



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Vyšetřování hemokultur z interních oddělení
Nemocnice Tábor, a.s.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

Autor: Mgr. Kamila Smržová

Vedoucí práce: MUDr. Alice Kuchařová

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Vyšetřování hemokultur z interních oddělení Nemocnice Tábor, a.s.*“ 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 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 práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2. 5. 2019

.....

Kamila Smržová

Poděkování

Ráda bych poděkovala paní MUDr. Alici Kuchařové za odborné vedení mé bakalářské práce. Poděkování patří i kolektivu Stanice lékařské mikrobiologie Nemocnice Tábor, a.s. za ochotu a cenné rady a připomínky týkající se praktické části práce. Nakonec bych chtěla mnohokrát poděkovat svojí rodině za to, že mě v průběhu studia maximálně podporovala a vycházela mi vstříc, bez čehož bych se ani k psaní této práce nedostala.

Vyšetřování hemokultur z interních oddělení Nemocnice Tábor, a.s.

Abstrakt

Předkládaná práce se zabývá vyšetřováním hemokultur z interních oddělení Nemocnice Tábor, a.s. V teoretické části jsou představeny nejdůležitější pojmy vztahující se k tématu infekcí krevního řečiště a sepse. Pozornost je také zaměřena na důležitý projekt v rámci Evropy EARS-Net.

V praktické části je popsán postup laboratorního vyšetření hemokultur ve všech jeho fázích (preanalytická, analytická, postanalytická) včetně postupu prací v případě pozitivity vzorku. Dále práce hodnotí data o hemokulturách odebraných na interních odděleních Nemocnice Tábor, a.s. za rok 2018, přičemž stanovuje incidenci gramnegativních bakterií u pozitivních vzorků a snaží se postihnout rozdíly mezi skupinami komunitních a hospitalizovaných pacientů. Posledním bodem je pak poskytnutí přehledu o rezistenci k antibiotikům u nejčastěji zachycených gramnegativních tyčinek včetně srovnání s daty z EARS-Net (průměr za interní oddělení v Česku).

Za rok 2018 bylo vyhodnoceno jako pozitivní celkem 527 hemokultivačních lahviček. Po odstranění duplicit a kontaminací bylo k další analýze použito celkem 267 pozitivních lahviček, ze kterých bylo vykultivováno celkem 97 kmenů gramnegativních tyčinek. Mezi nejčastěji zachycené gramnegativními bakteriálními druhy v pozitivních vzorcích patřily *Escherichia coli* (48,5 %) a *Klebsiella pneumoniae* (22,7 %). Rozdíly mezi skupinami komunitních a hospitalizovaných pacientů byly zachyceny pouze u kmene *Klebsiella pneumoniae*, výrazněji se však spektrum patogenů nelišilo. Při zhodnocení míry rezistence dvou nejčastěji zastoupených bakteriálních druhů je i ve srovnání s daty s EARS-Net (průměr za interní oddělení v Česku) znepokojující vyšší frekvence výskytu kmenů druhu *Klebsiella pneumoniae* rezistentních k cefalosporinům třetí generace a ciprofloxacinu.

Klíčová slova

sepe; hemokultura; kultivace; gramnegativní tyčinka; EARS-Net; antibiotika; rezistence

Diagnostics of the blood cultures from the departments of internal medicine in Nemocnice Tábor, a.s.

Abstract

The thesis describes blood culture testing at internal medicine departments of Nemocnice Tábor, a.s. (Tábor Hospital). The theoretical part presents the most important terms related to infections of the bloodstream and sepsis. EARS-Net, an important European project is also mentioned.

The practical part describes blood culture laboratory process in all phases (pre-analytical, analytical and post-analytical) including the steps taken when a sample is positive. Furthermore, the study evaluates data on blood cultures done at internal medicine departments of Nemocnice Tábor, a.s. in 2018, determining the incidence of gram-negative bacteria in positive samples and seeking to describe the differences between community and hospitalised patient groups. Finally, the study also gives an overview of antibiotic resistance in the most commonly detected gram-negative rods including a comparison to EARS-Net data (mean value for internal medicine departments in the Czech Republic).

In total, 527 blood culture vials were tested as positive in 2018. A total of 267 positive vials were analysed further after the removal of duplicities and contaminations; a total of 97 strains of gram-negative rods were cultured from the vials. The most commonly detected gram-negative bacterial strains found in positive samples included *Escherichia coli* (48.5%) and *Klebsiella pneumoniae* (22.7%). Differences between community and hospitalised patient groups were found only for *Klebsiella pneumoniae*; however, the pathogens spectra in both groups were not distinctively different. In terms of resistance assessment in the two most common bacterial strains, a higher frequency of incidence of *Klebsiella pneumoniae* strains resistant to third generation cephalosporins and ciprofloxacin is alarming, also in comparison to EARS-Net data (mean value for internal medicine departments in the Czech Republic).

Keywords

sepsis; blood culture; culture; gram-negative rod; EARS-Net; antibiotics; resistance

Obsah

ÚVOD	9
I. TEORETICKÁ ČÁST	10
1. Základní definice a pojmy	10
1.1 Bakteriémie	11
1.2 Infekce krevního řečiště.....	11
1.3 SIRS.....	12
1.4 Sepse.....	12
1.4.1 Sepse 1	12
1.4.2 Sepse 2	13
1.4.3 Sepse 3	13
2. Sepse v rámci Česka.....	15
2.1 Původci sepse.....	16
2.2 Nejčastější gramnegativní původci sepse.....	18
2.2.1 Enterobacteriaceae.....	18
2.2.2 Gramnegativní nefermentující bakterie.....	19
3. Antibiotika.....	21
3.1 Rezistence k antibiotikům.....	22
3.1.1 Primární a sekundární rezistence k antibiotikům.....	22
3.1.2 Nozokomiální nákazy.....	23
3.2 Monitorování antibiotické rezistence – EARS-Net.....	24
3.2.1 Sběr dat v rámci EARS-Net.....	24
3.2.2 Metody stanovení citlivostí k antibiotikům	24
3.2.3 Vybrané antibiotické přípravky sledované v EARS-Net	27
4. Vyšetřování hemokultur	30
4.1 Příprava pacienta a odběr krve	30
4.1.1 Objem krve a počet lahvíček k hemokultivaci	31

4.2	<i>Transport a skladování materiálu</i>	31
4.3	<i>Zpracování v laboratoři</i>	32
4.3.1	<i>Kultivace</i>	32
4.3.2	<i>Negativní vzorek</i>	32
4.3.3	<i>Pozitivní vzorek</i>	32
4.3.4	<i>Kontaminace</i>	33
II.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
5.	Cíle práce a hypotézy	34
6.	Metodika	35
6.1	<i>Zpracování hemokultur v mikrobiologické laboratoři Nemocnice Tábor, a.s.</i>	35
6.1.1	<i>Preanalytická fáze</i>	35
6.1.2	<i>Analytická a postanalytická fáze</i>	35
6.2	<i>Statistická data - sběr a zpracování</i>	37
7.	Výsledky	39
7.1	<i>Statistika hemokultivačních lahviček</i>	39
7.2	<i>Struktura pacientů s pozitivním vzorkem</i>	40
7.3	<i>Struktura zjištěných patogenních mikroorganismů</i>	42
7.3.1	<i>Gramnegativní tyčinky</i>	43
7.3.2	<i>Gramnegativní tyčinky – komunitní vs. hospitalizovaní pacienti</i>	44
7.4	<i>Rezistence k antibiotikům u dvou nejčastěji zachycených mikroorganismů</i>	45
7.4.1	<i>Escherichia coli</i>	45
7.4.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	46
7.4.3	<i>Srovnání s daty z EARS-Net</i>	46
8.	Diskuze	49
9.	Závěr	53
10.	Seznam literatury	54
11.	Seznam obrázků	59

12. Seznam tabulek.....	60
13. Přílohy	61
14. Seznam zkratek.....	62

ÚVOD

Sepse patří k velice závažným stavům, pro jejichž léčbu je důležitá včasná a správná diagnostika jejich původce. Kultivace hemokultur a následná diagnostika původců sepse v pozitivních vzorcích jsou pak významnou součástí každodenní rutiny většiny mikrobiologických laboratoří nemocničních zařízení v Česku. Pomineme-li použití nejmodernějších molekulárně diagnostických metod k určení původců sepsí (metody založené na PCR – př. SeptiFast), zůstává hemokultivace nezbytným diagnostickým prostředkem. Při zpracování hemokultur je důležité zachování přesného pracovního postupu při provádění jednotlivých fází laboratorního vyšetření. Každá z fází má svá úskalí a jakékoliv pochybení se může ve výsledku vyšetření projevit, a snížit tak jeho vypovídací hodnotu či ho zcela znehodnotit, což může být fatální pro pacienta. Existence standardních operačních postupů riziko chyby snižuje, vždy ale hraje roli lidský faktor.

