 |
| 1.6.2 Manuální hemokultivační systémy .....                 | 18 |
| 1.6.3 Automatizované hemokultivační systémy.....            | 20 |
| 1.6.4 Mikroskopie a kultivace.....                          | 22 |
| 1.6.5 Identifikace .....                                    | 23 |
| 1.6.6 Vyšetření citlivosti .....                            | 23 |
| 2 Cíle práce .....  | 24 |
| 3 Metodika .....  | 25 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Princip metodické části .....           | 25 |
| 3.2 Příprava vzorků .....                   | 25 |
| 3.3 Zpracování vzorků .....                 | 25 |
| 3.4 Vložení lahviček do přístroje .....     | 26 |
| 3.5 Pozitivní lahvičky .....                | 26 |
| 3.6 Zpracování pozitivních hemokultur ..... | 27 |
| 3.7 Hodnocení výsledků hemokultivace .....  | 28 |
| 4 Výsledky .....                            | 29 |
| 4.1 Mikrobiální spektrum .....              | 33 |
| 4.2 Procento pozitivit .....                | 40 |
| 5 Diskuze .....                             | 43 |
| 6 Závěr .....                               | 46 |
| 7 Seznam použité literatury .....           | 47 |
| 8 Seznam tabulek a obrázků .....            | 53 |
| Příloha .....                               | 54 |
| Seznam zkratk .....                         | 59 |

## Úvod

Vyšetření hemokultur je v dnešní době nezastupitelnou metodou v klinických mikrobiologických laboratořích. Je to aktuální téma, jímž se bude bakalářská práce hlouběji zabývat. Metoda hemokultivace slouží k průkazu mikroorganismů v krevním oběhu. Tyto mikroorganismy vyvolávají bakteriémii a následnou infekci krevního řečiště, která může být doprovázena lokalizovaným infekčním onemocněním. Ve vážnějších případech dochází k rozvoji sepse. Jako infekční agens se uplatňují zvláště bakterie, v menším měřítku také viry, paraziti a houby. Vyplavení bakterií do krevního oběhu je provázeno vzestupem teploty, zimnicí a třesavkou. Nejčastěji je metoda hemokultivace spojená s diagnózou urosepse, pneumonie, katérové sepse, spondylodiscitidy a endokarditidy.

Mikrobiologické hemokultivační vyšetření má za úkol určit etiologii onemocnění s následným stanovením citlivosti původce na antibiotika. V této době jsou k dispozici automatizované hemokultivační systémy, které velmi usnadňují práci v laboratoři. Díky kontinuálnímu monitorování hemokultur je detekce mikrobiálního růstu výrazně rychlejší a je omezeno riziko kontaminace.

V teoretické části se práce věnuje obecným pojmům infekce krevního řečiště a sepse, výčtu nejčastějších mikrobiálních agens vzhledem k jednotlivým skupinám pacientů a přiblížení těchto původců. Dále jsou popsány různé hemokultivační systémy od manuálních až po nejmodernější kontinuálně monitorující. V metodické části této bakalářské práce je rozebráno zpracování hemokultur v automatickém hemokultivačním systému BACTEC. Statistickým šetřením je zjištěno mikrobiální spektrum v hemokulturách vyšetřených na oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a.s. v letech 2014-2018 a také se práce zabývá procentem pozitivních vzorků vzhledem k celkovému počtu odebraných hemokultur za stejné období.



# 1 Teoretická část

## 1.1 Bakteriémie

Bakteriémie je stav, kdy se v krevním oběhu vyskytují životaschopné bakterie a mohou způsobit rozvoj infekce krevního řečiště (Čermák, 2008).

- Nízká – 10 až 20 bakterií v 1 ml krve
- Střední – 50 bakterií v 1 ml krve
- Vysoká – 80 a více bakterií v 1 ml krve

## 1.2 Infekce krevního řečiště

Jako infekce krevního řečiště se označuje přítomnost bakteriálních nebo mykotických mikroorganismů cirkulujících v krevním řečišti. Dále se mohou také uplatnit viry a paraziti. Tito původci vyvolávají zánětlivou reakci, která je charakterizována změnou klinických a laboratorních parametrů. Infekce krevního řečiště může být doprovázena nebo způsobena lokalizovaným infekčním onemocněním. Nejčastější jsou endokarditida, pneumonie, urosepse a katéetrová seps (Viscoli, 2016).

Infekce krevního řečiště je nejčastější příčinou rozvoje sepse. Zda se infekce klinicky projeví jako seps, záleží na virulenci daného původce. Infekce vyvolané málo virulentním kmenem mohou mít mírnější projevy zavádějící k jiným diagnózám. Rozeznáváme primární a sekundární infekce krevního řečiště. Mezi primární se řadí infekce neznámého původu, jejichž zdroj se nachází přímo v krevním oběhu. Infekce sekundární mají zdroj v místě mimo krevní řečiště, v jiném orgánovém systému (Čermák, 2008).

## 1.3 Seps

Systémová zánětlivá reakce organismu navozená diseminovanou infekcí nebo těžkou lokalizovanou infekcí provázena přítomností mikroorganismů v krevním oběhu se nazývá seps. Za diseminovanou považujeme infekci rozšířenou do mnoha lokalit v těle. Tento stav je život ohrožující a dochází k němu, když odpověď organismu na infekci poškozuje vlastní tkáň a orgány. Seps vede k šokovému stavu, selhání orgánů a smrti, pokud není včas rozpoznána a okamžitě léčena (Rozsypal, 2015; Ward a Levy, 2017).

Sepse je hlavní příčinou morbidit a úmrtnosti u pacientů v kritickém stavu na jednotkách intenzivní péče, přestože je používána moderní antibiotická a resuscitační léčba. Výsledky léčby se celkově v dnešní době zlepšily pravděpodobně kvůli většímu zaměření na včasnou diagnózu a další zlepšení v podpůrné péči, ale úmrtnost zůstává stále vysoká. Incidence se za posledních deset let zvýšila více než dvojnásobně (Gül et al., 2017).

Podle kohortní studie údajů z kampaně Surviving Sepsis Campaign se úmrtnost na jednotkách intenzivní péče v Evropě pohybuje okolo 41 % a v USA 28,3 %. V Austrálii a na Novém Zélandu byla provedena studie v letech 2000-2012 zahrnující 101 064 pacientů s těžkou sepsí, podle které se míra úmrtnosti v průběhu let snížila a nakonec dosáhla 18-20 % (Levy et al., 2012; Kaukonen et al., 2014).

#### **1.4 Infekce krevního řečiště u různých skupin pacientů**

##### **1.4.1 Ambulantní pacienti**

Pro potřeby této práce jsou do této skupiny zařazeni pacienti, u nichž byla hemokultura odebrána na ambulanci. Jako původci se uplatňují *Escherichia coli* a další bakterie z čeledi *Enterobacterales*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, beta-hemolytické streptokoky, *Neisseria meningitidis*. Pro těhotné ženy je nebezpečná *Listeria monocytogenes*, která může způsobit postižení plodu až septický potrat. U pacientů s endokarditidou se uplatňují koaguláza negativní stafylokoky, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium species* (Scharfen, 2013).

##### **1.4.2 Nemocniční pacienti**

Pro potřeby této práce řadíme mezi nemocniční dospělé pacienty takové, u nichž infekce vznikla v průběhu hospitalizace. Infekce se objevuje v důsledku provádění invazivních zákroků, dialyzační péče, antibiotické léčby nebo umělé ventilace. Původci se liší podle délky hospitalizace a typu pacientů. Obvyklými izoláty jsou koaguláza negativní stafylokoky (možná kontaminace), *Escherichia coli* a jiné bakterie čeledi *Enterobacterales*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, enterokoky, kvasinky, anaerobní mikroorganismy a *Burkholderia cepacia* komplex (Scharfen, 2013). Uplatňují se také multirezistentní kmeny např. meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) nebo ESBL (Extended Spectrum Beta-

Lactamases) kmeny gramnegativních bakterií, které produkují enzymy, jež způsobují rezistenci k antibiotikům (Průcha a kol, 2015).

#### **1.4.3 Novorozenci a děti**

Etiologie infekcí krevního řečiště u malých dětí prošla za poslední roky změnou. Díky očkování se snížil počet infekcí, které vyvolával *Haemophilus influenzae b*. Nejčastějšími původci jsou *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. U novorozenců se může rozvinout takzvaná časná novorozenecká sepe, jež se objeví do tří dnů po porodu nebo pozdní, která vzniká později a může být způsobena také rezistentními nemocničnými kmeny. Jako etiologická agens se u novorozenců uplatňují *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, plasmakoaguláza negativní stafylokoky, *Candida albicans* (Muntau, 2009; Scharfen, 2013).

#### **1.4.4 Imunokompromitovaní pacienti**

Do této skupiny patří např. pacienti s autoimunitním onemocněním, imunosupresivní léčbou, AIDS, po transplantaci kostní dřeně nebo orgánů, onkologičtí pacienti. U osob s imunodeficiencí, ať už vrozenou či získanou, je sepe hlavní příčinou úmrtí. Dochází u nich totiž k poruše buněčné imunity, fagocytózy, komplementu a tvorby protilátek, což zvyšuje riziko infekce. Jako etiologické agens se u nich mimo jiné uplatňují bakterie přirozené mikroflóry např. koaguláza negativní stafylokoky, enterokoky, viridující streptokoky (Scharfen, 2013).

### **1.5 Nejčastější původci infekcí krevního řečiště**

#### **1.5.1 Enterobakterie**

Bakterie z čeledi *Enterobacterales* jsou gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky. Nejvýznamnějšími rody jsou *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter* a *Serratia*. Ve střevě působí nejen jako komenzálové, saprofyté, ale některé z nich také jako patogeny. Uplatňují se i mimo gastrointestinální trakt nejčastěji při infekci urogenitálního systému. U novorozenců jsou častými původci sepe a meningitidy, u starších osob urosepe s poruchou ledvin. K přenosu enterobakterií dochází nejčastěji fekálně-orální cestou, ale také potravinami nebo endogenně (Votava a kol., 2003; Schindler, 2014).

### ***1.5.1.1 Escherichia coli***

*Escherichia coli* osidluje tlusté střevo, kde je součástí běžné mikroflóry. Pokud se dostane mimo střevo, způsobuje především infekce močových cest, infekce ran a septická onemocnění. V zažívacím traktu vyvolávají určité kmeny infekce provázené průjmy (Bednář a kol., 1996; Ehrmann a kol., 2014).

### ***1.5.1.2 Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* je nejběžnější bakterie z rodu *Klebsiella*. Je druhým nejčastějším původcem infekce močových cest (Votava a kol., 2003). Dále se také uplatňuje při vzniku meningitid u novorozenců a sepsí spojených se zdravotní péčí. Disponuje přirozenou rezistencí k ampicilinu (Schindler, 2014).

### ***1.5.1.3 Proteus mirabilis***

*Proteus mirabilis* je nejčastější zástupce z rodu *Proteus*. Může způsobit celou řadu komunitních onemocnění nebo infekcí spojených se zdravotní péčí (HAI). Nejčastěji se jedná o infekce močových cest. Pokud se bakterie dostanou z močových cest do krevního oběhu, způsobí bakteriémii, která se může rozvinout až v život ohrožující urosepsi (Schaffer a Pearson, 2015; Foris a Snowden, 2019).

## ***1.5.2 Pyogenní koky***

### ***1.5.2.1 Streptococcus pyogenes***

Patří mezi beta-hemolytické streptokoky serologické skupiny A podle Lancefieldové. Je to fakultativně anaerobní grampozitivní kok primárně patogenní pro člověka. *S. pyogenes* způsobuje nejčastěji akutní tonzilitidu a dále spálu, impetigo a erysipel. Pokud není infekce léčená, může dojít k rozvoji revmatické horečky a glomerulonefritidy (Bednář a kol., 1996; Votava a kol., 2003).

### ***1.5.2.2 Streptococcus agalactiae***

Patří mezi beta-hemolytické streptokoky skupiny B dle Lancefieldové. Může být přítomen u žen na poševní sliznici bez příznaků onemocnění. U těhotných žen je nebezpečí nákazy novorozence při porodu, tzn. vertikální přenos z kolonizované matky. Většina těchto infekcí se manifestuje jako časná infekce se vznikem sepse, méně často

meningitidy nebo pneumonie. U dospělých se infekce objevuje při poruše imunity (Bednář a kol, 1996; Votava a kol, 2003).

#### ***1.5.2.3 Streptococcus pneumoniae***

*S. pneumoniae* neboli pneumokok je fakultativně anaerobní bakterie. Vyskytuje se hlavně v horních cestách dýchacích. U zdravých osob může kolonizovat nosohltan. Pneumokoky jsou původci závažných onemocnění, jako je meningitida, pneumonie a sepse. Rovněž vyvolávají neinvazivní onemocnění horních cest dýchacích, zejména otitis media acuta, sinusitidu a konjunktivitidu. Rizikovou skupinou osob jsou děti do 4 let, staří lidé a imunokompromitovaní pacienti (Žemličková, 2012; Schindler, 2014).

#### ***1.5.2.4 Staphylococcus aureus***

Charakteristickým rysem infekcí způsobených bakterií *S. aureus* je vznik abscesů neboli ohraničených zánětlivých ložisek. Dochází také k zanesení bakterií do ran, popálenin nebo cizího tělesa (katétr). Zdrojem onemocnění mohou být asymptomaticí nosiči, u kterých tato bakterie kolonizuje kůži a nosní sliznici. V lidské populaci je 30-40 % zdravých nosičů (Arbuthnott, 1999). Po průniku stafylokoků z infikovaného primárního ložiska nebo žilního katétru do krevního oběhu vzniká bakteriémie. Jednou z nejzávažnějších komplikací infekce krevního řečiště je diseminace bakterií do orgánů a kostí. Invazivní stafylokoková infekce se může manifestovat také jako sepse až septický šok, u kterého je úmrtnost vyšší než 20 % (Bergin et al., 2015). Celosvětově roste frekvence výskytu multirezistentních kmenů, které jsou odolné k působení methicilinu, linkosamidů, makrolidů, aminoglykosidů, fluorochinolonů. Methicilin rezistentní *S. aureus* představuje problém zejména v nemocničním prostředí (Von Eiff, 2001; Bergin et al., 2015).

#### ***1.5.2.5. Staphylococcus epidermidis***

*S. epidermidis* je nejčastěji se vyskytující koaguláza negativní stafylokok. Vyskytuje se na sliznicích a kůži jako součást přirozené mikroflóry. Kolonizuje převážně axily, kůži obličeje, končetiny a sliznici nosohltanu. Dříve byl považován za neškodný komenzální mikroorganismus, avšak v současné době je to významný oportunní patogen a běžný zdroj HAI (Otto, 2009). Při infekci dochází k rozvoji endokarditidy, katérové sepse, infekce ran nebo implantátů. Nejvíce jsou ohroženi narkomani užívající drogy intravenózně, imunokompromitovaní jedinci a pacienti s implantáty, např. katétry,

umělými chlopněmi, kloubními náhradami nebo kardiostimulátory (Votava a kol., 2003).

#### **1.5.2.6 Enterokoky**

Bakterie z rodu *Enterococcus* jsou fakultativně anaerobní koky. Obvykle osidlují zažívací trakt lidí i zvířat a jsou podmíněnými patogeny. Vyvolávají infekce močových cest, operačních ran a krevního řečiště. Infekce se dělí na exogenní a endogenní. Exogenní se šíří kontaminovanými rukama zdravotníků nebo zdravotnickými pomůckami. Endogenní infekce vznikají průnikem bakterií ze střeva do krevního oběhu a orgánů. Nejběžnějšími zástupci jsou *E. faecalis* a *E. faecium*. V posledních letech se objevují infekce vankomycin rezistentními enterokoky jako následek nadužívání širokospektrých antimikrobiálních přípravků, které narušují přirozenou střevní mikroflóru (Vágnerová a Kolář, 2003; Fisher a Phillips, 2009).

#### **1.5.2.7 Neisserie**

Rod *Neisseria* zahrnuje aerobní, případně mikroaerofilní diplokoky. K patogenním druhům se řadí *N. gonorrhoeae* a *N. meningitidis*. Další skupinou jsou ústní neisserie, které se podílí na složení biofilmu v dutině ústní a nosohltanu. Disponují nízkou patogenitou, ale mimo ústní dutinu mohou způsobit infekci u oslabených jedinců (Votava a kol., 2003).

*N. gonorrhoeae* zvaná gonokok je původcem klasického pohlavního onemocnění kapavky, jež se projevuje jako neinvazivní zánět urogenitálních sliznic. U žen může probíhat asymptomaticky a neléčená infekce vede ke komplikacím, jako jsou peritonitida, endokarditida, meningitida, záněty velkých kloubů a sepse. Pokud je infikovaná žena těhotná, hrozí potrat, nebo nakažení novorozence keratokonjunktivitidou (Zimová a Zíma, 2013).

*N. meningitidis*, též meningokok, je přirozeným patogenem pro člověka. Šíří se jako kapénková infekce nebo přímým kontaktem s osobou, která je bezpříznakovým nosičem (asi 10 % populace). Nebezpečné jsou invazivní infekce u mladistvých s fatálním průběhem, mezi které patří sepse a meningitida (Votava a kol., 2003).

### **1.5.3 Grampozitivní tyčky**

#### **1.5.3.1 Korynebakteria**

Zástupci z rodu *Corynebacterium* jsou fakultativně anaerobní tyčinky s kyjovitým tvarem. Rozlišujeme kmeny saprofytické, podmíněně patogenní a primárně patogenní (Schindler, 2014).

*C. jeikeium* se vyskytuje na kůži jako součást přirozené mikroflóry především u dlouhodobě hospitalizovaných pacientů, u kterých poté snadno vyvolá katérovou sepsi (Vlasatá a kol., 2017). Dalším kmenem je *C. pseudodiphtheriticum*, jež můžeme izolovat kromě kůže a krku i ze stolice (Schindler, 2014).

#### **1.5.3.2 Listeria monocytogenes**

*L. monocytogenes* se množí při nízkých teplotách (v chladničce) a vyšších koncentracích soli, obzvláště v mléčných a masných výrobcích. Způsobuje alimentární onemocnění zvané listerióza. U zdravého dospělého jedince může infekce probíhat inaparentně. Vnímavými jedinci jsou novorozenci, těhotné ženy, starší osoby, imunokompromitovaní a aspleničtí pacienti. Nejzávažnější je infekce pro těhotné ženy, může dojít k potratu nebo se u plodu rozvine granulomatosi infantiseptica. Pozdní infekce se u novorozenců manifestují jako meningitida či sepse (Votava a kol., 2003; Blažková a kol., 2005).

### **1.5.4 Gramnegativní tyčky**

#### **1.5.4.1 Pseudomonas aeruginosa**

*P. aeruginosa* je aerobní bakterie, kterou nalezneme v půdě, odpadních vodách nebo také ve stolici zvířat a lidí. Pseudomonády se často uplatňují jako zdroj HAI, kontaminují např. katétry nebo dýchací přístroje. Může dojít až k rozvoji systémového onemocnění. Nejzávažnější jsou infekce popálenin, oka a novorozenecké sepse. U zdravého jedince někdy pouze kolonizuje sliznice bez známek infekce (Bednář, 1996).

#### **1.5.4.2 Burkholderia cepacia komplex**

Bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* je soubor geneticky odlišných, ale fenotypově podobných bakterií. Můžeme je nalézt v půdě, ve vodě a přežívají ve vlhkém prostředí. Jsou významnými oportunními patogeny převážně v nemocničním prostředí. U pacientů

s cystickou fibrózou mohou vyvolat těžké plicní infekce, nekrotizující pneumonii, sepsi až závažný a život ohrožující cepacia syndrom. Jsou také příčinou infekcí u pacientů s poruchou imunitního systému a chronickým granulomatózním onemocněním. Nejčastěji se uplatňují druhy *B. cenocepacia* a *B. multivorans* (Mahenthiralingam, et al. 2005).

#### **1.5.4.3 *Haemophilus influenzae***

Dalším patogenním mikroorganismem ze skupiny gramnegativních bakterií je *H. influenzae*. U některých osob může bezpříznakově kolonizovat nosohltan. Podle kapsulárního antigenu se rozděluje na 6 sérotypů a-f. Nejvirulentnější je typ b, který vyvolává hnisavou meningitidu a akutní epiglottitidu. Ostatní sérotypy vyvolávají lokalizované infekce dýchacího traktu, otitis media nebo hnisavou konjunktivitidu (Howard, 1999).

#### **1.5.5 Anaerobní bakterie**

##### **1.5.5.1 Rod *Bacteroides***

Rod *Bacteroides* zahrnuje anaerobní gramnegativní pleomorfní tyčky, které jsou, podobně jako ostatní anaeroby, oportunně patogenní a mohou vyvolat různé infekce v celém těle. Nejznámějším členem rodu je *B. fragilis*, který je spojený s vážnými infekcemi dutiny břišní, dutiny ústní, krevního řečiště a malé pánve. Často se vyskytuje v koinfekcích s fakultativními anaeroby (Groman, 2009).

##### **1.5.5.2 Rod *Fusobacterium***

Zástupci z rodu *Fusobacterium* se objevují jako součást normální flóry v gastrointestinálním traktu, dýchacích cestách a ve vagině. *F. nucleatum* a *F. necrophorum* jsou nejvirulentnější kmeny, které způsobují většinu invazivních infekcí (Broadley a Schweon, 2017). Fusobakterie vyvolávají plicní, mozkové a jaterní abscesy, nekrotizující pneumonie, chronické sinusitidy, septické artritidy nebo intraabdominální infekce (Votava a kol, 2003).

##### **1.5.5.3 *Clostridium perfringens***

*C. perfringens* je anaerobní až mikroaerofilní bakterie z rodu *Clostridium*, která může tvořit spory. Bakterie je všudypřítomná v přírodě a vyskytuje se např. v půdě, prachu



nebo vodě. Dále také ve střevech lidí a zvířat. Přenáší se alimentární cestou a způsobuje střevní onemocnění, nekrózu tkání, plynatou sněť nebo bakteriemi (Bednář, 1996).

### **1.5.6 Kvasinky**

Kvasinky jsou eukaryotní mikroorganismy z říše hub. Patří mezi mikromycety. Morfologicky se jedná o kulaté nebo oválné buňky, označované jako blastokonidie. Rozmnožují se většinou asexuálně, tzv. pučením. Nejvýznamnějšími rody kvasinek jsou *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Malassezia*, *Blastoschizomyces* a *Trichosporon* (Votava a kol., 2003).

#### **1.5.6.1 Rod *Candida***

*Candida albicans* je oportunní patogen a původce povrchových a systémových kandidóz endogenního původu. Další patogenní zástupci jsou např. *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* a *C. krusei*. Uplatňují se často při vzniku HAI (Bednář a kol., 1996). Infekce krevního řečiště způsobené kandidami jsou významnou příčinou komplikací a mortality u hospitalizovaných pacientů. Možné rizikové faktory jsou terapie antibiotiky, chemoterapie, intravaskulární katétr, chirurgický zákrok, parenterální výživa nebo předchozí kolonizace plísněmi (Shivaprakasha et. al, 2007).

## **1.6 Mikrobiologické vyšetření hemokultur**

Detekce mikroorganismů v krvi je jednou z nejdůležitějších funkcí klinických mikrobiologických laboratoří. Jestliže hemokultury signalizují klinicky významný mikroorganismus, znamená to, že obranné mechanismy hostitele selhaly v obraně proti infekci nebo se lékařům nepodařilo odstranit infekční proces. Během posledních dvou desetiletí došlo k mnoha změnám ve vyšetřování krevních kultur. Výrobci laboratorních přístrojů vylepšili své produkty a rozmohl se trend v používání automatizovaných systémů. Nejmodernější z nich jsou kontinuálně monitorující (Weinstein, 1996).

### **1.6.1 Odběr a transport hemokultur**

Důležitým krokem ve vyšetření hemokultur je řádné označení hemokultivační lahvičky vždy před samotným odběrem. Na lahvičku se uvádí jméno pacienta a rodné číslo. Na žádance je uvedena tělesná teplota před odběrem, oddělení, číslo, datum a čas odběru. Vzorky se odebírají do aerobní a anaerobní lahvičky před podáním antibiotik a při třesavce. Obvykle se odebírá více vzorků v krátkém časovém odstupu. U dětí se často

podání provést jen jeden odběr a používá se pediatrická lahvička. Před odběrem je nutné místo vpichu vydezinfikovat a nechat zaschnout. Krev se odebírá z periferní žíly. Odběr z katétru je možný pouze v krajních případech. Při suspektní katéetrové sepsi se provede odběr anaerobní a aerobní lahvičky a následně ihned z periferní žíly. U dospělých je objem krve 8-10 ml na lahvičku, u dětí 1-3 ml. Zátka na lahvičce se dezinfikuje alkoholem a nechá zaschnout. Není vhodné používat k dezinfekci přípravky s jódem, protože poškozují gumové septum lahvičky.

Pokud není možno lahvičky transportovat hned do laboratoře, lze je uchovat max. 24 hodin při pokojové teplotě. Nikdy se nedávají do lednice. Ideálně by měly být neprodleně doručeny do laboratoře a vloženy do hemokultivačního systému (Scharfen, 2013; Laboratorní příručka oddělení klinické mikrobiologie, 2018).

### ***1.6.2 Manuální hemokultivační systémy***

Konvenční manuální systémy a média jsou k dispozici z mnoha komerčních zdrojů. Nicméně laboratoře mohou vyrábět také vlastní kultivační lahvičky v závislosti na svých zdrojích. Vzhledem k tomu, že laboratoře prochází procesem akreditace, se tento způsob již nedoporučuje. Lahvičky zpravidla obsahují 50-100 ml pomnožovacího bujónu, který je doplněn 0,025-0,05% polyanetholsulonátem sodným (SPS). Inokulují se krví a inkubují obvykle 5 dní. Každá lahvička se denně kontroluje pro makroskopické zachycení mikrobiálního růstu, jako je hemolýza, zákal média, produkce plynu nebo formace kolonií. Při pozitivitě lahvičky se provede subkultivace a připraví se preparát barvený podle Grama. Konečná subkultivace se provádí na konci inkubace. Manuální systémy jsou flexibilní a poměrně levné, ale jsou náročnější na pracovní sílu. Dvoufázové systémy kultivace a Oxoid Signal systém jsou varianty, které šetří potřebu pracovní síly (Weinstein, 1996; Rohner a Auckenthaler, 1999).

#### ***1.6.2.1 Dvoufázová hemokultura***

Princip bifazických systémů spočívá v kombinaci dvou kultivačních médií. V lahvičce je šikmo vylitá tuhá půda a zároveň tekuté médium. Alespoň jednou denně se lahvička nakloní, aby tekutý bujón překryl agar. Případné přítomné mikroby rostou ve viditelných koloniích na tuhé půdě. Nejrozšířenější komerčně vyráběné systémy jsou Hémoline od francouzské firmy BioMérieux a švýcarský Septi-Chek (Čermák, 2008).

Hemokultivační systém Septi-Chek vyvinula firma Hoffmann-La Roche Diagnostics na počátku 80. let. V kultivačních lahvičkách je tekutá půda a agarová destička, na které je nanesena vrstva čokoládového, MacConkeyova nebo sladinkového agaru. Jako tekuté médium se používá trypto-sójový bujón, thioglykolátový bujón, mozko-srdcová infuze, bujón Columbia a trypto-sójový bujón s pryskyřicí rušící vliv antibiotik. U dospělých se používá nádobka obsahující 70 ml živného média, do které se vstříkne 8-10 ml krve a pro pediatrické pacienty 20 ml lahvička, do níž se vpraví 1-3 ml krve. Pro anaerobní kultury jsou k dispozici lahvičky, které nejsou ventilované. Po inokulaci se lahvička obrátí, aby se namočil agar. Pozitivitu značí zákal, růst kolonií nebo hemolýza v médiu (Rohner a Auckenthaler, 1999; Čermák, 2008).

#### **1.6.2.2 Oxoid Signal systém**

Hemokultivační systém Oxoid Signal pracuje s jednou lahvičkou, která obsahuje speciální médium podporující růst aerobních, anaerobních i mikroaerofilních mikroorganismů. V médiu je obsaženo SPS pro svou schopnost inhibovat srážení krve a inaktivovat některá antibiotika. SPS může působit inhibičně na některé kmeny *Peptostreptococcus anaerobis*, *N. meningitidis* a *N. gonorrhoeae*. Inhibici neutralizuje želatina přidaná do média. Po vstříknutí vzorku krve se na lahvičku pomocí jehly připevní nástavec indikátoru růstu. Během kultivace v termostatu mikroby produkují plyn a v lahvičce vzniká přetlak, ten vytlačí část média do komůrky nástavce a tím značí pozitivní výsledek (Hutchinson et al., 1992; příbalový leták Oxoid Signal).

#### **1.6.2.3 Isolator systém**

V roce 1978 byl popsán systém pro kultivaci krve založený na lýze krevních buněk, centrifugaci a následném nanesení na vhodné médium. V dnešní době je distribuován jako lýza-centrifugační systém Isolator 10 (Oxoid). Využívá zkumavky obsahující saponin (čínidlo pro lýzu buněk), propylenglykol (blokuje tendenci saponinu k pění) a SPS (antikoagulant). Do zkumavek se inokuluje 6 ml krve a zcentrifugují se. Supernatant se odstraní a sediment naočkuje na pevné půdy podle toho, jaké spektrum patogenů je očekáváno. U dětí je tento systém výhodný, protože mají často vysokou bakteriémií a je možné ji kvantifikovat. Nevýhodou je relativně vysoké riziko kontaminace způsobené prvotním zpracováním vzorku (Rohner a Auckenthaler, 1999).