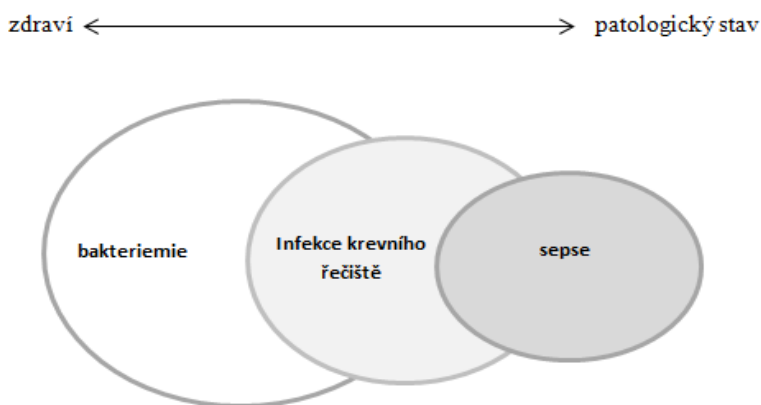
Kromě včasné a správné diagnostiky původce sepse za pomoci kultivace je důležitá také znalost nejčastějších bakteriálních původců sepsí a jejich rezistence k antibiotikům v rámci daného nemocničního zařízení a samozřejmě dalších informací (př. primární infekce, výsledky dalších vyšetření). To umožňuje lékařům zahájit co nejvhodnější antibiotickou léčbu ještě před konečným výsledkem hemokultivace. Gramnegativní bakterie – hlavně enterobakterie a gramnegativní nefermentující tyčinky přitom tvoří významnou část původců sepse (Kolář, 2016). Jejich rezistence na antibiotika je mimo jiné také analyzována a vyhodnocována už od roku 1999 v rámci projektu The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (dále jen EARS-net), neboť možné rezistence bakterií představují hrozbu od lokální až po mezinárodní úroveň.

Důležitost výše uvedeného byla zohledněna v této práci. Ta se zabývá vyšetřováním hemokultur z interních oddělení Nemocnice Tábor, a.s. (se zaměřením na gramnegativní tyčinky), tedy konkrétním pracovištěm, v časovém horizontu jednoho roku. Jaká je skladba patogenů nalezených v pozitivních vzorcích, jaká je jejich rezistence k antibiotikům a do jaké míry je možné porovnávat získaná data s daty na národní úrovni, to jsou nejdůležitější otázky, na které bude tato práce hledat odpovědi.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1. Základní definice a pojmy

Terminologii vztahující se k situaci, kdy mikroorganismus proniká do krevního řečiště a působí v organismu, popsal Čermák (2008). Jeho schéma (viz obrázek 1) vyjadřuje vzájemný vztah základních pojmů: bakteriemie, infekce krevního řečiště, sepse.



Obrázek 1: Schéma znázorňující vztah pojmů bakteriemie, infekce krevního řečiště a sepse

Zdroj: Čermák, 2008

Zároveň poznamenává, že sepse je zahrnuta do podskupiny syndromu systémové zánětlivé odpovědi (= SIRS - systemic inflammatory response syndrome) – viz obrázek níže. Vysvětlení výše uvedených a dalších základních pojmů bude obsahem následujících podkapitol.



Obrázek 2: Infekce, SIRS a sepse, vzájemný vztah a příčiny

Zdroj: Čermák, 2008

1.1 Bakteriemie

Proniknutí mikroorganismů do krevního řečiště bez projevu klinických příznaků se nazývá bakteriemie. Typologie bakteriemií je vytvořena na základě délky setrvání bakterií v krevním oběhu. Jako přechodná se označuje ta bakteriemie, kdy se bakterie v krvi vyskytují pouze na krátkou dobu, v řádu několika minut. Může k ní dojít např. při lékařských zákrocích v oblastech osídlených běžnou flórou. Obranné mechanismy napadeného organismu (fagocytóza) pomáhají pak odstranit bakterie. Intermittentní bakteriemie znamená přítomnost bakterií v krvi v intervalech, např. u lokalizovaných orgánových infekcí. Je-li obrana hostitelského organismu překonána, hovoříme o kontinuální (stálé) bakteriemii (Čermák, 2008; Scharfen, 2014; Schindler, 2014).

Typy bakteriemií však mohou být také hodnoceny z hlediska množství bakterií v daném objemu krve. Čermák (2008) hovoří o nízké, střední a vysoké bakteriemii, kdy první z uvedených odpovídá rozmezí 10-20 bakterií v 1 ml krve, druhé asi 50 bakterií v 1 ml krve a třetí 80 a více bakterií v 1 ml krve (typická pro malé děti). Uvádí také, že z bakteriemie se může, ale i nemusí rozvinout infekce krevního řečiště.

1.2 Infekce krevního řečiště

Pokud se mikroorganismy dostanou do krevního řečiště a navíc pacient jeví známky celkové infekce, může být tento stav označen jako infekce krevního řečiště - dále jen IKŘ (Čermák, 2008). Samotný pojem infekce lze pak vysvětlit jako interakci mezi mikro a makroorganismem a je možné ji chápat ve dvou významech - buď jako proniknutí původce do hostitelského organismu nebo jako působení tohoto původce na hostitelský organismus v průběhu trvání jejich interakce (Beneš, 2009).

Calandra a Cohen (2005) rozdělují IKŘ způsobené bakteriálními původci na primární, sekundární, infekční endokarditidy a katéetrové IKŘ. K potvrzení primární či sekundární IKŘ je podmínkou pozitivní hemokultivace. V prvním případě (u primárních IKŘ) není znám původ infekce, tj. došlo k vyloučení kontaminace a spojitosti s jiným infekčním procesem, a v případě druhém (u sekundárních IKŘ) je potvrzený původce infekce původcem infekce v jiném místě, zároveň je však vyloučena kontaminace jako u primárních IKŘ (Calandra a Cohen, 2005; Čermák, 2009).

1.3 SIRS

Syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS = systemic inflammatory response syndrome) může být vyvolán infekcí a stejně tak může mít i neinfekční příčinu (př. poškození tělních tkání při těžkém úrazu). Jedná se tedy o fyziologické reakce na patologické agens, a pokud je vyvolán infekcí, jde o sepsi (Klaban, 2005; Beneš, 2009).

Kritéria pro diagnostiku SIRS byla diskutována v rámci konsenzuálních konferencí, kde se jednalo hlavně o definování pojmu sepse (viz následující kapitola).

1.4 Sepse

Definice sepse se v čase neustále vyvíjí a je upravována tak, aby byla co možná nejvýstižnější a nejpřesnější. Za posledních třicet let byla správnost definice diskutována hned třikrát.

1.4.1 Sepse I

Na konferenci v roce 1991 v Chicagu, kde dvě významné společnosti Society of Critical Care Medicine (dále jen SCCM) a American College of Chest Physicians přijaly definici sepse R.C.Bona. Ten sepsi popisuje jako syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS = Systemic inflammatory response syndrome) při infekci. Sepse je tedy podkategorie SIRS. Tato definice je nazývána Sepsis-1 (Balk a Bone, 1989; Holub, 2018).

O SIRS se hovořilo, pokud byla splněna minimálně dvě kritéria z následujících: teplota vyšší než 38 °C nebo nižší než 34 °C, srdeční frekvence vyšší než 90/min, dechová frekvence vyšší než 20/min nebo parciální tlak oxidu uhličitého větší než 32 mm Hg (1 mm Hg = 0,1333 kPa), leukocyty vyšší než 12 000/μl nebo menší než 4 000/μl (Zadák a Havel, 2007; Čermák, 2008; Beneš, 2009).

Na konferenci v Chicagu v roce 1992 byla kromě definice SIRS a sepse také řešena klasifikace sepsí, kdy byla rozlišena tři stádia: sepse, těžká sepse a septický šok. Sepsí byla tedy myšlena SIRS při infekci, těžkou sepsí sepse s orgánovou dysfunkcí, hypoperfuzí (= snížené prokrvení tkáně) nebo hypotenzí a septickým šokem případ těžké sepse s hypotenzí bez reakce na tekutinovou resuscitaci (Levy et al., 2003).

1.4.2 Seps 2

K dalším změnám týkajících se tématu seps 2 došlo až v roce 2001 v rámci další konsenzuální konference. Podstata definice seps 2 (= systémová zánětlivá odpověď na infekci) zůstala nezměněná, avšak došlo k rozšíření diagnostických kritérií (viz obrázek 3 str. 14), neboť původní kritéria byla sice uznána za platná, avšak byla také zdůrazňována jejich nízká specifita. Proto byla snaha kritéria seps 2 upřesnit a rozšířit, což však paradoxně vedlo k dalšímu prohloubení jejich nízké specifity. Definice seps 2 po této konferenci byla označována jako Sepsis-2 (Levy et al., 2003; Matějovič, 2017, Holub, 2018).

Byl také vytvořen koncept „PIRO“, což je schéma, jehož východiskem jsou čtyři hlavní charakteristiky seps 2: predispozice k sepsi (= P - predisposing conditions), vyvolávající infekce, inzult (= I - insult), hostitelská odpověď na infekci (= R - response) a stav orgánů (= O – organ dysfunction) – jejich případná dysfunkce či selhávání. Podle těchto charakteristik lze rozdělovat pacienty, jedná se tedy o jakési kvalifikační schéma (Levy et al., 2003; Holub, 2018).

1.4.3 Seps 3

Zatím posledním mezníkem pro definici seps 3 byl rok 2016, kdy Evropskou společností intenzivní medicíny ESICM (European Society of Intensive Care Medicine) a SCCM byla vydána nová definice seps 3 tzv. Sepsis-3. Jejím vzniku předcházela vznik pracovní skupiny v roce 2014, kde byli zastoupeni různí odborníci, kteří se zabývali tématem seps 3 (infektologové, chirurgové, intenzivisté a další). Hlavním úkolem této pracovní skupiny bylo nahradit předchozí definici seps 3 a septického šoku, neboť v průběhu předchozích let došlo k lepšímu porozumění jejich patofyziologie. Bylo také nutné odlišit sepsi od nekomplikované infekce. Zároveň bylo jednohlasně vyřčeno, že použití kritérií SIRS pro identifikaci seps 3 není vypovídající, neboť tato kritéria jsou přítomna u mnoha hospitalizovaných i u těch, u kterých se nikdy nerozvinula infekce. Pozornost byla zaměřena na příznaky orgánové dysfunkce. Ta je kvantifikována skórovacím systémem SOFA (Sequential Organ Failure Organ Assessment) – viz obrázek 3 na str. 14. Zvýšené skóre SOFA je totiž spjato s vyšší pravděpodobností úmrtí septického pacienta (Singer, 2016; Holub, 2018).