### ***1.6.3 Automatizované hemokultivační systémy***

Automatizace hemokultivačních systémů vedla ke spolehlivější detekci pozitivních hemokultur, jejich rychlejší identifikaci a snížení míry kontaminace. Detekce zvýšené koncentrace oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>) v důsledku mikrobiálního růstu je široce využívaná různými technikami. První přístroje zavedené na počátku 70. let byly otevřené radiometrické systémy BACTEC 225, 301 a 460, které detekovaly radioaktivní CO<sub>2</sub> pomocí jehly, jež odebrala vzorek plynu z lahvičky. Nevýhodou bylo právě používání radioaktivních činidel. S vývojem infračervené spektrofotometrické detekce CO<sub>2</sub> byla v 80. letech představena nová generace přístrojů BACTEC 660, 730 a 860 s tou výhodou, že nevyžadují radioaktivní činidla. Nevýhodou u těchto systémů byla pomalá detekce a riziko kontaminace. Přístroj BioArgos také využíval infračervenou spektrofotometrickou detekci, ale CO<sub>2</sub> se měřil skrz sklo lahvičky. Tato neinvazivní procedura eliminovala nevýhody otevřených systémů. Nelze ho však považovat za kontinuálně měřící systém. Významným pokrokem bylo zavedení kontinuálně monitorujících hemokultivačních systémů, které mají nesporné výhody. Detekční, inkubační a třepací jednotka je integrovaná. Systém je uzavřený, takže nedochází ke kontaminaci. Lahvičky jsou nepřetržitě monitorovány a tím se zvyšuje rychlost detekce. Přístroje jsou oproti manuálním systémům dražší a náročnější na údržbu (Rohner a Auckenthaler, 1999; Čermák, 2008).

#### ***1.6.3.1 Systém BacT/Alert***

BacT/Alert (bioMérieux, Francie) je automatizovaný systém mikrobiální detekce založený na kolorimetrické detekci CO<sub>2</sub> produkovaného růstem mikroorganismů. Kultivační lahvičky aerobní i anaerobní obsahují 40 ml média a pojmu až 10 ml vzorku krve, pediatrické lahvičky obsahují 30 ml média a objem vzorku krve je max. 4 ml. Dostupné jsou také speciální lahvičky na kultivaci mykobakterií. Na dně lahvičky je připevněný CO<sub>2</sub> senzor a je oddělený od kultivační půdy membránou propustnou pro CO<sub>2</sub>. Ten difunduje do senzoru, snižuje pH a mění jeho barvu (Thorpe et al., 1990; Čermák, 2008). Nevýhodou systému BacT/Alert je, že aerobní lahvičky musí být před vložením do přístroje ventilovány a to může mít za následek vyšší míru kontaminace (Rohner a Auckenthaler, 1999).

### ***1.6.3.2 Nový systém BACTEC***

Dalším široce využívaným hemokultivačním systémem je BACTEC (Beckton-Dickinson, USA). Přístroj BACTEC 9050 je starším typem automatického hemokultivačního přístroje s kapacitou 50 vzorků. Uvnitř je karusel, který se otáčí dokola, a tím jsou vzorky promíchávány. BACTEC FX40 je novější typ přístroje. Rozdílem je, že přístroj nemá otočnou karusel, tudíž se nemusí zastavovat, je možné hned dveře otevřít a manipulovat s hemokulturami. Umožňuje kultivovat až 40 vzorků. Systém BACTEC k detekci růstu mikroorganismů v lahvičkách využívá fluorescenční technologii. Mikroorganismy metabolizují živiny v kultivačním médiu a uvolňují CO<sub>2</sub>. Barvivo v senzoru na dně lahvičky reaguje s CO<sub>2</sub>, tím dochází k modulaci množství světla, které je absorbováno fluorescenčním materiálem ve snímači. Fotodioda na přístroji měří úroveň fluorescence, jež odpovídá množství uvolněného CO<sub>2</sub>. Fluorescence klesá, pokud roste koncentrace CO<sub>2</sub>. Měření je poté interpretováno systémem podle předem naprogramovaných algoritmů positivity. Doporučená teplota inkubace vzorků je 35-37 °C. Dobu kultivace lze nastavit podle typu hemokultivační lahvičky, většinou trvá 5-7 dní. V případě potřeby lze dobu kultivace prodloužit (Čermák, 2008; Lamy et al., 2016).

### ***1.6.3.3 Hemokultivační lahvičky systému BACTEC***

#### **Aerobní kultivace**

K aerobní kultivaci se používají lahvičky BACTEC Plus Aerobic/F, ve kterých je živná půda s výtažkem sójového kaseinu. Jsou určeny pro diagnostiku in vitro. Média jsou sycena CO<sub>2</sub>. Chemické čidlo v lahvičkách detekuje zvýšení množství CO<sub>2</sub> vyprodukovaného růstem mikrobů. Každá lahvička obsahuje destilovanou vodu 30 ml, živnou půdu s výtažkem sójového kaseinu, kvasničný extrakt, aminokyseliny, polyanetholsulfonát sodný (SPS), vitamíny, antioxidanty, neionickou adsorpční pryskyřici, kationaktivní výměnnou pryskyřici. Doporučený objem vzorků krve je 8-10 ml. V případě, že byl inokulován vzorek o objemu menším než 8 ml, lze pro podpoření růstu organismů citlivých na SPS přidat plnou lidskou krev. Pokud krev obsahuje antimikrobiální látky, může dojít k falešně negativnímu výsledku. Vysoký počet bílých krvinek naopak může způsobit falešnou pozitivitu. Lahvičky se skladují na chladném a suchém místě mimo dosah přímého záření. Toto platí i pro anaerobní a pediatrické lahvičky (Příbalová informace BD BACTEC Plus Aerobic/F Culture Vials, 2015).

## **Anaerobní kultivace**

Pro anaerobní kultivaci se využívají lahvičky BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F. Obohacená živná půda je předem redukována a obsahuje výtažek sójového kaseinu a CO<sub>2</sub>. Stejně jako aerobní lahvička i tato obsahuje chemické čidlo, jež detekuje zvýšení množství CO<sub>2</sub> vytvořeného při metabolizaci substrátů. Objem vzorku krve je také 8-10 ml. Lahvička obsahuje před zpracováním destilovanou vodu 40 ml, živnou půdu s výtažkem sójového kaseinu, kvasničný extrakt, natráveninu zvířecí tkáně, dextrózu, hemin, menadion, citrát sodný, thioly, pyruvát sodný, saponin, čidlo proti zpěnění, SPS. Po přidání vzorku dojde hned k hemolýze krve a vznikne čokoládové až tmavé zbarvení. Anaerobní média jsou sycena CO<sub>2</sub> a N<sub>2</sub> (Příbalová informace BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F Culture Vials, 2016).

## **Kultivace pro pediatrii**

Zejména u dětí a vzorků s objemem menším než 3 ml se používají lahvičky BACTEC Peds Plus/F pro kvalitativní kultivaci a průkaz aerobních mikroorganismů. Princip je stejný jako u předchozích lahviček, zaznamenává se zvýšení CO<sub>2</sub>. Obsahují tyto aktivní složky: destilovaná voda 40 ml, živná půda s výtažkem sójového kaseinu, kvasničný výtažek, natrávenina zvířecí tkáně, pyruvát sodný, glukóza, třtinový cukr, hemin, menadion, SPS, pyridoxal HCL (vitamín B<sub>6</sub>), neionická adsorpční pryskyřice, kationaktivní výměnná pryskyřice. Médium je zředěno přidaným CO<sub>2</sub>. Optimální objem krve ke kultivaci je 1-3 ml. Při odebrání menšího objemu než 0,5 ml může dojít k ovlivnění detekce náročných mikroorganismů, např. druhů *Haemophilus*, a je nutné použít vyživovací přídavek FOS (Fastidious Organism Supplement) značky BACTEC. Přídavek obsahuje nikotinamidadeninukleotid a hemin, což jsou nezbytné růstové faktory pro hemofily (Příbalová informace BD BACTEC Peds Plus/F Culture Vials, 2016).

### ***1.6.4 Mikroskopie a kultivace***

Z pozitivní lahvičky se provádí mikroskopické a kultivační vyšetření. Pracuje se v laminárním boxu. Po promíchání obsahu se zátka vydezinfikuje a jehlou se odebere několik kapek vzorku. Na sklíčko se udělá tenký nátěr a obarví podle Grama (Scharfen, 2013). Gramovo barvení rozdělí bakterie na grampozitivní a gramnegativní podle

složení buněčné stěny. Obarvený preparát nám dá také informaci o velikosti, tvaru a uspořádání bakterií (Greenwood a kol, 1999).

Několik kapek vzorku se také inokuluje na kultivační půdy a sterilní kličkou se izolát rozočkuje. Po získání čisté kultury se provádí dourčování konkrétního bakteriálního kmene. Jako základní kultivační média se používají krevní agar, Endova půda a Schaedlerův agar (pro anaeroby), eventuálně čokoládový agar. V případě podezření na kvasinky a plísně je vhodný Sabouraudův agar. Kultivace půd probíhá v termostatu za vhodných podmínek (Scharfen, 2013).

### ***1.6.5 Identifikace***

Mikrobiologické techniky, jako je kultivace bakterií, barvení podle Grama a biochemické testy, jsou „zlatým standardem“ k orientaci, jak dále postupovat při další identifikaci infekcí krevního řečiště. Biochemické testy, např. katalázové a koagulázové testy, rozlišují blízce příbuzné organismy podle jejich enzymatické aktivity (Chun et al., 2015). Mezi nejmodernější metody identifikace mikroorganismů patří hmotnostní spektrometrie metodou MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) a PCR (polymerázová řetězová reakce) (Sauget et al., 2017).

### ***1.6.6 Vyšetření citlivosti***

Orientální vyšetření citlivosti na antibiotika se provádí hned po rozočkování krve na pevné půdy. Provádí se diskovými difúzními testy. Půda, na kterou se rozmístí disky s antibiotiky, se vybírá podle typu mikroorganismu. Měří se zóny inhibice růstu, jež se tvoří okolo jednotlivých antibiotik podle citlivosti mikroba (Votava, 2005). Začátkem roku 2019 EUCAST zveřejnil doporučení pro rychlé vyšetření citlivosti s inokulem vyočkovaným přímo z pozitivních lahvíček. Inkubace je zkrácená na 4, 6 a 8 hodin. Breakpointy jsou upraveny pro každý druh a čas odečítání (Urbášková, 2019). Definitivní citlivost se zjišťuje z čisté kultury po izolaci kmene kvalitativně (difúzní testy) nebo kvantitativně (M.I.C., E-test) (Scharfen, 2013).

## **2 Cíle práce**

1. Osvojení praktického zpracování hemokultur v automatickém hemokultivačním systému.
2. Zjistit mikrobiální spektrum v hemokulturách v letech 2014-2018.
3. Zjistit % pozitivit k celkovému počtu odebraných hemokultur v letech 2014-2018.

Výzkumná část probíhá na oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a.s.



### **3 Metodika**

Osvojení praktického zpracování hemokultur, jež bylo prvním cílem této bakalářské práce, probíhalo na oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a.s., kde mi byla rovněž poskytnuta data z laboratorního informačního systému ke statistickému zpracování. Daty se rozumí výsledky provedených hemokultivačních vyšetření u pacientů v letech 2014-2018.

#### **3.1 Princip metodické části**

Principem metodické části je kultivace vzorků v automatickém hemokultivačním systému Bactec a následné vyočkování pozitivních lahvíček na tuhá kultivační média. V laboratoři, kde byla prováděna metodická část práce, byly k dispozici dva typy přístrojů, BACTEC 9050 a BACTEC FX40, založené na principu detekce fluorescence. Hemokultivace probíhala na obou přístrojích.

#### **3.2 Příprava vzorků**

Nejprve byly připraveny 4 vlastní vzorky z vybraných kmenů vykultivovaných v laboratoři – *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Ve zkumavkách s 2 ml fyziologického roztoku byly vytvořeny bakteriální suspenze, které odpovídaly stupni zákalu 0,4 dle McFarlanda. Zkumavky byly doplněny na 10 ml a protřepány. Následovala aplikace nasimulovaných kmenů do připravených označených hemokultivačních lahvíček, které jsou před použitím skladovány v temnu při 2-25 °C. Byly použity lahvičky systému Bactec pro aerobní kultivaci, anaerobní kultivaci, pro pediatrii (viz Příloha č. 1) a lahvička systému Oxoid Signal (viz Příloha č. 2). Gumové zátky lahvíček musely být před inokulací vydezinfikovány 70% etanolem. Injekční stříkačkou s jehlou byla provedena inokulace lahvíček. Do aerobní lahvičky bylo vstříknuto 10 ml suspenze s *Candida albicans*, do anaerobní lahvičky 10 ml suspenze s *Escherichia coli*, do lahvičky pro pediatrii 3 ml suspenze s *Pseudomonas aeruginosa* a do lahvičky Oxoid Signal 10 ml suspenze se *Staphylococcus aureus*.

#### **3.3 Zpracování vzorků**

Všechny hemokultivační lahvičky byly ihned po inokulaci promíchány. Aerobní lahvička byla vložena do přístroje BACTEC 9050 (viz Příloha č. 3), anaerobní a

pediatrická lahvička do novějšího přístroje BACTEC FX40 (viz Příloha č. 4). Inokulovaná lahvička Oxoid Signal (viz Příloha č. 5) byla vložena na 1 hodinu do termostatu s teplotou  $36 \pm 1$  °C. Po hodině byla vyjmuta, zátka lahvičky byla otřena 70% alkoholem a aseptickým způsobem byl zaveden růstový indikátor tak, aby jehla byla ponořena do bujónu v lahvičce. Zelený nástavec indikátoru se posunul dolů a byl zaaretován na hrdle lahvičky. Lahvička byla vložena na 24 hodin do termostatu za občasného protřepání (alespoň čtyřikrát) a pozorování změn v lahvičce.

### ***3.4 Vložení lahviček do přístroje***

Před samotným vložení aerobní lahvičky do přístroje byly zapsány údaje o lahvičce do provozního deníku. V klasickém provozu je zapsán datum a čas vložení, jméno a příjmení pacienta, rodné číslo, zasílající oddělení a pořadové číslo hemokultury. U přístroje BACTEC 9050 se zapisuje také pozice lahvičky v karuselu. Kód sloupnutý z lahvičky se nalepí na žádanku. Dále se do provozního deníku zapisuje ke každému pacientovi i číslo šarže hemokultury. Po zastavení karuselu pomocí tlačítka na displeji přístroje byl načten barcode lahvičky a ta byla vložena do přístrojem určené pozice (viz Příloha č. 6). Pozitivita vzorků je hlášena zvukovým signálem.

U druhého novějšího přístroje byly pozice pro vložení lahviček značeny zeleným signálem nad jednotlivými stanicemi (viz Příloha č. 7). Anaerobní a pediatrická lahvičky byly vloženy po naskenování kódu do volných pozic. Pozice v tomto případě nebylo nutné zapisovat, přístroj ví podle senzorů, kam byla lahvička umístěna. Pozitivita byla signalizována červeným světlem na dveřích přístroje a po otevření blikaly červeně stanice pozitivních hemokultur.