Sepsis-3, tedy nejnovější definice sepse, je popsána jako „život ohrožující orgánová dysfunkce vznikající na základě nepřiměřené odpovědi hostitele na infekci“ (Singer, 2016, s. 804). Definice sepse z hlediska klinických kritérií je stanovena jako zvýšení skóre SOFA o více než dva body za přítomnosti infekce. Na druhou stranu je nutno říci, že tento skórovací systém je využíván v intenzivní péči, avšak u nerizikových pacientů na běžných odděleních se parametry SOFA systému nestanovují. Proto pro rutinní klinickou praxi se jako vhodný jeví nový skórovací systém qSOFA (quick SOFA) pro zachycení rizikových septických pacientů, u nichž je předpoklad, že budou potřebovat intenzivní péči. Rizikový je tedy pacient, který má 2 příznaky ze tří následujících: vědomí (změny), dechová frekvence ($\geq 22/\text{min}$) a krevní tlak ($\leq 100 \text{ mm Hg}$). Srovnání definic sepse je doloženo na následujícím obrázku (Singer, 2016, Matějovič, 2017).



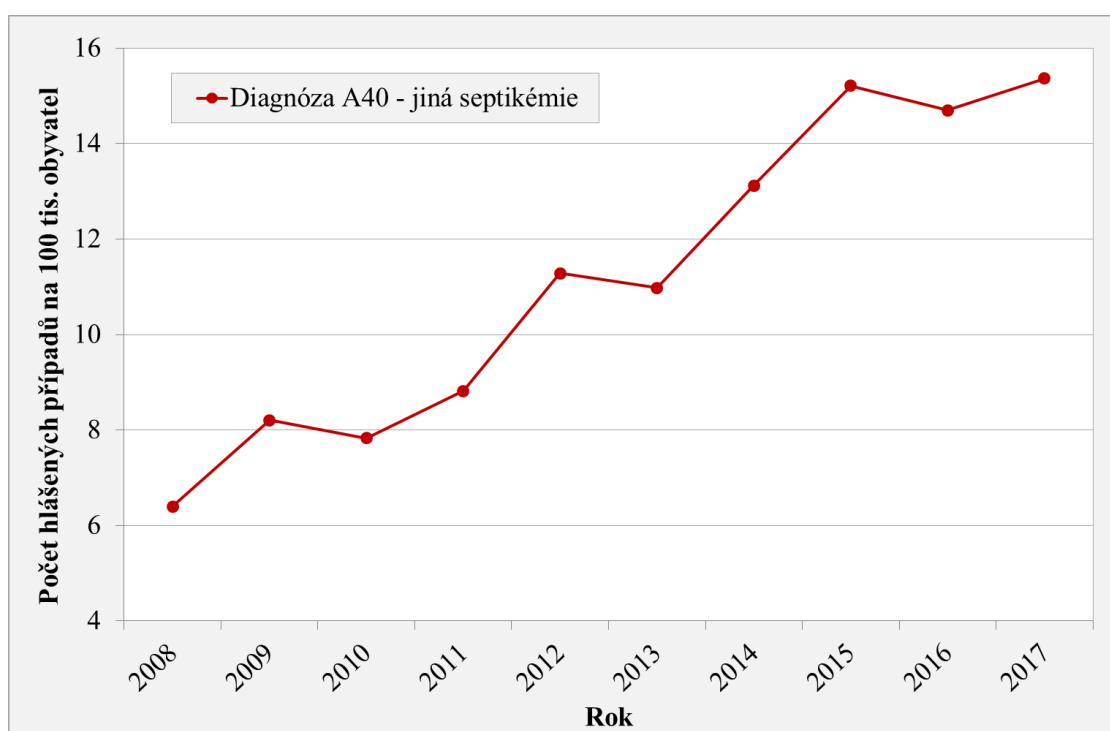
CRP – C-reaktivní protein; DM – diabetes mellitus; FiO_2 – inspirační koncentrace kyslíku; MAP – střední arteriální tlak; PaCO_2 – parciální tlak oxidu uhličitého v arteriální krvi; PaO_2 – parciální tlak kyslíku v arteriální krvi; SIRS – kritéria systémové zánětlivé odpovědi (systemic inflammatory response syndrome); SvO_2 – saturace smíšené žilní krve; STK – systolický krevní tlak

Obrázek 3: Srovnání původních definic a nové definice sepse

Zdroj: Matějovič, 2017

2. Sepse v rámci Česka

Sepse je velice závažný stav, který se řeší na národní i mezinárodní úrovni. O tom, že se jedná o stav, který si zaslouží pozornost, můžeme usuzovat v rámci Česka z počtu hlášených případů sepse uvedené ve statistice Státního zdravotního ústavu (dále jen SZÚ) s názvem EPIDAT = epidemiologická databáze (do roku 2017 včetně, nově od 1.1.2018 v Informačním systému infekčních nemocí – ISIN). Mezi lety 2008 až 2017 se počet případů s diagnózou A40 (= jiná septikémie) v rámci Česka zvýšil více než dvakrát z hodnoty 6,4 na hodnotu 15,4 případů na 100 000 obyvatel (viz následující obrázek).

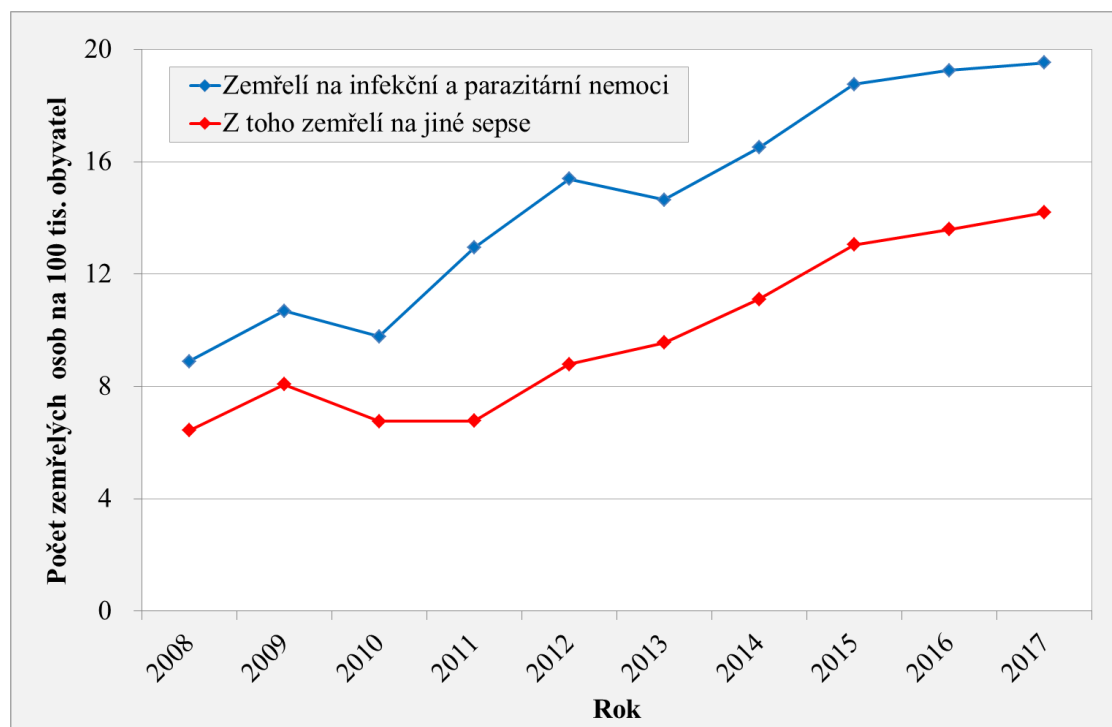


Obrázek 4: Počet hlášených případů s diagnózou jiná septikémie (A40) na 100 tis. obyvatel, Česko, roky 2008 – 2017

Zdroj: Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2008-2017 – absolutně, 2018; vlastní zpracování

Data o mortalitě, tedy počtu zemřelých na vybranou příčinu smrti přepočtený na 100 000 obyvatel, zpracovává i Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS). Podle této statistiky vzrostla mortalita infekčních a parazitárních onemocnění mezi lety 2008 -2017 v Česku z 8,9 na 19,9 osob na 100 000 obyvatel. Pokud by se pohlíželo přímo na kategorii příčin smrti jiná sepsa, tak u té byl také pozorován nárůst mortality, a

to z hodnoty 6,4 osob na 100 000 obyvatel v roce 2008 na hodnotu 14,2 v roce 2017. Výše zmíněné shrnuje obrázek 5.