### ***3.5 Pozitivní lahvičky***

Lahvičky Bactec byly oběma přístroji vyhodnoceny jako pozitivní, tudíž byly vyjmuty ze svých pozic. Pozitivita byla zapsána do provozního deníku a lahvička označena červenou značkou „+“. Všechny lahvičky vykazovaly růst mikroorganismů už na pohled a to tak, že v lahvičkách Bactec se vytvořil zákal (viz Příloha č. 8). Lahvička Oxoid Signal byla vyndána z termostatu po 24 hodinách a pozitivita se projevila průnikem směsi krve a bujónu do průhledného růstového indikátoru nad úroveň nástavce (viz Příloha č. 9).

### **3.6 Zpracování pozitivních hemokultur**

Všechny 4 pozitivní hemokultury byly přeneseny do laminárního boxu, který zajišťuje práci ve sterilním prostředí bez mikroorganismů. Tím zabraňuje kontaminaci materiálu a zároveň je chráněn i personál před eventuálním potřísněním při manipulaci s lahvičkou. V boxu byly přichystány potřebné věci k dalšímu zpracování. Kultivační půdy, podložní sklička, alkohol, injekční stříkačky s jehlami, plastové pipety a očkovací kličky. Jako kultivační půda byl použit krevní agar s 5 % beraní krve. Je vhodný ke kultivaci většiny klinicky významných bakterií, ať už gramnegativních či grampozitivních, a podle typu hemolýzy je možné dál určit bakteriální kmen. Prvním důležitým krokem bylo provést dezinfekci septa lahviček alkoholem k zamezení možné kontaminace. Do každé lahvičky Bactec byla zavedena jehla s injekční stříkačkou (viz Příloha č. 10) a po důkladném promíchání se malé množství natáhlo do stříkačky. Lahvička Oxoid Signal se zpracovávala odlišným způsobem, jelikož se jedná o manuální systém. Obsah v indikátoru růstu byl promíchán a asepticky bylo odebráno malé množství z horní nádoby do plastové pipety. Z každé lahvičky bylo nanášeno několik kapek tekutého média s krví na podložní skličko. Pipetou se rozprostřel vzorek na skličku a vytvořil se tak tenký nátěr, který byl zafixován nad kahanem. Skličko se zaschlým nátěrem se obarvilo podle Grama a tím byl zhotoven mikroskopický preparát, ve kterém se pod mikroskopem rozlišuje tvar, velikost a barvitelnost bakteriálních buněk. Dále bylo po zhodnocení nátěru z každé lahvičky nanášeno několik kapek média s krví na krevní agar, bakteriální kličkou bylo vytvořeno inokulum a poté rozočkováno. Kultivační půdy byly vloženy do termostatu.

#### **Barvení dle Grama:**

1. Fixovaný preparát byl převrstven roztokem Krystalové violeti na 20 s,
2. barvivo bylo přelito Lugolovým roztokem opět na 20 s,
3. následoval oplach vodou a odbarvení acetonem,
4. poté byl preparát opět opláchnut vodou,
5. nakonec byl převrstven naředěným Karbolfuchsinem na 30 s a opláchnut vodou.

### ***3.7 Hodnocení výsledků hemokultivace***

Mikroskopické preparáty a vykultivované půdy jsou prohlíženy lékařem nebo vysokoškolským pracovníkem, který rozhodne o dalším postupu. Identifikace a dourčování mikrobů je prováděno v bakteriologické laboratoři pomocí dalších testů. Gramnegativní tyčky se vyočkují na biochemický klín, ESBL chromagar a Mueller-Hintonův agar pro orientační citlivost. U grampozitivních tyček se založí dle typu tyček anaerobní kultivace nebo se k aerobní kontrole přidá čokoládový agar. Grampozitivní koky ve dvojcích nebo řetízkách se očkují na krevní agar s optochinem a vyočkují se také na Slanec Bartley, Mueller-Hintonův agar s citlivostí na enterokoky a Mueller-Hintonův agar s koňkou krví se streptokokovou citlivostí. Gramnegativní koky se vyočkují na selektivní agar pro kultivaci neisserií a čokoládový agar. Gramlabilní tyčky se dále očkují na biochemický klín, ESBL chromagar a Mueller-Hintonův agar pro orientační citlivost.

## 4 Výsledky

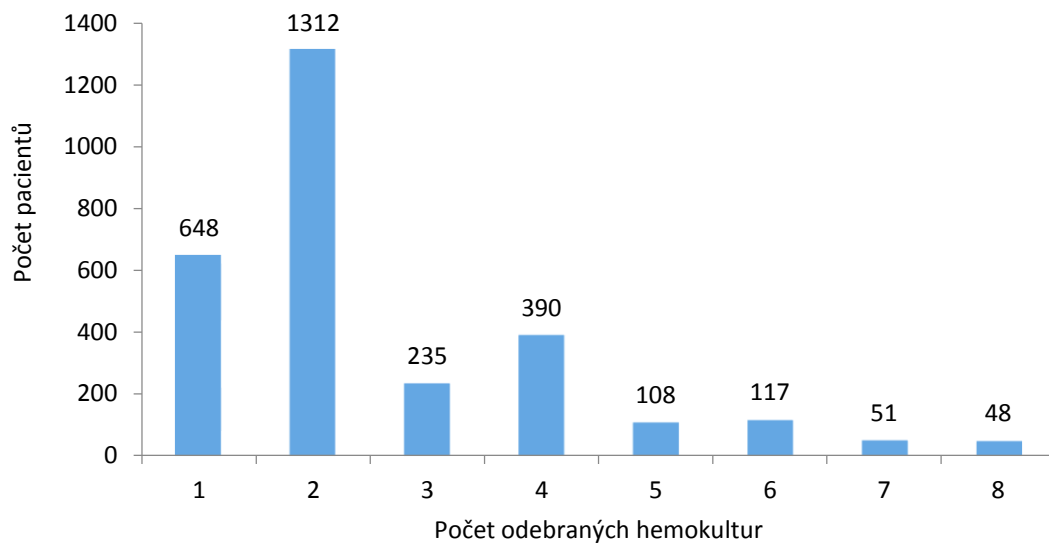
Podle poskytnutých dat z oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a.s. bylo zjištěno, že za období od 1. 1. 2014 do 24. 12. 2018 byl proveden odběr 9136 hemokultur od 3027 pacientů, které byly následně vyšetřeny. V tabulce č. 1 je znázorněn počet pacientů a počet odebraných hemokultur od nich. Jedna hemokultura byla odebrána od 648 pacientů, z nichž převážná většina jsou děti. Dvě hemokultury v jedné sadě byly odebrány od 1312 pacientů. Dále je počet odebraných hemokultur a pacientů znázorněn v grafu na obrázku č. 1.

**Tabulka 1 Počet pacientů a odebraných hemokultur**

| Počet pacientů | Počet odebraných hemokultur |
|----------------|-----------------------------|
| 648            | 1                           |
| 1312           | 2                           |
| 235            | 3                           |
| 390            | 4                           |
| 108            | 5                           |
| 117            | 6                           |
| 51             | 7                           |
| 48             | 8                           |
| 28             | 9                           |
| 20             | 10                          |
| 14             | 11                          |
| 9              | 12                          |
| 9              | 13                          |
| 7              | 14                          |
| 3              | 15                          |
| 4              | 16                          |
| 2              | 17                          |
| 3              | 18                          |
| 3              | 19                          |
| 3              | 21                          |
| 3              | 23                          |
| 2              | 25                          |
| 3              | 27                          |
| 1              | 29                          |
| 1              | 32                          |
| 2              | 36                          |
| 1              | 37                          |

(zdroj: vlastní zpracování)

## Počet pacientů a odebraných hemokultur



**Obrázek 1 Počet pacientů a odebraných hemokultur**

(zdroj: vlastní zpracování)

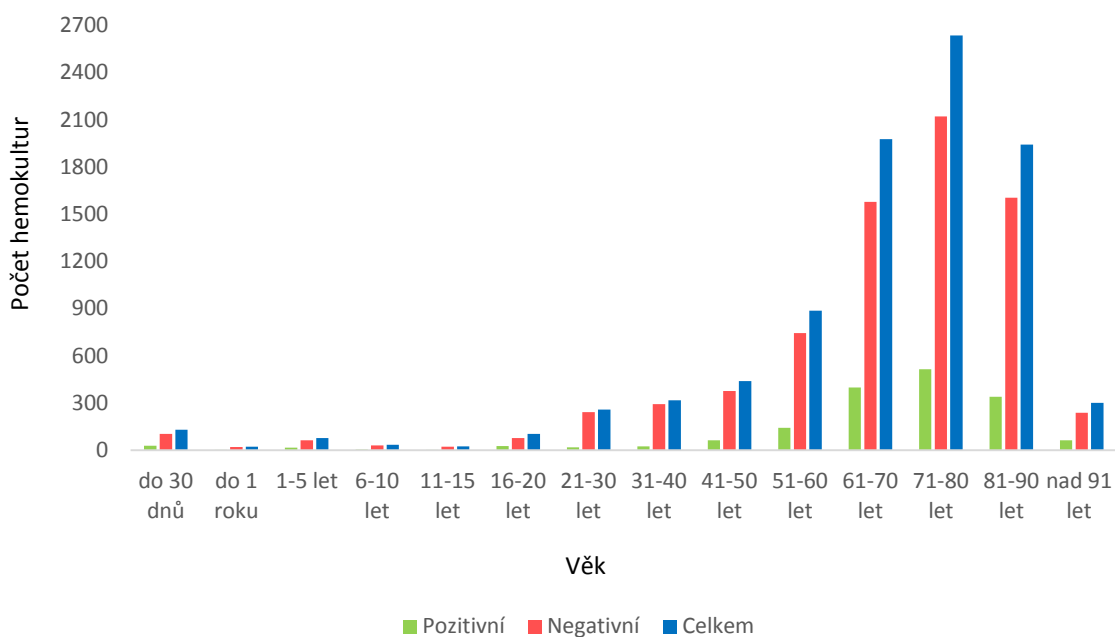
Data byla rozdělena na kategorie podle věku pacientů, viz tabulka č. 2. První kategorie jsou děti do 30 dnů, další děti do 1 roku, poté po 5 letech do 20 let a následně po 10 letech. Nejčetnější věkovou skupinou v počtu vzorků je skupina 71-80 let (2634 vzorků), dále 81-90 let (1941 vzorků) a 61-70 let (1975 vzorků). Nejméně odebraných vzorků bylo ze skupin dětí do 1 roku (22 vzorků) a 11-15 let (23 vzorků). Z celkového počtu 9136 hemokultur bylo hemokultivačním systémem vyhodnoceno 7503 jako negativní a 1633 jako pozitivní. Jednotlivé počty pozitivit a negativit u každé z kategorií jsou zobrazeny také v tabulce č. 2. Na obrázku č. 2 je graficky znázorněno rozdělení do věkových skupin, pozitivita a negativita.

**Tabulka 2 Rozdělení do věkových skupin**

| Věk           | Pozitivní   | Negativní   | Celkem      |
|---------------|-------------|-------------|-------------|
| do 30 dnů     | 28          | 102         | 130         |
| do 1 roku     | 2           | 20          | 22          |
| 1-5 let       | 15          | 62          | 77          |
| 6-10 let      | 3           | 30          | 33          |
| 11-15 let     | 1           | 22          | 23          |
| 16-20 let     | 26          | 76          | 102         |
| 21-30 let     | 17          | 241         | 258         |
| 31-40 let     | 24          | 293         | 317         |
| 41-50 let     | 63          | 375         | 438         |
| 51-60 let     | 141         | 744         | 885         |
| 61-70 let     | 398         | 1577        | 1975        |
| 71-80 let     | 514         | 2120        | 2634        |
| 81-90 let     | 338         | 1603        | 1941        |
| nad 91 let    | 63          | 238         | 301         |
| <b>Celkem</b> | <b>1633</b> | <b>7503</b> | <b>9136</b> |

(zdroj: vlastní zpracování)

**Rozdělení věkových skupin**



**Obrázek 2 Rozdělení věkových skupin**

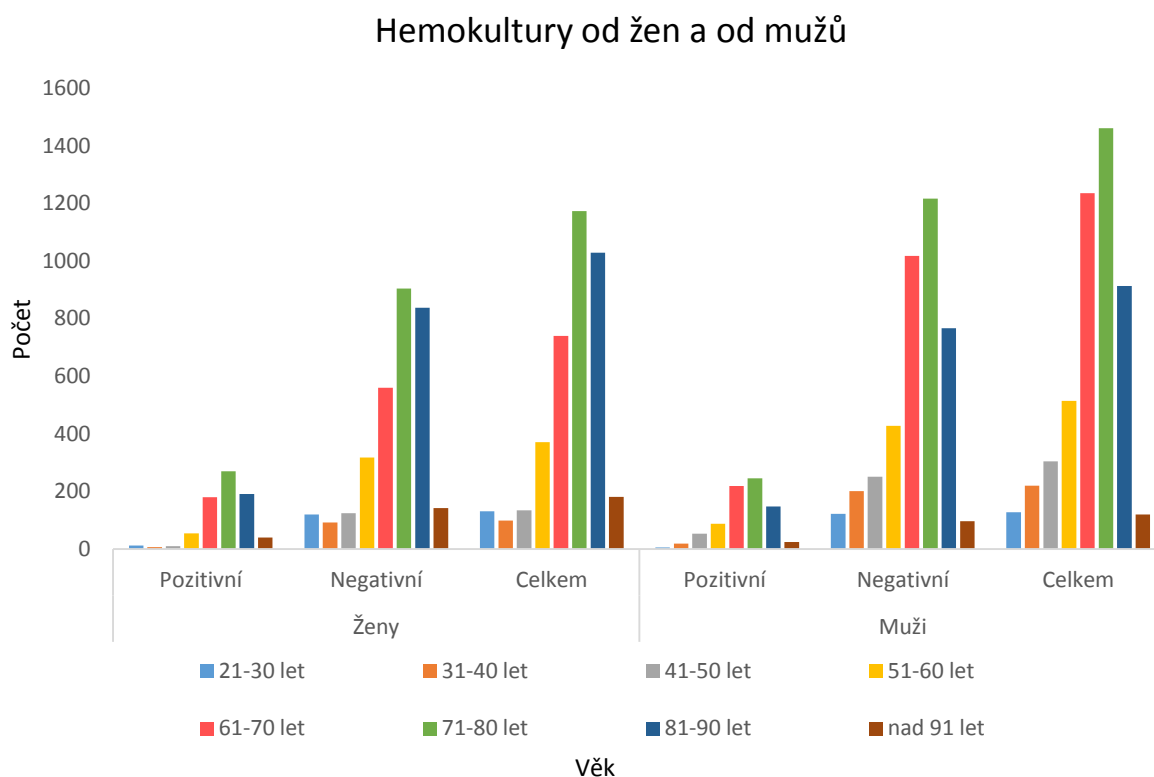
(zdroj: vlastní zpracování)

V tabulce č. 3 jsou vzorky od dospělých pacientů rozděleny na hemokultury od mužů a od žen. Na obrázku č. 3 je toto rozdělení znázorněno graficky.