Obrázek 5: Mortalita – infekční a parazitární onemocnění a jiná sepse, Česko, roky 2008 – 2017

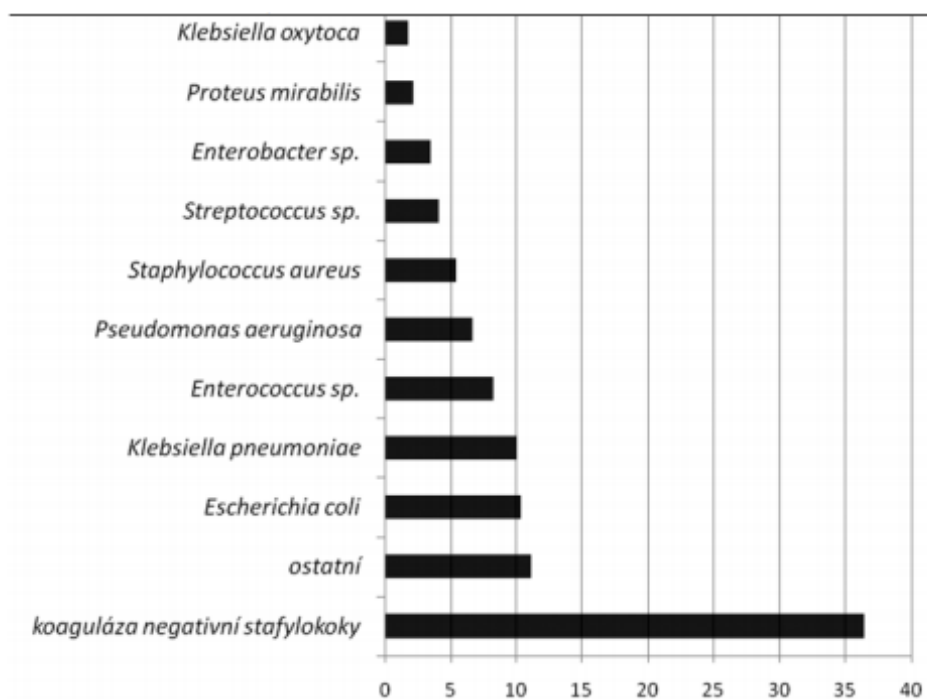
Zdroj: Zemřelí podle seznamu příčin smrti, pohlaví a věku v ČR, krajích a okresech, 2018; vlastní zpracování

Z dat Českého statistického úřadu o zemřelých dle příčin smrti v Česku lze také zjistit, že se mezi hlavními skupinami příčin úmrtí posunuly infekční nemoci z 9. místa v roce 2008 na 6. místo v roce 2017 v rámci relativních ukazatelů (rok 2008 0,9 % z celkového počtu zemřelých, rok 2017 1,7 %).

2.1 Původci sepse

V Česku bylo provedeno několik studií, které se zaměřovaly na původce sepsí (např. Vaniš et al., 2000; Kolář et al., 2002; Kolář et al., 2003; Kolář a Štrbová 2015). I když se lišily časovým a územním rozsahem, počtem vzorků či zaměřením na určitá oddělení, lze vysledovat, že nejčastěji zastoupené kmeny se opakovaly napříč studiemi. Čermák (2008) také upozorňuje, že výskyt bakteriálních patogenů je ovlivňován složením pacientů a odlišnostmi v jejich základních onemocněních.

Vaniš et al. (2000) se zabývali gramnegativními bakteriemi, které byly izolovány na jednotkách intenzivní péče (JIP) ve velkých nemocnicích v Česku. Nejčastěji se v hemokulturách vyskytovaly tři druhy gramnegativních bakterií, které tvořily 60 % ze všech zachycených patogenů. Jednalo se o *Klebsiella pneumoniae* (24 %), *Pseudomonas aeruginosa* (21 %) a *Escherichia coli* (15 %). Ostatní druhy byly zastoupeny méně než 10-ti %. K podobnému zjištění došel i Kolář et al. (2002), jehož studie byla také zaměřena na gramnegativní bakterie a byla provedena na 12-ti pracovištích Česka (stejně zastoupení malých a velkých nemocnic v rámci celého území Česka) v průběhu pěti měsíců roku 2001. Na předních místech všech sledovaných pracovišť byly tři výše zmíněné kmeny, jejichž celkový podíl tvořil 66 % ze všech gramnegativních bakterií. Zastoupení ostatních bakteriálních druhů se pohybovalo pod 7 %. Kolář a Štrbová (2015) v rámci studie zaměřené na vývoj rezistence invazivních bakterií v souvislosti se spotřebou antibiotik zjistili, že ve vzorcích ve sledovaném období 8 let (2007-2014) byly nejvíce zastoupeny (více jak 35 % ze všech bakteriálních druhů) koaguláza negativní stafylokoky (dále jen KNS) a dále překročily hranici 5 % *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus species*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* (také viz obrázek 6).



Obrázek 6: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů v hemokulturách

Zdroj: Kolář a Štrbová, 2015

Jedna ze studií se také týkala grampozitivních bakterií (Kolář et al., 2003). Probíhala v 15-ti zdravotnických zařízeních v Česku v období čtyř měsíců roku 2003, tak aby výběr reprezentoval českou populaci. Z celkového počtu 100 případů, kde byly jako původci IKŘ určeny grampozitivní bakterie, byl ve 39 % případů určen *Staphylococcus aureus*, ve 34 % případů koaguláza-negativní stafylokoky a na třetí a čtvrté pozici byli *Streptococcus pneumoniae* (11 %) a *Enterococcus species* (9 %). Přičemž nejvyšší podíl pozitivních hemokultur bez klinické souvislosti se stavem pacienta byl vyhodnocen u koaguláza negativních stafylokoků (Kolář et al., 2003; Čermák, 2008).

2.2 Nejčastější gramnegativní původci sepse

Kolář (2016) ve výčtu nejčastějších původců sepsí na prvních dvou místech uvádí zástupce gramnegativních tyčinek. Jako první jmenuje enterobakterie (= gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky - čeleď *Enterobacteriaceae*), hlavně kmeny *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Enterobacter sp.* Jako další v řadě zmiňuje nefermentující gramnegativní tyčinky (př. *Pseudomonas aeruginosa*). Následující text poskytne základní přehled o těchto bakteriích.

2.2.1 *Enterobacteriaceae*

Čeleď *Enterobacteriaceae* je klinicky důležitá a početná čeleď (cca 150 druhů). Tvoří ji gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky (dlouhé 2-3 μm a široké 0,5-0,8 μm), většinou pohyblivé - pomocí bičků (výjimkou je např. rod *Klebsiella*). Jsou běžně přítomné ve střevech obratlovců (komensalismus), ale mohou zde být za určitých podmínek i patogenem (př. snížená imunita hostitelského organismu). Mnohé z nich se v případě, že se dostanou mimo střevo, mohou také stát patogenem. Rostou na základních kultivačních půdách při teplotách 18 – 42°C, u lékařsky důležitých rodů je optimální teplotou 37°C. Lze je ale pěstovat i na speciálních půdách – př. Endův agar, na kterém nerostou grampozitivní bakterie a ty gramnegativní dělí na laktóza pozitivní (změna zbarvení agaru na tmavorůžovou, př. rody *Escherichia*, *Klebsiella*) a laktóza negativní (př. shigely). K jejich biochemickým vlastnostem patří to, že jsou většinou katalasa pozitivní a oxidasa negativní. Převažuje u nich fermentativní typ metabolismu (Bednář, 1996; Votava, 2003; Kopecká a Rotková, 2017).

Důležité je také poznamenat, že s enterobakteriemi je spojena tvorba širokospektrých betalaktamáz (ESBL = extended-spectrum beta lactamase). Jedná se o enzymy, které

mohou působit rezistenci k antibiotikům tím, že štěpí betalaktamový kruh antibiotika, čímž dojde k jeho deaktivaci. To se stává velkým problémem (Votava, 2003).

Rod *Escherichia*

Escherichia coli je nejznámějším zástupcem enterobakterií a také důležitým modelovým organismem. Je přirozenou součástí střevní mikroflóry zdravého člověka, mimo jiné se např. podílí i na tvorbě vitamínu K. Patogenní se stává hlavně, pokud se dostane mimo střevo (především v urogenitálním systému). Ve střevě se stává patogenní, pokud má specifické faktory virulence (př. vytváření toxinů). Je kultivovatelná na běžných půdách, na Endově agaru pak tvoří laktózapozitivní kolonie purpurové barvy s kovovým leskem. Patří mezi málo enterobakterií, které nejsou primárně rezistentní k ampicilinu. Naopak primární rezistenci vykazuje např. k přirozeným penicilinům či makrolidům (Votava, 2003; Beneš, 2018).

Rod *Klebsiella*

Klebsiella pneumoniae je nejznámějším a nejběžnějším druhem klebsiel. Je lépe adaptovaná na pobyt mimo střevo. Patří také mezi významné původce uroinfekcí. V rámci nemocničního prostředí pak často proniká z vnějšího prostředí do různých tělních dutin. Poměrně často je pak původcem i v případě sepsí či u infekcí dýchacích cest. Na krevním agaru může tvořit často mukózní, bíle pigmentované kolonie, což jí může odlišit od escherichií. Oproti *Escherichia coli* je primárně (přirozeně) rezistentní k ampicilinu (Votava, 2003; Beneš, 2018).

2.2.2 Gramnegativní nefermentující bakterie

Jedná se o nesourodou skupinu gramnegativních tyčinek, jejichž jedinou společnou vlastností je neschopnost fermentace glukózy. Z tohoto důvodu je i hodnocení společných morfologických i biochemických znaků obtížné. Nejčastěji však mají tvar relativně štíhlých, rovných či mírně zahnutých tyčinek. Rostou dobře na běžných půdách, mají rády dostatečnou vlhkost prostředí. Infekční proces vyvolávají hlavně u osob se sníženou imunitou. Řada těchto bakterií patří k původcům nozokomiálních (nemocničních) nákaz (př. pseudomonády), jež vykazují rezistenci k mnoha antibiotikům. Přenašeči mohou být zdravé osoby, které byly v silně kontaminovaném prostředí pseudomonádami kolonizovány (Votava, 2003).

Rod *Pseudomonas*

Klinicky nejvýznamnější je druh *Pseudomonas aeruginosa*. Jako místo častého výskytu této bakterie se udávají různé vody (i ty odpadní), střevo obratlovců či rostliny a půda. V nemocničním prostředí pak může kontaminovat např. katétrů, flexily apod. a může způsobit infekci jakéhokoliv orgánu či tělního systému. Její kolonie mají charakteristické vlastnosti – beta-hemolýza, kovový lesk, pigmentace a specifický zápach/vůni po jasmínu (u mladých kolonií). Je katalasa i oxidasa pozitivní. Struktury vázané na bakteriální buňku, stejně tak jako různé exolátky (př. cytotoxin) určují pak patogenitu bakterie. Terapie u infekcí způsobených pseudomonádami nebývá snadná. Jedná se o bakterii, která je vysoce schopná získat od jiných kmenů geny pro mnohočetnou rezistenci (Votava, 2003).

3. Antibiotika

Látky účinné proti bakteriím, antibakteriální látky, patří mezi antiefectiva (= léky účinné proti patogenním mikroorganismům). Je pro ně všeobecně vžitý název antibiotika, který bude také užíván v dalším textu. Mezi další antiefectiva patří ještě antimykotika – proti houbám, antivirotika – proti virům, antiprotozoika – proti prvokům a antihelminatika – proti červům. Antibiotika jsou využívány pro léčbu infekčních onemocnění či k jejich předcházení (profylaxe). Mohou být přírodního (mikrobiálního) původu nebo vyráběné chemicky, uměle (ty už jsou také nazývány antibiotiky, ačkoliv dříve se pro ně používal termín chemoterapeutika). Důležitým předpokladem k jejich použití je selektivní toxicita, což znamená, že látka působí proti mikrobům, ale zároveň nepoškozuje hostitelský organismus. Chemoterapeutický index pak udává poměr mezi dávkou toxickou pro hostitele a dávkou, která je účinná pro mikroba. U látek s nižší toxicitou pro hostitelský organismus je tento index vyšší a mohou se tedy použít i systémově a nejen lokálně (Bednář, 1996; Votava, 2005, Beneš, 2018).

Kromě dělení antibiotik na umělé a přírodní existují ještě další hlediska, dle kterých je možné je rozdělit. Jedním z těchto kritérií může být např. účinek antibiotik. Dle něho rozlišujeme látky baktericidní a bakteriostatické. První zmíněné přímo usmrccují mikrobiální buňku, jejich působení je rychlejší a nevratné, zatímco bakteriostatické látky zastavují růst a množení mikrobů (reverzibilně) a jejich klinický efekt se tedy projeví později. Oboje mohou zasahovat buňku několika různými způsoby. Mezi mechanismy jejich účinku tedy patří: inhibice syntézy buněčné stěny, inhibice syntézy nukleových kyselin, poškození buněčné membrány, inhibice proteosyntézy a skupina antimetabolitů, které se uplatňují v metabolismu pro mikroorganismus důležitých látek např. kyseliny listové. Dalšími kritérii dělení antibiotik mohou být např. rozsah účinku – antibiotika široko- a úzkospektrá nebo dělení dle chemické struktury, která odpovídá za společné vlastnosti antibiotik – př. mechanismus působení a rezistence (Bednář, 1996; Votava, 2005, Beneš, 2018).

Bližší informace k antibiotikům v rámci této práce je součástí kap. 3.2 Monitorování antibiotické rezistence – EARS-Net.

3.1 *Rezistence k antibiotikům*

Pojmem rezistence k antibiotikům se rozumí schopnost mikroorganismů odolávat působení těchto látek, což vede k selhání léčby. Neúčinnost antibiotik při léčbě infekčních onemocnění se stává stále větším problémem současné medicíny. Rezistence stoupá, a to hlavně tam, kde se antibiotika hojně používají, tedy v nemocnicích. Proto je důležitý neustálý dohled a monitoring situace týkající se této problematiky a to na lokální (nemocniční hygiena), národní (SZÚ) i mezinárodní úrovni (ECDC), kde se jedná o projekt EARS-Net (Votava, 2005; Beneš, 2009; Beneš, 2018).

3.1.1 *Primární a sekundární rezistence k antibiotikům*

Rezistenci mikrobů k antibiotikům dělíme na primární a sekundární. Primární (přirozená) rezistence se odvíjí od druhu mikroorganismu a jeho vlastností - stavby nebo metabolismu (př. rezistence klebsiel na ampicilin). Přirozenou rezistencí je myšleno to, že bakterie daného druhu či druhů jsou vždy rezistentní k danému antibiotiku. Vlastnosti přirozené rezistence lze využít např. při přípravě selektivních půd, do kterých přidáme antimikrobiální látku, která potlačí růst bakterií, jež nechceme kultivovat (př. čokoládový agar s bacitracinem je selektivní půda pro izolaci hemofilů, která potlačí růst ostatní flóry přítomné ve vzorku). Když však mikrob začne být odolný vůči antibiotiku, který ho původně zabíjel, hovoříme o sekundární čili získané rezistenci. Jedná se o důsledek genetických mutací a přenosů - přenos genů pro rezistenci pomocí plazmidů či transpozonů (Votava, 2005; Beneš, 2018).

Získaná rezistence může být zapříčiněna různými mechanismy. Bylo jich popsáno celkem sedm (viz tabulka 1), z nichž čtyři cílí proti molekulám antibiotika a tři souvisí s cílovými strukturami působení antibiotik (Beneš, 2018).

Tabulka 1: Mechanismy vzniku rezistence na antibiotika

MECHANISMY VZNIKU REZISTENCE NA ANTIBIOTIKA	
1.	Enzymatická inaktivace antibiotika
2.	Zábrana přístupu antibiotika k cílovému místu
3.	Aktivní transport antibiotika z bakteriální buňky
4.	Zábrana aktivace antibiotika
5.	Modifikace cílového místa
6.	Náhrada zablokované metabolické dráhy
7.	Vytvoření cílových míst v nadbytku

Zdroj: Beneš, 2018

3.1.2 *Nozokomiální nákazy*

S pojmem rezistence souvisí i téma nozokomiálních nákaz, neboť většina multirezistentních kmenů pochází právě z nemocničního prostředí. Vysoká spotřeba širokospektrých antibiotik stejně tak jako nedodržování hygienických zásad a pravidel přispívá k šíření těchto kmenů (Maďar et al., 2006).

Nozokomiální nákazy je tedy název, který je používán pro infekce spojené se zdravotní péčí. Konkrétně se jedná o infekci, která propukla v souvislosti se zdravotnickou aktivitou či pobytem ve zdravotnickém zařízení (Zadák a Havel, 2007).

Předpokladem pro to, aby infekce byla považována za nozokomiální, je to, že pacient si nepřinesl infekci z komunity („z venku“), tedy že při příjmu do zdravotnického zařízení nebyl v inkubační době dané infekce. V opačném případě jde o infekci, nákazu komunitní. Často se také vyskytují případy, kdy byl pacient přeložen z jednoho zdravotnického zařízení do jiného a infekce se u něj projevila až v druhém zdravotnickém zařízení. I tak jde o nozokomiální nákazu, ale z prvního zdravotnického zařízení. Nozokomiální nákaza se také může projevit až po nějakém čase po propuštění pacienta domů, a to i v řádech měsíců (Maďar et al., 2006).

Původ nozokomiálních nákaz může být endogenní nebo exogenní. Pokud nákaza vznikne z mikroorganismu, který je běžně přítomný uvnitř těla, jedná se o endogenní nákazu. K takové nákaze většinou dojde, když je organismus oslabený. Původcem se pak může stát oportunní mikroorganismus. U exogenní nákazy je původcem mikroorganismus z vnějšího prostředí, kdy nebyla dodržena všechna hygienicko-epidemiologická pravidla a došlo k nákaze pacienta (Maďar et al., 2006).

V současné době jsou velkým problémem infekce způsobené multirezistentními organismy včetně producentů širokospektrých betalaktamáz (= ESBL = extended-spectrum β -laktamases), které vykazují rezistenci k jedné nebo více skupinám antibiotik. U hospitalizovaných pacientů je více rizikových faktorů ke vzniku a přenosu rezistence než u těch z komunity (př. snížená imunitní odolnost, závažnější onemocnění než u pacientů z komunity, invazivní zákroky, častější používání antibiotik, nedostatečná úroveň bariérových opatření atd.). Možnosti léčby infekcí způsobených těmito organismy bývají velice obtížné, a proto je nutné dbát na veškerá preventivní opatření a epidemiologické zásady (Sas, 2010).