**Tabulka 3 Rozdělení hemokultur - ženy a muži**

| Věk           | Ženy       |             |             | Muži       |             |             |
|---------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
|               | Pozitivní  | Negativní   | Celkem      | Pozitivní  | Negativní   | Celkem      |
| 21-30 let     | 12         | 119         | 131         | 5          | 122         | 127         |
| 31-40 let     | 6          | 92          | 98          | 18         | 201         | 219         |
| 41-50 let     | 10         | 124         | 134         | 53         | 251         | 304         |
| 51-60 let     | 54         | 317         | 371         | 87         | 427         | 514         |
| 61-70 let     | 180        | 560         | 740         | 218        | 1017        | 1235        |
| 71-80 let     | 269        | 904         | 1173        | 245        | 1216        | 1461        |
| 81-90 let     | 191        | 837         | 1028        | 147        | 766         | 913         |
| nad 91 let    | 39         | 142         | 181         | 24         | 96          | 120         |
| <b>Celkem</b> | <b>761</b> | <b>3095</b> | <b>3856</b> | <b>797</b> | <b>4096</b> | <b>4893</b> |

(zdroj: vlastní zpracování)



**Obrázek 3 Rozdělení hemokultur - ženy a muži**

(zdroj: vlastní zpracování)



#### 4.1 Mikrobiální spektrum

Druhým cílem bakalářské práce bylo zjistit mikrobiální spektrum v hemokulturách v letech 2014-2018. Poskytnutá data byla zpracována v kontingenční tabulce, pomocí níž došlo k přehlednému rozdělení a sečtení všech nálezů v hemokulturách. Pro zjednodušení byly některé nálezy shrnuty do species. *Enterobacter species* zahrnuje bakterie *E. cloacae*, *E. agglomerans* a *E. aerogenes* (nyní *Klebsiella aerogenes*). *Enterococcus species* zahrnuje *E. casseliflavus*, *E. faecalis* a *E. faecium*. *Klebsiella species* zahrnuje bakterie *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *K. terrigena*. Skupina beta-hemolytické streptokoky zahrnuje streptokoky ze skupin A, B, C a G. Kvasinkové organismy *Candida species* sdružují *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. intermedia*, *C. parapsilosis* a *C. tropicalis*. V tabulkách č. 3 a 4 je znázorněno 36 mikrobiálních původců včetně výskytu vzhledem k pozorovaným kategoriím. V tabulce č. 4 jsou znázorněny skupiny do 20 let věku včetně a v tabulce č. 5 jsou znázorněny skupiny nad 20 let věku. V tabulce č. 6 je vidět celkový počet jednotlivých nálezů za období 2014-2018.

**Tabulka 4 Mikrobiální spektrum - do 20 let**

| Nález                                     | do 30 dnů | do 1 roku | 1-5 let   | 6-10 let | 11-15 let | 16-20 let |
|---|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| <i>Acinetobacter species</i>              | -         | 1         | -         | -        | -         | -         |
| <i>Enterobacter species</i>               | 1         | -         | -         | -        | -         | 1         |
| <i>Enterococcus species</i>               | 2         | -         | -         | -        | -         | 1         |
| <i>Escherichia coli</i>                   | 1         | 1         | -         | -        | -         | 1         |
| <i>Klebsiella species</i>                 | -         | -         | -         | -        | -         | 9         |
| <i>Pseudomonas species</i>                | -         | -         | -         | -        | -         | 4         |
| <i>Salmonella enteritidis</i>             | -         | -         | 1         | -        | -         | -         |
| <i>Staphylococcus aureus</i>              | 2         | -         | 1         | -        | -         | 2         |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | -         | -         | 2         | -        | -         | -         |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i>        | -         | -         | -         | -        | -         | 2         |
| <i>Staphylococcus koagulasa negativní</i> | 20        | -         | 5         | 1        | 1         | 6         |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>           | -         | -         | 4         | 1        | -         | -         |
| Beta-hemolytické streptokoky              | 1         | -         | 2         | -        | -         | -         |
| Vzdušné sporulující mikroby               | 1         | -         | -         | 1        | -         | -         |
| <b>Celkem</b>                             | <b>28</b> | <b>2</b>  | <b>15</b> | <b>3</b> | <b>1</b>  | <b>26</b> |

(zdroj: vlastní zpracování)

**Tabulka 5 Mikrobiální spektrum - nad 20 let**

| Nález                                     | 21-30 let | 31-40 let | 41-50 let | 51-60 let  | 61-70 let  | 71-80 let  | 81-90 let  | nad 91 let |
|---|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>Acinetobacter species</i>              | -         | -         | -         | 5          | 5          | 1          | -          | -          |
| <i>Burkholderia cepacia</i>               | -         | -         | -         | -          | -          | 3          | -          | -          |
| <i>Campylobacter species</i>              | -         | -         | 1         | -          | -          | -          | -          | -          |
| <i>Candida species</i>                    | 2         | -         | 2         | 2          | 5          | 11         | 2          | 1          |
| <i>Clostridium perfringens</i>            | -         | -         | -         | -          | 4          | 2          | -          | -          |
| <i>Eggerthella lenta</i>                  | -         | -         | -         | -          | 1          | -          | -          | -          |
| <i>Enterobacter species</i>               | 6         | -         | -         | 1          | 14         | 32         | 2          | -          |
| <i>Enterococcus species</i>               | -         | -         | 2         | 5          | 17         | 19         | 16         | 2          |
| <i>Escherichia coli</i>                   | 3         | 6         | 18        | 30         | 103        | 138        | 182        | 33         |
| <i>Haemophilus influenzae</i>             | -         | -         | -         | -          | 2          | -          | 1          | -          |
| <i>Klebsiella species</i>                 | -         | 1         | 4         | 16         | 35         | 49         | 22         | 8          |
| <i>Lactococcus species</i>                | -         | -         | -         | -          | -          | 2          | -          | -          |
| <i>Listeria species</i>                   | -         | -         | -         | -          | 1          | -          | -          | -          |
| MRSA                                      | -         | -         | 2         | 1          | 20         | 27         | 5          | -          |
| <i>Morganella morganii</i>                | -         | -         | -         | 1          | 5          | 6          | 5          | 1          |
| <i>Proteus species</i>                    | -         | -         | 1         | 5          | 7          | 21         | 9          | 6          |
| <i>Providencia species</i>                | -         | -         | -         | -          | -          | -          | -          | 2          |
| <i>Pseudomonas species</i>                | -         | -         | 1         | 1          | 1          | 6          | 10         | -          |
| <i>Raoultella terrigena</i>               | -         | -         | -         | -          | 2          | -          | -          | -          |
| <i>Rothia dentocariosa</i>                | -         | -         | -         | -          | -          | 1          | -          | -          |
| <i>Salmonella enteritidis</i>             | -         | -         | -         | 2          | 4          | 6          | 1          | -          |
| <i>Serratia species</i>                   | -         | -         | -         | -          | 2          | 5          | -          | 2          |
| <i>Shewanella putrefaciens</i>            | -         | -         | -         | -          | 2          | -          | -          | -          |
| <i>Staphylococcus aureus</i>              | 4         | 10        | 16        | 35         | 54         | 98         | 36         | 3          |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | -         | 4         | 1         | 15         | 53         | 41         | 21         | 2          |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i>        | -         | -         | 1         | 1          | -          | -          | -          | -          |
| <i>Staphylococcus hominis</i>             | -         | -         | -         | 1          | -          | -          | 2          | -          |
| <i>Staphylococcus koagulasa negativní</i> | -         | 3         | 5         | 10         | 25         | 8          | 10         | -          |
| <i>Staphylococcus warneri</i>             | -         | -         | -         | -          | 4          | 4          | 4          | -          |
| <i>Staphylococcus xylosus</i>             | -         | -         | -         | -          | 3          | -          | -          | -          |
| <i>Streptococcus oralis</i>               | -         | -         | -         | -          | -          | 1          | 1          | -          |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>           | -         | -         | 4         | -          | 10         | 18         | 2          | -          |
| Beta-hemolytické streptokoky              | -         | -         | 5         | 8          | 17         | 11         | 5          | 3          |
| <i>Veillonella parvula</i>                | -         | -         | -         | 1          | -          | -          | -          | -          |
| Vzdušné sporující mikroby                 | 2         | -         | -         | 1          | 2          | 4          | 2          | -          |
| <b>Celkem</b>                             | <b>17</b> | <b>24</b> | <b>62</b> | <b>141</b> | <b>398</b> | <b>514</b> | <b>338</b> | <b>63</b>  |

(zdroj: vlastní zpracování)

**Tabulka 6 Mikrobiální spektrum - celkem**

| <b>Nález</b>                              | <b>Celkem</b> |
|---|---------------|
| <i>Acinetobacter species</i>              | 12            |
| <i>Burkholderia cepacia</i>               | 3             |
| <i>Campylobacter species</i>              | 1             |
| <i>Candida species</i>                    | 25            |
| <i>Clostridium perfringens</i>            | 6             |
| <i>Eggerthella lenta</i>                  | 1             |
| <i>Enterobacter species</i>               | 57            |
| <i>Enterococcus species</i>               | 64            |
| <i>Escherichia coli</i>                   | 516           |
| <i>Haemophilus influenzae</i>             | 3             |
| <i>Klebsiella species</i>                 | 144           |
| <i>Lactococcus species</i>                | 2             |
| <i>Listeria species</i>                   | 1             |
| MRSA                                      | 55            |
| <i>Morganella morganii</i>                | 18            |
| <i>Proteus species</i>                    | 49            |
| <i>Providencia species</i>                | 2             |
| <i>Pseudomonas species</i>                | 23            |
| <i>Raoultella terrigena</i>               | 2             |
| <i>Rothia dentocariosa</i>                | 1             |
| <i>Salmonella enteritidis</i>             | 14            |
| <i>Serratia species</i>                   | 9             |
| <i>Shewanella putrefaciens</i>            | 2             |
| <i>Staphylococcus aureus</i>              | 261           |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>         | 139           |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i>        | 4             |
| <i>Staphylococcus hominis</i>             | 3             |
| <i>Staphylococcus koagulasa negativní</i> | 94            |
| <i>Staphylococcus warneri</i>             | 12            |
| <i>Staphylococcus xylosus</i>             | 3             |
| <i>Streptococcus oralis</i>               | 2             |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>           | 39            |
| Beta-hemolytické streptokoky              | 52            |
| <i>Veillonella parvula</i>                | 1             |
| Vzdušné sporující mikroby                 | 13            |
| <b>Celkem</b>                             | <b>1633</b>   |

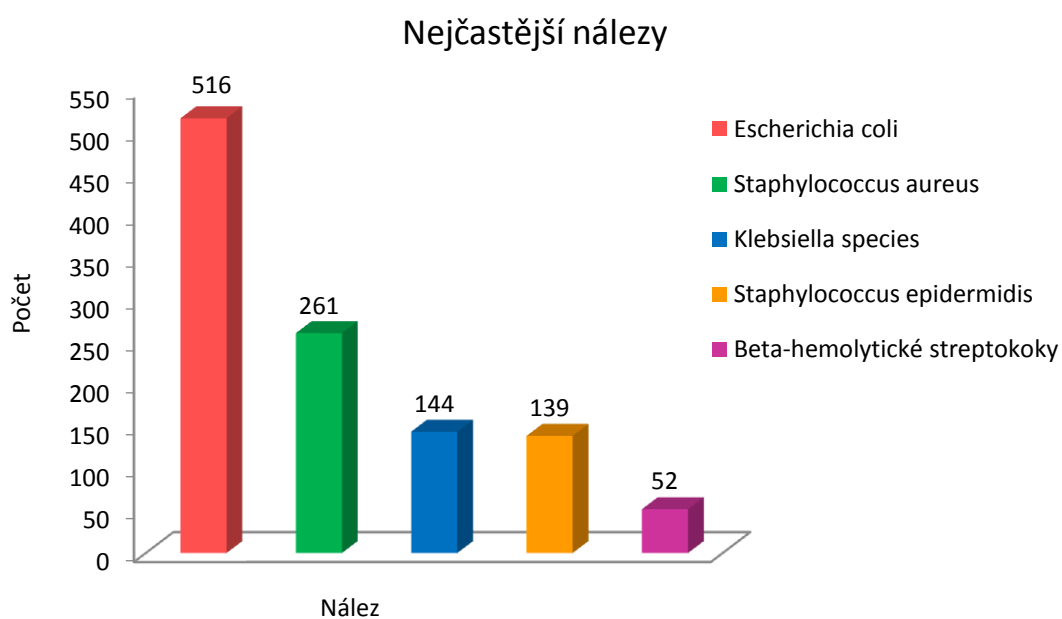
(zdroj: vlastní zpracování)

Nejčastější nálezy byly vybrány pomocí funkce podmíněného formátování v programu Microsoft Excel a samostatně zpracovány do tabulky č. 7, ze které vznikl graf (viz obrázek č. 4).

**Tabulka 7 Nejčastější nálezy**

| Nález         | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Klebsiella species</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Beta-hemolytické streptokoky |
|---------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| do 30 dnů     | 1                       | 2                            | -                         | -                                 | 1                            |
| do 1 roku     | 1                       | -                            | -                         | -                                 | -                            |
| 1-5 let       | -                       | 1                            | -                         | 2                                 | 2                            |
| 6-10 let      | -                       | -                            | -                         | -                                 | -                            |
| 11-15 let     | -                       | -                            | -                         | -                                 | -                            |
| 16-20 let     | 1                       | 2                            | 9                         | -                                 | -                            |
| 21-30 let     | 3                       | 4                            | -                         | -                                 | -                            |
| 31-40 let     | 6                       | 10                           | 1                         | 4                                 | -                            |
| 41-50 let     | 18                      | 16                           | 4                         | 1                                 | 5                            |
| 51-60 let     | 30                      | 35                           | 16                        | 15                                | 8                            |
| 61-70 let     | 103                     | 54                           | 35                        | 53                                | 17                           |
| 71-80 let     | 138                     | 98                           | 49                        | 41                                | 11                           |
| 81-90 let     | 182                     | 36                           | 22                        | 21                                | 5                            |
| nad 91 let    | 33                      | 3                            | 8                         | 2                                 | 3                            |
| <b>Celkem</b> | <b>516</b>              | <b>261</b>                   | <b>144</b>                | <b>139</b>                        | <b>52</b>                    |

(zdroj: vlastní zpracování)



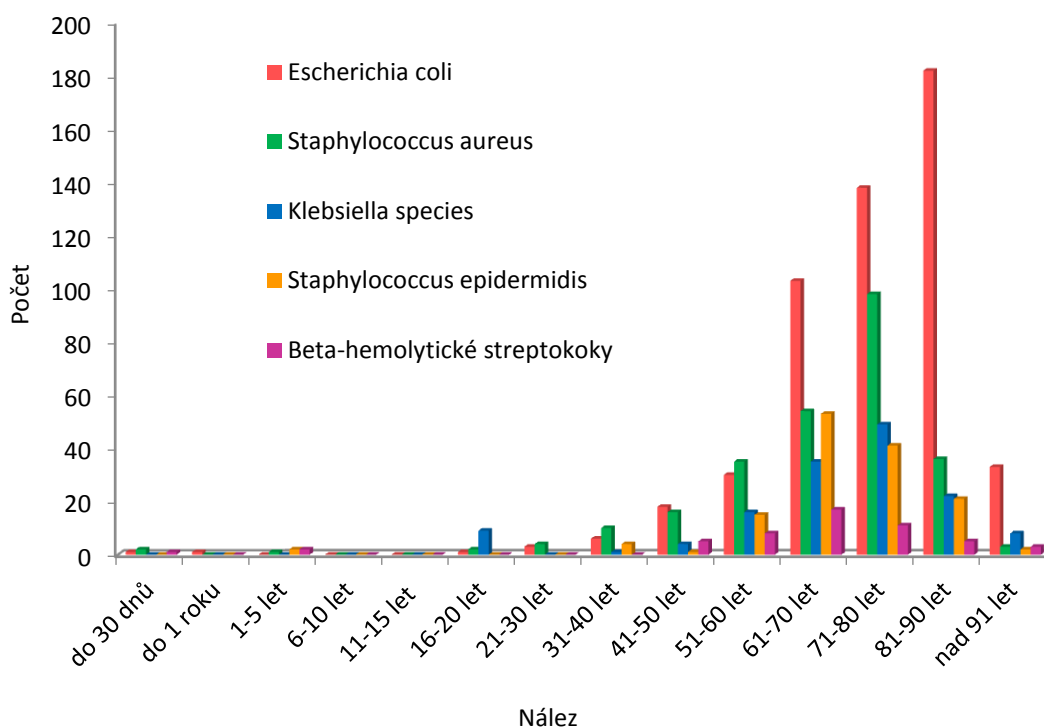
**Obrázek 4 Nejčastější nálezy**

(zdroj: vlastní zpracování)

Podle grafu na obrázku č. 4, kde jsou seřazeny nejčastější nálezy, je zřejmé, že nejčastějším izolátem za celé zkoumané období se stala *Escherichia coli*, která byla nalezena v 516 vzorcích z celkového počtu 1633 pozitivních vzorků. Druhým a třetím nejčastějším izolátem byly *Staphylococcus aureus* s výskytem ve 261 vzorcích a *Klebsiella species* s výskytem ve 144 vzorcích. *Staphylococcus epidermidis* byl izolován ze 139 vzorků a beta-hemolytické streptokoky z 52 vzorků.

Dále byl vytvořen graf, který zobrazuje nejčastější nálezy rozdělené podle věkových skupin (viz obrázek č. 5). Je patrné, že *Escherichia coli* se vyskytovala nejvíce u věkové skupiny 81-90 let, *Staphylococcus aureus* a *Klebsiella species* u věkové skupiny 71-80 let, *Staphylococcus epidermidis* a beta-hemolytické streptokoky u věkové skupiny 61-70 let.

Nejčastější nálezy podle věku



Obrázek 5 Nejčastější nálezy u jednotlivých věkových kategorií

(zdroj: vlastní zpracování)

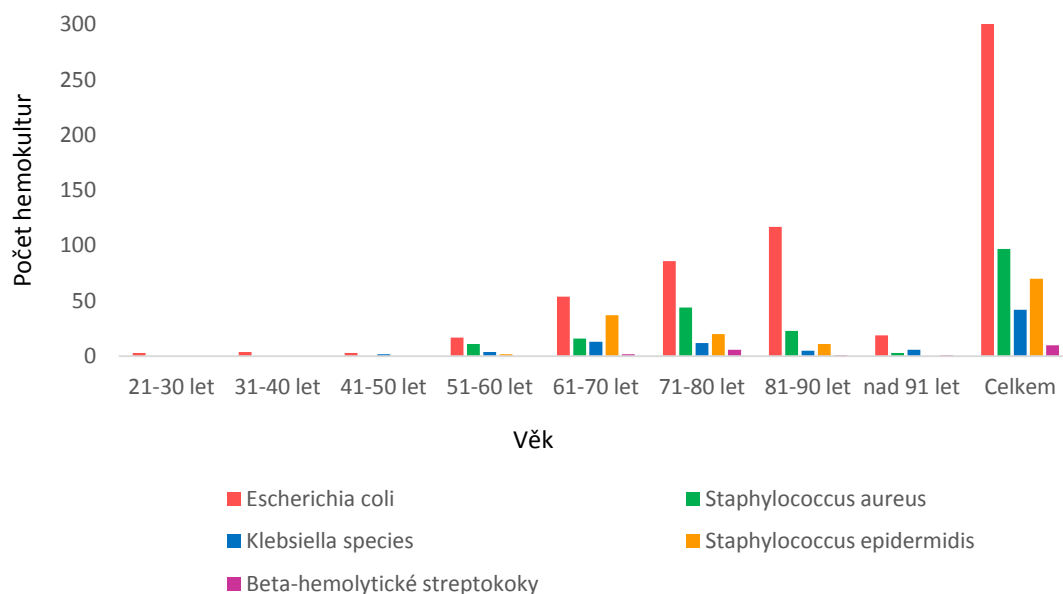
Tabulka č. 8 a obrázek č. 6 zobrazují nejčastější nálezy u žen. Nejčastějším nálezem byla *Escherichia coli*, která se vyskytovala ve 303 vzorcích, *Staphylococcus aureus* v 97 vzorcích, *Klebsiella species* ve 42 vzorcích, *Staphylococcus epidermidis* v 70 vzorcích a beta-hemolytické streptokoky v 10 vzorcích.

**Tabulka 8 Nejčastější nálezy u žen**

|               | Ženy                    |                              |                           |                                   |                              |
|---------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Věk           | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Klebsiella species</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Beta-hemolytické streptokoky |
| 21-30 let     | 3                       | -                            | -                         | -                                 | -                            |
| 31-40 let     | 4                       | -                            | -                         | -                                 | -                            |
| 41-50 let     | 3                       | -                            | 2                         | -                                 | -                            |
| 51-60 let     | 17                      | 11                           | 4                         | 2                                 | -                            |
| 61-70 let     | 54                      | 16                           | 13                        | 37                                | 2                            |
| 71-80 let     | 86                      | 44                           | 12                        | 20                                | 6                            |
| 81-90 let     | 117                     | 23                           | 5                         | 11                                | 1                            |
| nad 91 let    | 19                      | 3                            | 6                         | -                                 | 1                            |
| <b>Celkem</b> | <b>303</b>              | <b>97</b>                    | <b>42</b>                 | <b>70</b>                         | <b>10</b>                    |

(zdroj: vlastní zpracování)

**Nejčastější nálezy - ženy**



**Obrázek 6 Nejčastější nálezy u žen**

(zdroj: vlastní zpracování)

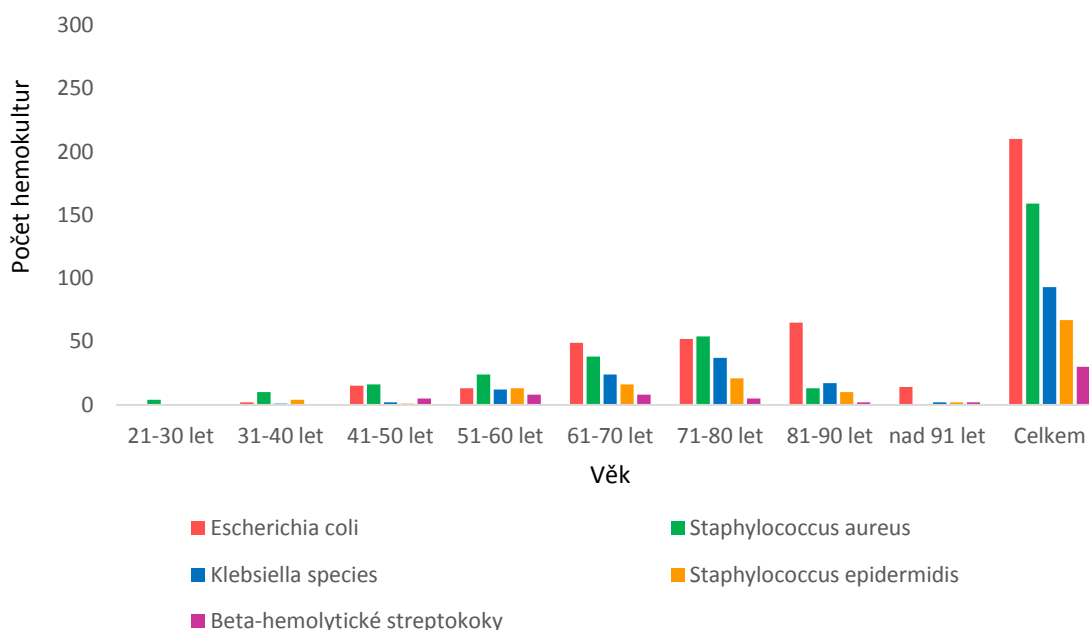
Tabulka č. 9 a obrázek č. 7 zobrazují nejčastější nálezy u mužů. Nejčastějším nálezem byla také *Escherichia coli*, která se vyskytovala ve 210 hemokulturách, *Staphylococcus aureus* ve 159 vzorcích, *Klebsiella species* v 93 vzorcích, *Staphylococcus epidermidis* v 67 vzorcích a beta-hemolytické streptokoky ve 30 vzorcích.

**Tabulka 9 Nejčastější nálezy u mužů**

|               | Muži                    |                              |                           |                                   |                              |
|---------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Věk           | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Klebsiella species</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Beta-hemolytické streptokoky |
| 21-30 let     | -                       | 4                            | -                         | -                                 | -                            |
| 31-40 let     | 2                       | 10                           | 1                         | 4                                 | -                            |
| 41-50 let     | 15                      | 16                           | 2                         | 1                                 | 5                            |
| 51-60 let     | 13                      | 24                           | 12                        | 13                                | 8                            |
| 61-70 let     | 49                      | 38                           | 24                        | 16                                | 8                            |
| 71-80 let     | 52                      | 54                           | 37                        | 21                                | 5                            |
| 81-90 let     | 65                      | 13                           | 17                        | 10                                | 2                            |
| nad 91 let    | 14                      | -                            | 2                         | 2                                 | 2                            |
| <b>Celkem</b> | <b>210</b>              | <b>159</b>                   | <b>93</b>                 | <b>67</b>                         | <b>30</b>                    |

(zdroj: vlastní zpracování)

**Nejčastější nálezy - muži**



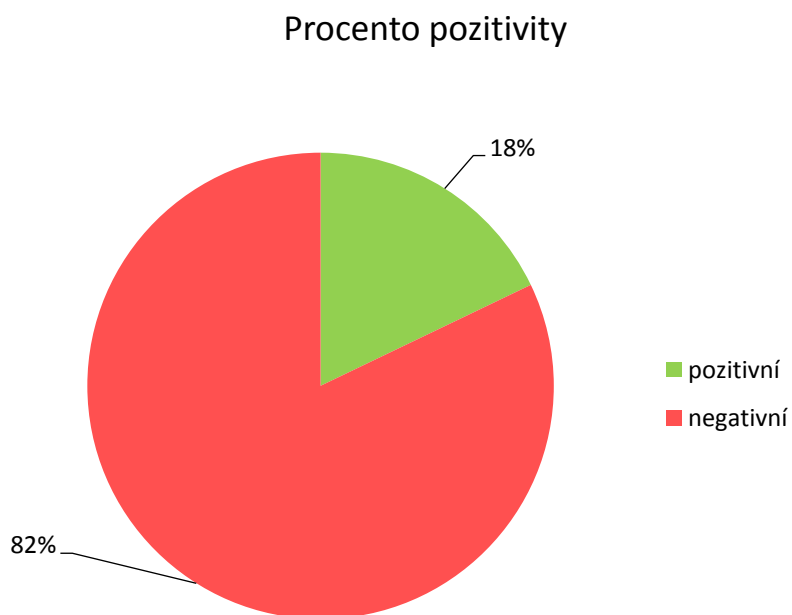
**Obrázek 7 Nejčastější nálezy u mužů**

(zdroj: vlastní zpracování)

#### 4.2 Procento pozitivit

Zjistit procento pozitivit k celkovému počtu odebraných hemokultur v letech 2014-2018 bylo posledním cílem této bakalářské práce.

Z grafu na obrázku č. 8 je patrné, že vzhledem k celkovému počtu 9136 hemokultur bylo vyhodnoceno 18 % (1633) jako pozitivní, tzn., byl zachycen nějaký mikrobiální původce. 82 % hemokultur (7503) bylo vyhodnoceno jako negativní – nevykazovaly růst žádného infekčního agens.

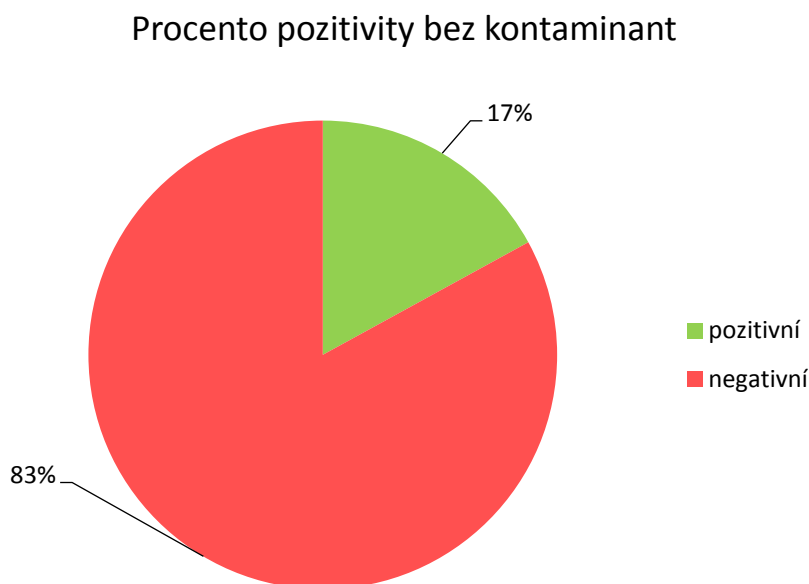


**Obrázek 8 Procento pozitivity**

(zdroj: vlastní zpracování)



V celkovém počtu pozitivních vzorků je zahrnuta i skupina plasmakoagulasa negativních stafylokoků (94 vzorků) a vzdušných sporulujících mikroorganismů (13 vzorků). Pokud nejsou dále dourčeny, jsou považovány za kontaminanty a nebyla prokázána souvislost mezi výskytem bakterie v hemokultuře a stavem pacienta. Z počtu pozitivních nálezů bylo tedy pro přesnost odečteno 107 vzorků s těmito nálezy a procento positivity se snížilo o 1 %, tj. 17 % (viz obrázek č. 9).