3.2 Monitorování antibiotické rezistence – EARS-Net

EARS-Net znamená European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. Jedná se o dlouhodobý projekt na evropské úrovni, který si klade za cíl shromažďovat a analyzovat údaje o rezistenci mikroorganismů k antibiotikům, aby bylo možné rychle reagovat na případnou nově objevenou antibiotickou rezistenci v rámci Evropy. Vznikl na podnět Evropské komise v roce 1998 pod názvem EARSS (=The European Antimicrobial Resistance Surveillance System) a přejmenován na EARS-Net byl v roce 2010, kdy byla zároveň změněna jeho koordinace z holandského Národního institutu veřejného zdraví a životního prostředí (National Institute of Public Health and Environment) na koordinaci mezinárodní zastoupenou Evropským centrem pro prevenci a kontrolu infekčních onemocnění (ECDC). V době svého založení byly jeho členy všechny státy EU plus Norsko a Irsko. Česko se k těmto aktivitám přidalo v roce 2000, kdy bylo zapojeno celkem 33 mikrobiologických pracovišť. Koordinaci v Česku zajišťuje Státní zdravotní ústav konkrétně Národní referenční laboratoř pro antibiotika (Urbášková, 2008; European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

3.2.1 Sběr dat v rámci EARS-Net

V rámci projektu EARS-net je vyšetřována antibiotická rezistence, resp. citlivost u nejčastějších původců invazivních infekcí vyskytujících se v komunitě i nemocnicích ve státech EU, Norska a Irska. Na začátku byla v Česku sledována data pro *Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*. V současné době se sbírají a analyzují data celkem osmi patogenů. Kromě dvou výše zmíněných jsou to ještě: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. Izoláty bakterií pocházejí z krve, a některé pak z mozkomíšního moku (gramnegativní tyčinky a *Streptococcus pneumoniae*). U zúčastněných subjektů se navíc předpokládá, že budou řádně provádět vnitřní kontrolu kvality a účastnit se Externích hodnocení kvality (EHK), která se konají jednou za čtvrt roku a pořádá je SZÚ (Urbášková, 2014; European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

3.2.2 Metody stanovení citlivostí k antibiotikům

Výsledek citlivosti k antibiotikům se má za účasti laboratoře v projektu udávat kvantitativně. Toho lze dosáhnout kvantitativním vyjádřením minimální inhibiční

koncentrace antibiotika (zkratka MIC, udává se v mg/l, = nejnižší možná koncentrace antibiotika, která je ještě schopna potlačit růst kmene) v případě dilučních metod, E-testu či užití systému VITEK® 2. Běžně je ale používána i disková difúzní metoda stanovení citlivosti k antibiotikům, kdy se měří inhibiční zóny (Urbášková, 2014).

Disková difúzní metoda

Postup při použití diskové difúzní metody ke stanovení citlivosti k antibiotikům začíná tím, že se sterilní kličkou odebere čistá/é kolonie dané kultury narostlé na agaru a rozmíchá/jí se ve fyziologickém roztoku. Je potřeba dosáhnout zákalu s hodnotou 0,5 na McFarlandově zákalové stupnici. Vzniklá suspenze musí být pak rozetřena na plotny s Müller-Hinton agarem (dále jen MH agarem), popřípadě MH agarem s koňskou krví, jehož výška je standardizovaná na 4 mm (při průměru plotny 90 mm). Následuje naražení příslušných antibiotických disků (napuštěných antibiotikem v určité koncentraci), a pak inkubace podle druhu mikroorganismu (teplota 35 – 37 °C, zvýšená/normální koncentrace CO₂). Za 16-20 hodin se hodnotí průměry inhibičních zón vytvořených kolem antibiotických disků. K měření průměrů těchto inhibičních zón je doporučován hlavně systém tzv. breakpointů EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, viz níže). Hodnoty průměrů inhibičních zón lze považovat za srovnatelné s hodnotami MIC koncentrací, pokud se dodrží všechny podmínky této metody (Votava, 2010; EUCAST, 2019).

Jak bylo uvedeno výše, znamená zkratka EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Jedná se o stálý výbor organizovaný ESCMID (The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases = Evropská společnost klinické mikrobiologie a infekčních onemocnění), ECDC a European national breakpoint committees (Evropské národní výbory pro breakpointy), který byl založen v roce 1997. Zabývá se mimo jiné i určením tzv. breakpointů inhibičních zón růstu jednotlivých patogenů k antibiotikům, tedy určením hranic těchto zón, které pak mohou být používány v klinické praxi v rámci jednotlivých mikrobiologických pracovišť. Užívání společných postupů přispívá ke sladění a srovnatelnosti dat na mezinárodní úrovni, čehož je využíváno v projektu EARS-Net. V roce 2016 tento systém využívalo asi 88 % laboratoří zapojených v EARS-Net. Sledovaly citlivost patogenů (uvedených v podkapitole 3.2.1) ke stanoveným antibiotikům (pro léčbu invazivní infekce) – viz příloha 1. Mohla ale být sledována i další antibiotika. Dále

EUCAST např. doporučuje i postupy laboratorních prací spojených se zjišťováním citlivostí na antibiotika a definuje také breakpointy pro nové agens (Urbášková, 2014; Brown et al., 2015; European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

Kvantitativní - diluční metody

Ke stanovení MIC, tedy nejnižší možné koncentraci antibiotika, která je ještě schopná inhibovat růst mikroorganismu, lze využít diluční metody. Využívanými médii pro provedení jsou v tomto případě agarové půdy či tekuté půdy - bujóny, která už obsahují daná antibiotika se stoupající koncentrací (jednotlivé koncentrace se získají ředěním ((z)ředění = diluce) ze základního roztoku antibiotika). Po naočkování média s antibiotikem mikrobiální suspenzí podle zákalového standardu se vzorky inkubují. Výsledky se ověřují systémem kontrol. Využívanými kvantitativními metodami jsou (mikro)diluční metoda, agarová diluční metoda a e-test (Bursová et al., 2014).

V případě diluční metody je citlivost k antibiotikům zjišťována pomocí mikrotitrační destičky, kde jsou jednotlivé jamky naplněné bujónem se stoupající koncentrací antibiotika. Do jamky se pomocí jehly očkuje bakteriální suspenze a následně se destička inkubuje. Poté se hodnotí růst ve srovnání s kontrolní jamkou (vizuálně či změřením absorbance v jednotlivých jamkách). MIC je v první jamce, kde se nevytvořil zákal (Bednář, 1996; Votava, 2005; Bursová et al., 2014).

Agarová diluční metoda spočívá ve vylití agaru spolu s různou koncentrací antibiotika. Na tyto agary se naočkuje kmen a plotny se inkubují. Poté se odečítá růst kmene ve formě kolonie. MIC antibiotika je na té plotně, kde již není viditelný růst kmene. Jedná se o referenční metodu (vysoká standardizovanost provedení), která je však velmi pracná (Bednář, 1996; Bursová et al., 2014).

Poslední kvantitativní metoda „E-test“ je reagenční proužek nasycený antibiotikem, jehož koncentrace postupně stoupá. Jednotlivé koncentrace (kalibrovaná stupnice) jsou vyznačeny na proužku. Proužek se položí na inokulovanou plotnu (inokulace provedená shodně jako při diskové difúzní metodě). Zjištěná inhibiční zóna připomíná tvarem kapku. MIC zjistíme tak, že přečteme koncentraci uvedenou na proužku tam, kde špička inhibiční zóny protíná proužek (Votava, 2005).

Systém VITEK® 2

Moderní automatizované stanovení MIC je možné provádět pomocí systému VITEK® 2, což poskytuje výraznou časovou úsporu při získávání výsledků. Kromě určení citlivosti daného kmene k různým antibiotikům, umožňuje tento systém také jejich identifikaci. Základem jsou karty s malými jamkami, které jsou plněny buď biochemickými testy (v případě ID karet) či různými koncentracemi antibiotik (v případě AST karet = antimicrobial susceptibility testing card). Tyto karty jsou naplněny suspenzí mikroorganismu a inkubovány, přičemž přístroj každou hodinu spektrofotometricky vyhodnocuje změnu barev příp. tvorbu zákalu v jamkách destičky. Výsledek je vyjádřen jako MIC (Bursová et al., 2014).



Obrázek 7: Vitek 2 Compact

Zdroj: vlastní foto

3.2.3 *Vybrané antibiotické přípravky sledované v EARS-Net*

Účastí v projektu EARS-Net se mimo jiné zainteresované laboratoře zavazují, že budou povinně vyšetřovat citlivost k antibiotikům volby pro léčbu invazivní infekce. Kromě nich je doporučeno sledovat ještě další antibiotika, která mají strategický význam či slouží jako indikátorová (Urbášková, 2014).

Jelikož se práce zaměřuje na gramnegativní tyčinky, budou v následujícím textu představeny antibiotické přípravky povinně sledované v EARS-Net týkající se právě gramnegativních bakterií. Mezi ně patří: ampicilin, cefotaxim, ceftazidim, ciprofloxacin a gentamicin.

Ampicilin

Ampicilin patří mezi beta-laktamová antibiotika, pro jejichž strukturu je typický tzv. betalaktamový kruh, který je tvořen ze tří atomů uhlíku a jednoho atomu dusíku. Je součástí podskupiny beta-laktamových antibiotik s názvem peniciliny, resp. variantou penicilinů - aminopeniciliny. Aminopeniciliny se od penicilinů liší připojením aminoskupiny do postranního řetězce benzylpenicilinu, což pomohlo rozšířit spektrum jejich účinku hlavně o gramnegativní bakterie (ne ale pseudomonády). Proto se jim také někdy říká širokospektré peniciliny. Podstata jejich fungování, stejně jako u jiných beta-laktamových antibiotik, spočívá ve vazbě na enzymy (DD-peptidázy) v bakteriální buňce, které pomáhají tvořit základ buněčné stěny – peptidoglykan (označují se jako PBP = penicillin-binding-proteins = proteiny vázající penicilin) a tím dojde k jejich inaktivaci. Brání syntéze peptidoglykanu a má tedy baktericidní účinek. Osvědčil se např. při léčbě infekční endokarditidy, pneumonie, novorozeneckých sepsí a dalších infekcí. Špatně se vstřebává z gastrointestinálního traktu (dále jen GIT), proto je výhodnější ho používat pro parenterální léčbu (Votava, 2005; Beneš, 2018).

Cefotaxim

Cefotaxim patří také do skupiny beta-laktamových antibiotik, avšak do podskupiny cefalosporiny, resp. cefalosporiny třetí generace. Jsou to baktericidní antibiotika, která jsou používána pro léčbu těžkých infekcí včetně sepsí. Jeho odlišnost spočívá v tom, že asi z 30 % podaného cefotaximu se v játrech stává desacetyl-cefotaxim, jež je také antibioticky účinný, a to zejména v součinnosti se samotným cefotaximem (účinnost hlavně proti enterobakteriím a anaerobům). Nevstřebává se z GIT, užívá se parenterálně. Používá se např. v léčbě sepsí, septického šoku, meningitid bakteriálního původu či infekcí ledvin a dalších (Beneš, 2018).

Ceftazidim

Stejně jako cefotaxim patří do skupiny cefalosporinů 3. generace, tedy k beta-laktamovým antibiotikům. Ceftazidim byl vytvořen hlavně pro silné působení na *Pseudomonas aeruginosa* a jeho účinek na grampozitivní bakterie je slabý (s výjimkou betahemolytických streptokoků). Je to záložní antibiotikum na pseudomonádové infekce. Bohužel není, stejně jako ostatní cefalosporiny 3. generace, odolný vůči

širokospektrým betalaktamázám. Osvědčil se ale např. v léčbě gramnegativních sepsí, hnisavých meningitid, infekcí ledvin a močových cest a dalších (Beneš, 2018).

Ciprofloxacin

Jedná se o nejznámější antibiotikum ze skupiny fluorochinolonů, jež se užívá k léčbě různých gramnegativních infekcí. Fluorochinolony byly syntetizovány chemicky, uměle. Jejich základem jsou dva kondenzované aromatické kruhy. Nevratně se vážou na aktivní podjednotku enzymů – topoizomeráz (na dva ze čtyř druhů – topoizomeráza II, též gyráza a topoizomeráza IV), které jsou potřebné pro replikaci, transkripci, opravu a rekombinaci DNA, a inhibují tak jejich činnost. Ciprofloxacin má výbornou distribuci do tkání a je stále nejúčinnějším chinolonem proti *Pseudomonas aeruginosa* a zároveň jediným proti pseudomonádě, který lze užívat orálně (Votava, 2005; Beneš, 2018).

Gentamicin

Gentamicin je součástí skupiny antibiotik s názvem aminoglykosidy. Jejich molekuly obsahují aminocyklitolový kruh, k němuž jsou glykosidickou vazbou navázány další dva aminocukry. Podstatou jejich působení je inhibice proteosyntézy (už na samém počátku), a to tím, že pronikají na ribozom, kde brání vzniku iniciačních komplexů, z nichž postupuje syntéza bílkovin. Jejich dalším účinkem je pak narušení buněčné stěny bakterií. Jejich účinek je tedy baktericidní. Působí zejména na gramnegativní anaerobně rostoucí tyčinky, z gram pozitivních pak např. na stafylokoky. Gentamicin je indikován v léčbě sepsí nebo u závažných infekcí v dobře prokrvených tkáních (v případech endokarditid apod.). Jeho nevýhoda však spočívá v tom, že obsahuje několik zranitelných míst, která mohou bakterie inaktivovat pomocí působení různých exoenzymů, což vede k tomu, že mnoho nosokomiálních kmenů je ke gentamicinu již rezistentních (Votava, 2005; Beneš, 2018).

4. Vyšetřování hemokultur

Laboratorní vyšetření zahrnuje tři fáze (preanalytická, analytická a postanalytická). Správnost provedení vyšetření z hlediska všech těchto fází je řešena na národní úrovni Společností pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP (dále jen SLM ČLS JEP). Ta vydává Národní standardní vyšetřovací postupy (NSVP), a to i pro případ hemokultur. Každá laboratoř má pak mít vypracovány vlastní laboratorní příručku a standardní operační postupy („SOP“), kde je možnost zjistit vše, co se týká jednotlivých vyšetření. Znalost správných postupů a jejich aplikace v praxi by pak měla být zárukou správně provedeného vyšetření.

4.1 Příprava pacienta a odběr krve

Zásadní význam a vliv na vyšetření a výsledek má odběr materiálu. Špatné provedení odběru může celý proces znehodnotit (kontaminace vzorku). Samozřejmostí by měla být příprava pacienta, čímž je myšleno především informování o postupu odběru a udělení jeho souhlasu, pokud to jeho stav dovoluje. Krev by měla být odebrána před podáním antibiotik z periferní žíly po dezinfekci, která se nechá zaschnout. Kvůli kontrole sterility místa vpichu se po zaschnutí dezinfekce provádí stěr z kůže. Odběr je též možný z žilního vstupu u předpokládané katérové infekce (Scharfen, 2013).

Co se týče správného načasování odběru, mnohde je uváděna jako správná doba odběru při vzestupu teploty či třesavce, tedy když je pravděpodobné, že se v krvi nachází bakterie (Votava 2010, Scharfen 2013). Čermák (2008) uvádí dva hlavní způsoby vyplavování bakterií z ložiska infekce do krevního oběhu, a to sice kontinuální a intermitentní vyplavování. U prvního zmíněného je v krvi neustále přítomna určitá hladina bakterií a je tedy vysoce pravděpodobné, že bakterie budou zachyceny ve všech odběrech. Bakteriémie je kontinuální např. u infekční endokarditidy, kdy není nutné čekat s odběrem na vzestup teploty. Naproti tomu u intermitentního vyplavování jde o to, že bakterie jsou v krevním oběhu v určitých intervalech střídaných různě dlouhým klidovým obdobím. V tomto případě je tedy lepší vyčkat s odběrem na vzestup teploty, resp. na první klinické příznaky vyplavení bakterií do krve (Čermák, 2008).

4.1.1 Objem krve a počet lahviček k hemokultivaci

Důležité je nejen to, jak a kdy byl odběr proveden, ale záleží i na objemu odebrané krve a počtu lahviček. Za adekvátní objem krve pro hemokultivaci je u dospělého považováno 10-20 ml krve na jednu lahvičku a u dítěte do 5 ml (dle věku), což je hlavně dané hodnotami uváděnými výrobcem kultivačních médií.

Lamy et al. (2016, str. 3) shrnuje dostupná data o objemu odebrané krve k hemokultivaci větou: „*Čím větší objem krve je kultivován, tím větší je výtěžek*“. Dále uvádí, že většina vědeckých společností doporučuje v pokynech o počtu odebraných lahviček odebírat 2-3 sety, tedy 4-6 lahviček (př. The French Society of Microbiology – 2-3 sety). Stejný počet doporučuje i SLM ČLS JEP, pod jejíž záštitou jsou zpracovány NSVP. Setem (= hemokulturou) jsou myšleny lahvička pro aerobní a anaerobní kultivaci.

Scharfen (2013) uvádí, že odběr druhého a třetího setu hemokultur zvyšuje výtěžnost, a také snazší interpretaci v případě kontaminace. Zároveň se zmiňuje o rozdílu v načasování v případě intermitentní a kontinuální bakteriémie (u infekčních endokarditid). V druhém případě je načasování méně důležité, u prvního udává význam alespoň dvou odběrů při horečce a třesavce v rozmezí 30 – 60 minut pro vyšší pravděpodobnost záchytu.

Procedura odběru pak musí zahrnovat i správné označení vzorku – lahvička musí být polepena identifikačním štítkem se jménem, rodným číslem pacienta a oddělením, které vyšetření požaduje. Ke vzorku je přiložena žádanka, kde by kromě výše uvedeného měla být zaznamenána i diagnóza pacienta, požadované vyšetření, datum a čas odběru a klinické údaje – např. informace o léčbě antibiotiky (Scharfen, 2013).

4.2 Transport a skladování materiálu

Za neoptimálnější transport je považován ten, kdy je materiál okamžitě po odběru doručen ke zpracování do příslušné laboratoře. V praxi to samozřejmě není vždy možné. Záleží na podmínkách (personálních i technických) a také na pracovní době dané laboratoře (odběry hemokultur pozdě odpoledne či v noci). V takovém případě by do doby předání vzorku laboratoři neměly v žádném případě být hemokultury skladovány v lednici, ale jen při pokojové teplotě (Scharfen, 2013).

4.3 Zpracování v laboratoři

Před přijetím vzorku ke zpracování musí laboratoř zkontrolovat správnost a úplnost údajů na žádance a také označení materiálu správnými identifikačními údaji pacienta. Žádanka je pak zapsána do laboratorního informačního systému (dále jen LIS).

4.3.1 Kultivace

V současné době se k hemokultivaci používají různé automatické systémy – např. BacT/Alert, Bactec, VersaTREK. V přístroji se lahvička inkubuje většinou při 37°C a to 5-7 dní. Princip detekce mikroorganismu se liší dle výrobce systému. Např. u BacT/Alert systému je princip detekce mikroorganismu založen na faktu, že každá metabolická aktivita bakterií produkuje CO₂. V lahvičce je kromě krve, která tam byla přidána, ještě sterilní kultivační médium a kolorimetrický senzor, který právě barevně reaguje na změny pH způsobené CO₂. Přístroj pak v pravidelných intervalech měří tyto kolorimetrické sensory a vyhodnocuje změny (Opota et al., 2015).

Systém Bactec zase využívá fluorescenční detekci. Na rozdíl od kolorimetrického senzoru užívaného v systému BacT/Alert, senzor u Bactec systému pracuje na fluorescenčním principu. Tzn., že vzniklý CO₂ ovlivňuje schopnost fluorescence tohoto senzoru. Zvýšení CO₂ v senzoru totiž snižuje pH, čímž poklesne i fluorescence (Čermák, 2008).