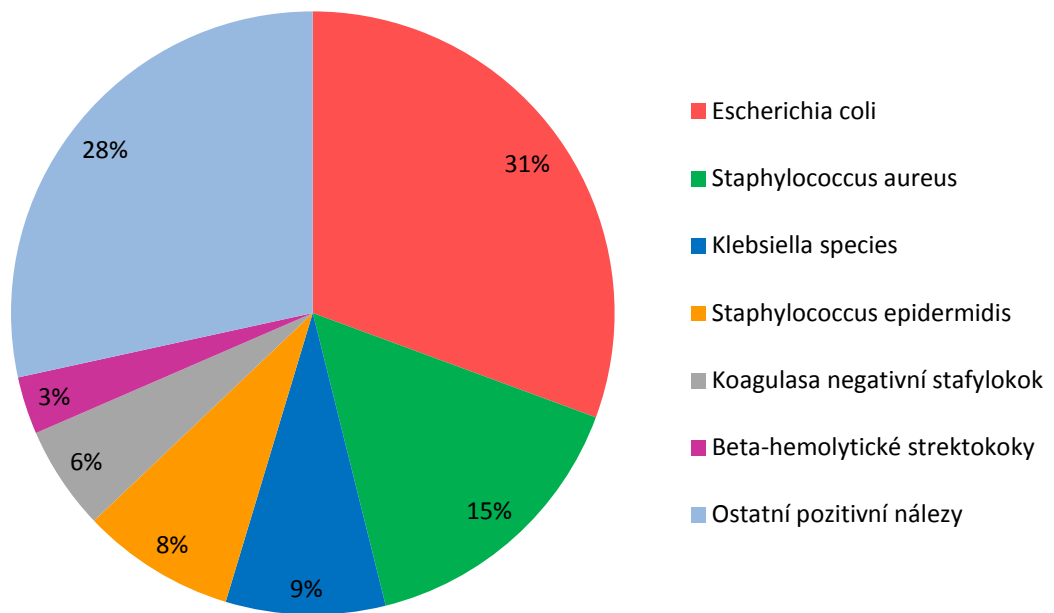


**Obrázek 9 Procento positivity bez kontaminant**

(zdroj: vlastní zpracování)

Ze všech pozitivních nálezů bylo vyfiltrováno 5 nejčastějších, ostatní byly sečteny a souhrnně označeny jako „ostatní pozitivní nálezy“. Z těchto dat vznikl graf (viz obrázek č. 10), na němž se ukázala procentuální pozitivita vybraných izolátů vzhledem k počtu všech pozitivních hemokultur. *Escherichia coli* tvoří 31 % všech pozitivních nálezů, *Staphylococcus aureus* 15 %, *Klebsiella species* 9 %, *Staphylococcus epidermidis* 8 %, beta-hemolytické streptokoky 3 % a ostatní pozitivní nálezy 28 %. Koagulasa negativní stafylokok, který je hodnocen jako kontaminanta tvoří 6 % všech pozitivních nálezů.

## Procenta pozitivit nálezů



**Obrázek 10 Procenta pozitivit nálezů**

(Zdroj: vlastní zpracování)

Pro zjištění statistické významnosti jsem použila chí kvadrát test s hladinou významnosti 5 %. Hodnota signifikance (p) vyšla menší než 0,05, nulová hypotéza se zamítá. Z toho vyplývá statistická významnost těchto dat.

## 5 Diskuze

Během let 2014-2018 bylo na oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a.s. vyšetřeno automatickým hemokultivačním systémem BACTEC 9136 hemokultur od 3027 pacientů. Při odběru vzorků na hemokultivační vyšetření se obvykle odebírá jedna sada vzorků za den od jednoho pacienta, tzn. nejméně 4 hemokultury. Statistickým zpracováním dat bylo zjištěno, že v Nemocnici Písek, a.s. se nejčastěji provádí odběr dvou hemokultur v sadě (u 1312 pacientů) – jedna aerobní a jedna anaerobní lahvička. Druhým nejčastějším počtem odebíraných hemokultur byla jedna (u 648 pacientů). Pokud se provede odběr více hemokultur od jednoho pacienta, je větší šance na detekci patogenů. Největším počtem odebíraných hemokultur v sadě je 6. Větší počet znamená, že u některých pacientů je hemokultivace prováděna opakovaně během delšího časového úseku. Většina z pacientů, kterým byla odebrána jedna hemokultura, jsou malé děti. U nich je problém v odběru dostatečného množství vzorku krve na hemokultivační vyšetření, tudíž musí stačit jen jeden vzorek odebraný do pediatrické lahvičky. Další problém se týká objemu krve v pediatrické lahvičce, který je jen 3 ml, proto může docházet k menšímu záchytu pozitivitu. Na dětském oddělení Nemocnice Písek, a. s. jsou odebírány všechny vzorky dětí do pediatrických lahviček, nebere se ohled na stáří a váhu dítěte, tato skutečnost také může ovlivnit záchyt patogena.

Při rozdělení pacientů do věkových skupin se ukázalo, že nejvíce hemokultur bylo odebráno od pacientů ve věku 61-90 let. Dohromady 6550 hemokultur z celkového počtu 9136. Stejný věkový rozsah pacientů s největším počtem odebraných hemokultur uvádí ve své práci Jelínková (2017). Důvodem jsou časté operační zákroky a pobyt v nemocnici v souvislosti se zvyšujícím se věkem. Ve všech věkových kategoriích do 80 let bylo od mužů odebráno více hemokultur, např. ve skupině 61-80 let bylo od mužů odebráno celkem 2696 hemokultur, od žen jich bylo odebráno 1913, tzn. o 783 méně za období 2014-2018. Na tento fakt má pravděpodobně vliv prostata a s ní související močové obtíže u starších mužů, a také ranné infekty na dolních končetinách spojené s ischemickou chorobou dolních končetin a diabetem. Naopak je to od 81 let a výš, kdy bylo odebráno více vzorků od žen. Tento fakt může mít souvislost s tím, že ženy se dožívají vyššího věku.

Z celkového počtu 9136 hemokultur přístroj označil 1633 jako pozitivní. Procentuální míra pozitivitu je tedy 18 %. Od pozitivních vzorků bylo odečteno 107 hemokultur,

kteře vykazovaly pozitivitu na koaguláza negativní stafylokoky a vzdušné sporulující mikroby. Bakterie z těchto skupin nebyly dourčeny do species, tudíž byly jednoznačně považovány za kontaminantu a nebyla prokázána souvislost mezi výskytem bakterie v hemokultuře a stavem pacienta. Procento positivity s pravděpodobným infekčním agens se tímto snížilo na 17 %. Stejně procento positivity uvádí ve svém výzkumu také Vanišová (2015).

Zjištěné mikrobiální spektrum obsahuje širokou škálu grampozitivních, gramnegativních, anaerobních i kvasinkových původců. Je zřejmé, že si do krevního řečiště najde cestu jakákoliv bakterie nebo kvasinka. Celkem bylo objeveno 36 různých mikrobiálních původců, z nichž některé jsou hodnoceny jako kontaminanty. U některých agens je patogenita sporná, např. rod *Lactococcus*.

Nejčastějším nálezem izolovaným z hemokultur v Nemocnici Písek, a.s. se stala v tomto výzkumu *Escherichia coli*. Vyskytovala se ve 31 % všech pozitivních vzorků, což činí 516 hemokultur a častěji byla nalezena u žen (303 vzorků) než u mužů (210 vzorků). Důvodem takového výskytu může být fakt, že *Escherichia coli* je součástí běžné střevní mikroflóry člověka. Snadno se tedy zanesse do rány např. po úrazu nebo operaci a způsobí bakteriémi. Může také tvořit biofilmy na cizích materiálech, jako jsou katétry, stenty apod. Šenkýřová (2012) označila nejčastějším gramnegativním původcem *Escherichia coli*. Podle studie Koláře a spol. (2002) byl nejčastěji identifikován kmen *Escherichia coli* v 31,8 %. S tímto se shodují výsledky práce. Dalším častým nálezem byl *Staphylococcus aureus* objevený ve 261 vzorcích (15 %). Ten se naopak vyskytoval více v hemokulturách od mužů (159 vzorků). *Klebsiella species* byla objevena ve 144 vzorcích (9 %) také ve větším počtu u mužů (93 vzorků). *Staphylococcus epidermidis* ve 139 vzorcích (8 %) téměř ve stejném počtu u žen i mužů a beta-hemolytické streptokoky v 52 hemokulturách (3 %), častěji u mužů. Tyto streptokoky jsou ze skupin A, B, C, G a byly dourčeny. Ve skupině novorozenců do 30 dnů byl objeven jeden beta-hemolytický streptokok skupiny B, který vyvolal novorozeneckou sepsi. V ostatních věkových skupinách byly zjištěny beta-hemolytické streptokoky v souvislosti s rannými infekcemi. Podle výzkumu Karlowsky et al. (2004) se *Staphylococcus aureus* vyskytoval v 16,5 % z celkového počtu zkoumaných pozitivních nálezů. Procento je téměř totožné s výskytem *Staphylococcus aureus* v této práci. *Klebsiella species* se podle výzkumu Opota et al. (2015) potvrdila v 7,1 % a beta-hemolytické streptokoky ve 2 % z počtu pozitivních hemokultur. Procento výskytu *Klebsiella species* v této práci je

téměř o 2 % vyšší a procento výskytu beta-hemolytických streptokoků je o 1 % vyšší. Pro lepší porovnání s literaturou byly všechny hemokultury s dourčenými stafylokoky sečteny dohromady, tj. 516 vzorků. Procentuální zastoupení těchto stafylokoků je celkem 31,6 %. Opota et al. (2015) uvádí ve své práci 23,7 % stafylokoků z celkového počtu pozitivních vzorků. Vyšší procento v této bakalářské práci je způsobeno jistě také tím, že v Nemocnici Písek, a.s. je velká ortopedie s rozsáhlou operativou a dělají se zde replantace. Dále se na ARO překládají pacienti z vyšších pracovišť po operacích na mozku. Častý záchyt stafylokoků je také ze spondylodiscitid a u uživatelů drog.

## 6 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala vyšetřováním hemokultur v automatickém hemokultivačním systému. Hemokultivační vyšetření, následné zpracování pozitivních hemokultur a určení původce infekce krevního řečiště je důležitým krokem k zahájení správné antibiotické léčby. Prvním cílem bylo osvojit si praktické zpracování hemokultur v automatickém hemokultivačním systému. Tento cíl byl splněn na oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a.s., kde byla práce pod odborným dohledem vedena. V laboratoři probíhalo osvojení práce s automatickými hemokultivačními systémy BACTEC 9050 a BACTEC FX 40 a následné zpracování pozitivních vzorků k dourčení infekčního agens. Druhým cílem bylo zjistit mikrobiální spektrum v hemokulturách v letech 2014-2018 v Nemocnici Písek, a.s. a třetí cíl byl formulován jako zjištění procenta pozitivit k celkovému počtu odebraných hemokultur v letech 2014-2018. Tyto dva cíle byly také splněny formou statistického výzkumu provedeného z dat poskytnutých mikrobiologickou laboratoří, kde probíhala práce s hemokulturami. Ze širokého mikrobiálního spektra byly nejčastějšími izoláty *Escherichia coli* (31 %), *Staphylococcus aureus* (15 %) a *Klebsiella pneumoniae* (9 %). Toto zjištění je v souladu s odbornou literaturou. Z celkového počtu 9136 vyšetřených vzorků vykazovalo pozitivitu 1663, tj. 18 %. Bez skupiny koaguláza negativních stafylokoků a vzdušných sporulujících mikrobů, které jsou považovány za kontaminanty, je procento positivity s pravděpodobným infekčním agens 17 %. Výsledek je v souladu s porovnávanou literaturou. Pro snížení případů kontaminace hemokultur je velmi důležitý aseptický odběr vzorků krve. Při zpracovávání této bakalářské práce došlo ke zjištění, že na dětském oddělení Nemocnice Písek, a.s. se provádí odběr hemokultur u všech pacientů do pediatrických lahvíček bez ohledu na jejich věk a váhu. Tato skutečnost může ovlivnit záchyt patogena v hemokultuře. Na základě tohoto zjištění byla přehodnocena strategie odběru hemokultur na tomto oddělení.

## 7 Seznam použité literatury

1. ARBUTHNOTT, J. P., 1999. Stafylokoky: Infekce kůže a ran; absces; osteomyelitida; alimentární intoxikace. In: GREENWOOD, D. et al. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, s. 181-187. ISBN 80-7169-365-0.
2. BEDNÁŘ, M. et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. 560 s. ISBN 859-40-315-0528-0.
3. BERGIN, S. P. et al., 2015. Bacteremia, Sepsis, and Infective Endocarditis Associated with *Staphylococcus aureus*. In: BAGNOLI, F., RAPPUOLI, R., GRANDI, G. (eds). *Staphylococcus aureus: Current Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 409. Springer, Cham, s. 263-296. [online]. [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1007/82\_2015\_5001. Dostupné z: [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F82\\_2015\\_5001#citeas](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F82_2015_5001#citeas)
4. BLAŽKOVÁ, M., KARAMONOVÁ, L., FUKAL, L., RAUCH, P., 2005. *Listeria monocytogenes* - NEBEZPEČNÝ PATOGEN A JEHO DETEKCE V POTRAVINÁCH. *Chem. Listy* [online]. 99, 467-473 [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_07\\_467-473.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_07_467-473.pdf)
5. BROADLEY, M., SCHWEON, S. J., 2017. Get the facts about *Fusobacterium*. *Nursing* [online]. 47(5), 64-65 [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1097/01.NURSE.0000515524.23032.d5. ISSN 0360-4039. Dostupné z: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00152193-201705000-00018>
6. ČERMÁK, P., 2008. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. Praha: MAXDORF-JESSENIUS. 182 s. ISBN 9788073451424.
7. EHRMANN, J. et al., 2014. *Hepatologie* [online]. 2. vydání. Grada. 658 s. ISBN 9788024780214. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=4nHeBAAAQBAJ&pg=PA284&lpg=PA284&dq=pyogenn%C3%AD+koky&source=bl&ots=SMRtAcmoXP&sig=ACfU3U2EG\\_-xBUeBJ1mW1gRiK6a6MxiaQ&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwiz0tXu3ZPhAhVNAKHx51C6YQ6AEwCXoECAUQAQ#v=onepage&q=pyogenn%C3%AD%20koky&f=false](https://books.google.cz/books?id=4nHeBAAAQBAJ&pg=PA284&lpg=PA284&dq=pyogenn%C3%AD+koky&source=bl&ots=SMRtAcmoXP&sig=ACfU3U2EG_-xBUeBJ1mW1gRiK6a6MxiaQ&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwiz0tXu3ZPhAhVNAKHx51C6YQ6AEwCXoECAUQAQ#v=onepage&q=pyogenn%C3%AD%20koky&f=false)
8. FISHER, K., PHILLIPS, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* [online]. 155(6), 1749-1757 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1099/mic.0.026385-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.026385-0>

9. FORIS, L. A., SNOWDEN, J., c2019. *Proteus Mirabilis Infections* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442017/#\\_NBK442017\\_pubdet\\_](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442017/#_NBK442017_pubdet_)
10. GREENWOOD, D. et al., 1999. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1., čes. Praha: Grada. ISBN 80-716-9365-0.
11. GROMAN, R. P., 2009. Gram-Negative Infections. *Small Animal Critical Care Medicine* [online]. Elsevier. 469-473 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1016/B978-1-4160-2591-7.10109-2. ISBN 9781416025917. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781416025917101092>
12. GÜL, F., CINEL, I., KUMAR, A., ARSLANTAS, M. K., 2017. Changing Definitions of Sepsis. *Turk J Anaesthesiol Reanim* [online]. **45**(3), 129-138 [cit. 2019-02-16]. DOI: 10.5152/TJAR.2017.93753. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5512390/>
13. HOWARD, A. J., 1999. Hemofily: Infekce dýchacího ústrojí; meningitida; měkký vřed. In: GREENWOOD, D. et al. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, s. 319-324. ISBN 80-7169-365-0.
14. HUTCHINSON, N. A., THOMAS, F. D., SHANSON, D. C., 1992. The clinical comparison of Oxoid Signal with Bactec blood culture systems for the detection of streptococcal and anaerobic bacteraemias. *Journal of Medical Microbiology* [online]. **37**(6), 410-412 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1099/00222615-37-6-410. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-37-6-410>
15. CHUN, K. et al., 2015. Sepsis Pathogen Identification. *Journal of Laboratory Automation* [online]. **20**(5), 539-561 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1177/2211068214567345. ISSN 2211-0682. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2211068214567345>
16. JELÍNKOVÁ, Jana. *Výskyt bakterií a kvasinek v hemokulturách v Oblastní nemocnici Kladno*. Kladno, 2017. Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta biomedicínského inženýrství.
17. KARLOWSKY, J. A. et al., 2004. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [online]. **3**(1) [cit. 2019-08-08]. DOI: 10.1186/1476-0711-3-7. ISSN 14760711. Dostupné z: <http://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-0711-3-7>
18. KAUKONEN, K., BAILEY, M., SUZUKI, S., PILCHER, D., BELLOMO, R., 2014. Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock Among Critically Ill



- Patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* [online]. **313**(13), 1308-1316 [cit. 2019-02-16]. DOI: 10.1001/jama.2014.2637. Dostupné z: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/1850096>
19. KOLÁŘ, M. a spol., 2002. Frekvence gramnegativních patogenů u infekcí krevního řečiště a jejich rezistence k antibiotikům v České republice. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. **8**(2), s. 61-67.
20. *Laboratorní příručka oddělení klinické mikrobiologie*, 2018. [online]. Nemocnice Písek a. s. [cit. 2019-22-04]. Dostupné z: [https://www.nemopisek.cz/media/ke\\_stazeni/OKMLabPrir2018.pdf](https://www.nemopisek.cz/media/ke_stazeni/OKMLabPrir2018.pdf)
21. LAMY, B. et al., 2016. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Frontiers in Microbiology* [online]. [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00697. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00697/abstract>
22. LEVY, M. et al., 2012. Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. [online]. **12**(12), 919-924 [cit. 2019-02-16]. DOI: 10.1016/S1473-3099(12)70239-6. Dostupné z: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(12\)70239-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(12)70239-6/fulltext)
23. MAHENTHIRALINGAM, E., URBAN, T. A., GOLDBERG, J. B., 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **3**(2), 144-156 [cit. 2019-04-08]. DOI: 10.1038/nrmicro1085. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro1085>
24. MUNTAU, A., 2009. *Pediatric*. Praha: Grada. 608 s. ISBN 978-80-247-2525-3.
25. OPOTA, O. et al., 2015. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. **21**(4), 313-322 [cit. 2019-08-08]. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.01.003. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X15001834>
26. OTTO, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis* — the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **7**(8), 555-567 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1038/nrmicro2182. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2182>
27. PRŮCHA, M., FEDORA, M., KIESLICOVÁ, E., ŠRÁMEK, V., 2015. *Sepse*. Praha: Maxdorf. 294 s. ISBN 978-80-7345-448-7.

28. *Příbalová informace BD BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F Culture Vials*, 2016. [online]. Becton Dickinson s.r.o. [cit. 2019-22-04]. Dostupné z: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=18403>
29. *Příbalová informace BD BACTEC Peds Plus/F Culture Vials*, 2016. [online]. Becton Dickinson s.r.o. [cit. 2019-22-04]. Dostupné z: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=35528>
30. *Příbalová informace BD BACTEC Plus Aerobic/F Culture Vials*, 2015. [online]. Becton Dickinson s.r.o. [cit. 2019-22-04]. Dostupné z: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9457>
31. ROHNER, P., AUCKENTHALER, R., 1999. Review on evaluations of currently available blood-culture systems. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. **5**(9), 513-529 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1111/j.1469-0691.1999.tb00429.x. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14645377>
32. ROZSYPAL, H., 2015. *Základy infekčního lékařství*, [online]. Charles University in Prague: Karolinum Press. 572 s. ProQuest Ebook Central, ISBN 978-80-2462-932-2. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/jcucb-ebooks/detail.action?docID=4395911>.
33. SAUGET, M. et al., 2017. Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria?. *Trends in Microbiology* [online]. **25**(6), 447-455 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1016/j.tim.2016.12.006. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X16302128>
34. SHIVAPRAKASHA, S., RADHAKRISHNAN, K., KARIM, P., 2007. Candida spp. other than Candida albicans: A major cause of fungaemia in a tertiary care centre. *Indian Journal of Medical Microbiology* [online]. **25**(4), s. 405-407 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.4103/0255-0857.37350. ISSN 0255-0857. Dostupné z: <http://www.ijmm.org/text.asp?2007/25/4/405/37350>
35. SCHAFFER, J. N., PEARSON, M. M., 2015. Proteus mirabilis and Urinary Tract Infections. *Microbiology Spectrum* [online]. **3**(5) [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013. ISSN 2165-0497. Dostupné z: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013>
36. SCHARFEN, J., 2013. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Praha: Nucleus HK. 236 s. ISBN 978-808-7009-321.
37. SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2. vyd. Praha: Grada. 248 s. ISBN 978-802-4747-712.

38. ŠENKÝŘOVÁ, V., 2012. Hemokultura. *Urol. praxi* [online]. **13**(3), 135-136 [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2012/03/10.pdf?fbclid=IwAR3TD3vk0tzdTna2sEgsl7KGX-XKA4JjwJ7oGzJp8DGKdZhWkPvRlz8fAXY>
39. THORPE, T. C., et al., 1990. BacT/Alert: an Automated Colorimetric Microbial Detection System. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **28**(7), 1608-1612 [cit. 2019-04-23]. Dostupné z: <https://jcm.asm.org/content/jcm/28/7/1608.full.pdf>
40. URBÁŠKOVÁ, P., 2019. *EUCAST dokumenty: Rychlé vyšetření antimikrobní citlivosti přímo z hemokultivačních lahvíček*. [online]. Státní zdravotní ústav. [cit. 2019-04-23]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/rychle-vysetreni-citlivosti-z-hemokultur>
41. VANIŠOVÁ, Petra. *Mikrobiologické vyšetření hemokultur automatizovaným systémem BACTEC*. České Budějovice, 2015. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita, Zdravotně sociální fakulta.
42. VÁGNEROVÁ, I., KOLÁŘ, M., 2003. Možnosti terapie infekcí způsobených vankomycin-rezistentními enterokoky. *Klin Farmakol Farm* [online]. **17**(3), 170-173 [cit. 2019-03-23]. Dostupné z: [https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2003/03/09.pdf?fbclid=IwAR1WGA3K4Qyb3URz0qiGRx\\_bqjH2FtW0p-xWXlfY4w16F-LtcbugEv5HnAc](https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2003/03/09.pdf?fbclid=IwAR1WGA3K4Qyb3URz0qiGRx_bqjH2FtW0p-xWXlfY4w16F-LtcbugEv5HnAc)
43. VISCOLI, C., 2016. Bloodstream Infections: The peak of the iceberg. *Virulence* [online]. **7**(3), 248-51 [cit. 2019-01-23]. DOI: 10.1080/21505594.2016.1152440. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4871637/>
44. VLASATÁ, V. et al., 2017. Korynebakteria v krevním řečišti člověka. *Zprávy CEM* [online]. SZÚ Praha. **26**(11-12), 408-411 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy\\_EM/26\\_2017/11\\_12\\_listopad\\_prosinec/408\\_korynebakteria.pdf?fbclid=IwAR1fqTd5Yf0BRK\\_X6qYFC1LcYXpCU0Ezv26q8yjXNpzDPr81H47CRh3MyM8](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/26_2017/11_12_listopad_prosinec/408_korynebakteria.pdf?fbclid=IwAR1fqTd5Yf0BRK_X6qYFC1LcYXpCU0Ezv26q8yjXNpzDPr81H47CRh3MyM8)
45. VON EIFF, Ch., BECKER, K., MACHKA, K., STAMMER, H., PETERS, G., 2001. Nasal Carriage as a Source of Staphylococcus aureus Bacteremia. *New England Journal of Medicine* [online]. **344**(1), 11-16 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1056/NEJM200101043440102. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200101043440102>
46. VOTAVA, M. et al., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
47. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun. 351 s. ISBN 80-868-5000-5.

48. WARD, N. S., LEVY, M. M., 2017. *Sepsis Definitions, Pathophysiology and the Challenge of Bedside Management* [online]. Switzerland: Humana Press, 271. [cit. 2019-01-23]. ISBN 9783319484709. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=\\_tslDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?id=_tslDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
49. WEINSTEIN, M. P., 1996. Current Blood Culture Methods and Systems: Clinical Concepts, Technology, and Interpretation of Results. *Clinical Infectious Diseases* [online]. **23**(1), 40-46 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1093/clinids/23.1.40. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/clinids/23.1.40>
50. ZÍMOVÁ, J., ZÍMA, P., 2013. Kapavka – gonorrhoea, aktuálně a v přehledu (3. část). *Urol. praxi* [online]. **14**(2), 72-76 [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2013/02/07.pdf>
51. ŽEMLIČKOVÁ, H., 2012. Streptococcus pneumoniae – vliv pneumokokových konjugovaných vakcín na výskyt antibiotické rezistence. *Pediatr. praxi* [online]. **13**(6), 424-426 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://www.pediatriepropraxi.cz/pdfs/ped/2012/06/19.pdf>

## 8 Seznam tabulek a obrázků

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabulka 1 Počet pacientů a odebraných hemokultur</b> .....               | 29 |
| <b>Tabulka 2 Rozdělení do věkových skupin</b> .....                         | 31 |
| <b>Tabulka 3 Rozdělení hemokultur - ženy a muži</b> .....                   | 32 |
| <b>Tabulka 4 Mikrobiální spektrum - do 20 let</b> .....                     | 33 |
| <b>Tabulka 5 Mikrobiální spektrum - nad 20 let</b> .....                    | 34 |
| <b>Tabulka 6 Mikrobiální spektrum - celkem</b> .....                        | 35 |
| <b>Tabulka 7 Nejčastější nálezy</b> .....                                   | 36 |
| <b>Tabulka 8 Nejčastější nálezy u žen</b> .....                             | 38 |
| <b>Tabulka 9 Nejčastější nálezy u mužů</b> .....                            | 39 |
| <br>  |    |
| <b>Obrázek 1 Počet pacientů a odebraných hemokultur</b> .....               | 30 |
| <b>Obrázek 2 Rozdělení věkových skupin</b> .....                            | 31 |
| <b>Obrázek 3 Rozdělení hemokultur - ženy a muži</b> .....                   | 32 |
| <b>Obrázek 4 Nejčastější nálezy</b> .....                                   | 36 |
| <b>Obrázek 5 Nejčastější nálezy u jednotlivých věkových kategorií</b> ..... | 37 |
| <b>Obrázek 6 Nejčastější nálezy u žen</b> .....                             | 38 |
| <b>Obrázek 7 Nejčastější nálezy u mužů</b> .....                            | 39 |
| <b>Obrázek 8 Procento positivity</b> .....                                  | 40 |
| <b>Obrázek 9 Procento positivity bez kontaminant</b> .....                  | 41 |
| <b>Obrázek 10 Procenta pozitivit nálezů</b> .....                           | 42 |

## Příloha

### Příloha č. 1 Hemokultivační lahvičky Bactec



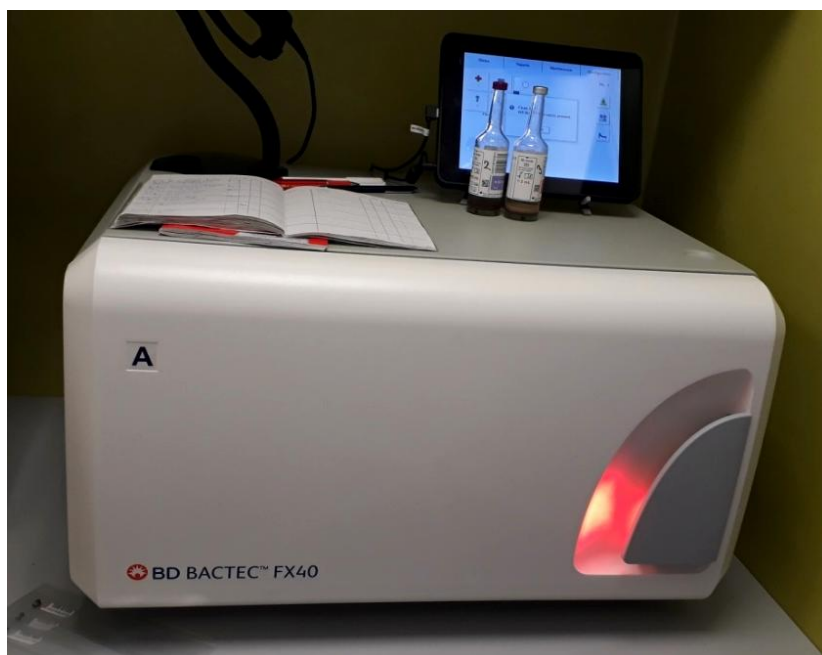
### Příloha č. 2 Lahvička Oxoid Signal



Příloha č. 3 Přístroj BACTEC 9050



Příloha č. 4 Přístroj BACTEC FX40



Příloha č. 5 Inokulovaná lahvička Oxoid Signal



Příloha č. 6 Karusel přístroje BACTEC 9050





Příloha č. 7 Pozice pro hemokultury BACTEC FX40



Příloha č. 8 Pozitivní lahvičky Bactec (zákal)



Příloha č. 9 Pozitivní lahvička Oxoid Signal



Příloha č. 10 Inokulace kultivačních půd



## Seznam zkratk

|                 |  |
|-----------------|--|
| SPS             | Polyanethol sulfonát sodný                                 |
| CO <sub>2</sub> | Oxid uhličitý  |
| HAI             | Health care-associated infections                          |
| MRSA            | Meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>         |
| ESBL            | Extended Spectrum Beta-Lactamases                          |
| M.I.C.          | Minimální inhibiční koncentrace                            |
| MALDI-TOF       | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight |
| PCR             | Polymerázová řetězová reakce                               |