Přístroj VersaTREK zase v pravidelných intervalech měří tlak nad hladinou vzorku a dle změn tlaku vyhodnocuje negativitu/pozitivitu vzorků (TREK Diagnostic Systém, 2013).

4.3.2 Negativní vzorek

V případě, že nedojde ke změně barvy senzoru lahvičky, tedy, že v lahvičce není přítomna aktivita mikroorganismů vedoucí k produkci CO₂, vyhodnotí přístroj po 5-7 dnech vzorek jako negativní.

4.3.3 Pozitivní vzorek

Pokud je vzorek přístrojem vyhodnocen jako pozitivní, lahvička je vyjmuta a zaznamenána se čas pozitivity. Doba, kterou lahvička strávila v přístroji je důležitá, neboť s její délkou roste pravděpodobnost, že se jedná o kontaminaci. Pak se zhotoví

mikroskopický preparát obarvený dle Grama a zároveň se vzorek vyočkuje na krevní a Endův agar, případně na další půdy, aby se získala čistá kultura. Podle výsledku odečtení preparátu, kdy jde hlavně o rozlišení gramnegativních a grampozitivních bakterií, se pak ze vzorku vyhotoví přímá disková citlivost, která slouží jen jako orientační a později je provedena nejlépe kvantitativní citlivost z čisté kultury. Klinicky významný nález se po odečtení preparátu telefonicky oznamuje na oddělení ošetřujícímu lékaři (Votava, 2010; Scharfen, 2013; Opota, 2015).

Z kultury získané vyočkováním na agar je pak možno provést identifikaci původce pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry) či systému VITEK (VITEK zároveň stanoví i kvantitativní citlivost), který je založen na biochemickém testování. (Scharfen, 2013; Bursová et al., 2014).

Normální doba pro získání čisté kultury je 12-24 hodin. Identifikace systémem MALDI-TOF MS byla však testována a je běžně pro svou rychlost používána i na subkulturách vyrostlých na agaru po méně než 6 hodinách. Idelevich et al. (2014) udává, že identifikace pomocí MALDI-TOF MS ze subkultur narostlých po méně než 6 hodinách byla úspěšná z 97,6 % v případě gramnegativních aerobních tyček a z 64 % u grampozitivních koků. Pokud je tedy k identifikaci použit rychlejší postup kombinující subkulturu a MALDI-TOF MS dosáhne se významných úspor času v rámci laboratorních prací, což je důležité pro pacienta a jeho léčbu.

4.3.4 Kontaminace

Většina kontaminací vzniká při odběru krve, tedy v preanalytické fázi. Kontaminací často bývají druhy, které jsou běžně přítomné na kůži (př. koaguláza negativní stafylokoky). Proto se také provádí stěr z kůže před odběrem hemokultury. Ten může pomoci s potvrzením či vyvrácením kontaminace vzorku podle toho, zda obsahoval nebo neobsahoval stejné bakterie, jako byly vykultivovány ze vzorku krve v lahvičce (Čermák, 2008).

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5. Cíle práce a hypotézy

Jako cíle této práce byly stanoveny:

Cíl 1) Zhodnotit data o hemokulturách z interních oddělení Nemocnice Tábor, a.s. zpracovaných na oddělení mikrobiologie v období 01/2018 – 12/2018 (spektrum gramnegativních patogenů, rozdíly mezi komunitními a hospitalizovanými pacienty).

Cíl 2) Zaměřit se na gramnegativní tyčky, vyhodnotit jejich citlivosti na antibiotika a porovnat je s daty z EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network).

Práce se věnuje následujícím hypotézám vztahující se k výše uvedeným cílům:

Ad cíl 1) Nejčastěji zjištěné gramnegativní patogeny z hemokultur jsou v Nemocnici Tábor, a.s. stejné jako jsou ty uváděné v odborné literatuře.

Ad cíl 1) Spektrum gramnegativních patogenů zjištěných v hemokulturách od komunitních pacientů a v hemokulturách od hospitalizovaných pacientů se liší.

Ad cíl 2) Citlivosti zjištěných gramnegativních tyček nevykazují významné rozdíly oproti datům z EARS-Net.

6. Metodika

Data pro tuto práci byla získána na pracovišti mikrobiologie Nemocnice Tábor, a.s. (dále jen NT, a.s.), kde bylo možné si také zažít postupy příjmu a zpracování hemokultur včetně vyšetřování pozitivních vzorků a následného vydání výsledků.

6.1 Zpracování hemokultur v mikrobiologické laboratoři Nemocnice Tábor, a.s.

6.1.1 Preanalytická fáze

Vzorky k mikrobiologickému vyšetření včetně hemokultur jsou v táborské nemocnici nepřetržitě přijímány na sběrném místě na Stanici klinické biochemie a hematologie, odkud jsou pak několikrát denně dopravovány na mikrobiologické pracoviště. Během provozní doby Stanice lékařské mikrobiologie (dále jen SLM) lze materiál transportovat přímo na toto pracoviště.

V rámci preanalytické fáze je u dodaného materiálu, v tomto případě hemokultur, zkontrolována správnost údajů týkajících se pacienta a zadavatele vyšetření na lahvičce a žadance, vzorek se zaeviduje do LIS a označí se číslem přiděleným v LIS a datem příjmu vzorku.

6.1.2 Analytická a postanalytická fáze

Kultivace hemokultur

Kultivace odebraných hemokultur je na SLM NT, a.s. prováděna pomocí přístroje BacT/Alert od společnosti bioMerieux (viz obrázek 8 na následující straně). Krev k hemokultivaci je tedy odebírána do příslušných lahviček: zelená = aerobní, oranžová = anaerobní, žlutá = pediatrická pro kultivace krve dítěte (na obrázku chybí), které obsahují médium s adsorbčními polymerovými kuličkami. BacT/Alert kontroluje kolorimetrický senzor inkubovaných lahviček a vyhodnocuje, zda uvnitř nedochází k růstu bakterií (viz princip uvedený v podkapitole 4.3.1). Pozitivní lahvičku oznámí zvukovým a vizuálním signálem. Lahvička je vyjmuta a zapsána jako pozitivní do LIS. Negativní lahvičku oznámí pouze vizuálně na obrazovce a taktéž je po vyjmutí zapsána do LIS jako negativní a dojde k odeslání výsledku.



Obrázek 8: Systém ke kultivaci hemokultur BacT/Alert a kultivační lahvičky

Zdroj: vlastní foto

Identifikace bakterií a stanovení citlivosti

Z krve v pozitivní lahvičce je pak vyhotoven mikroskopický preparát obarvený Gramem a dále se krev z lahvičky vyočkuje na krevní agar, Endův agar a Schaedlerův agar a uloží se do inkubátoru se zvýšenou tenzí CO₂ (mikroaerofilní prostředí) s nastavenou teplotou 37 °C. Preparát následně odečte lékař a morfologie přítomných bakterií je hlášena na oddělení, kde byl materiál odebrán.

Zároveň s vyhotovením preparátu se také připravuje orientační citlivost, která je v provozu mikrobiologie NT, a.s. standardně stanovována pomocí diskové difúzní metody a zóny inhibice jsou měřeny s využitím breakpointů dle EUCAST, což umožňuje srovnávat s daty z EARS-Net.

Půdy se zkontrolují nejdříve po zhruba 4-6-ti hodinách, a hned jak je na nich patrný nárůst, identifikuje se pomocí MALDI-TOF a připravuje se citlivost z čisté kultury.

Vydání výsledků

Běžně probíhá komunikace s objednatelem vyšetření již v průběhu analytické fáze – hlášení morfologie bakterií. Po ukončení vyšetření je pak výsledek autorizován a

validován lékařem, je vytištěn a odeslán objednateli a zpřístupněný je též v elektronické formě.

6.2 *Statistická data - sběr a zpracování*

V práci byla využita data získaná na pracovišti mikrobiologie NT, a.s. v časovém horizontu jednoho roku, konkrétně roku 2018. Sbírána byla data týkající se kmenů získaných z pozitivních hemokultivačních lahvíček z interních oddělení a ambulancí (kardiologické, gastroenterologické), přičemž zvláštní pozornost byla věnována hemokultivačním lahvíčkám, kde zjištěným původcem byla gramnegativní tyčinka.

Data byla napřed upravena, neboť někteří pacienti byli v průběhu sledovaného roku 2018 hospitalizováni vícekrát a to i v rámci různých interních oddělení. Pokud měli v průběhu vícečetných hospitalizací pozitivní vzorky hemokultivace a nebyl zjištěn stejný kmen, byl tento taktéž zahrnut do analýzy týkající se patogenů. V opačném případě byl zařazen pouze první kmen od daného pacienta. Pacient jako takový byl však zahrnut pouze jednou (pro analýzu věkové struktury a pohlaví).

Kromě struktury vyšetřovaného souboru pacientů dle věku a pohlaví včetně jeho příslušnosti k oddělení byla snaha zhodnotit rozdíly mezi kmeny zjištěnými z pozitivních hemokultivačních lahvíček od komunitních a hospitalizovaných pacientů. Proto byla sledována i doba přijetí pacienta do nemocnice a doba odběru hemokultury. Pokud k odebrání hemokultur došlo do 48 hodin po přijetí do nemocnice a hemokultivace byla pozitivní, byl kmen izolovaný z dané lahvíčky zařazen do skupiny komunitní. Pokud však došlo k odběru až po více jak 48 hodinách, spadl do skupiny hospitalizovaní. Někteří autoři (např. Mađar et al., 2006; Bartůnek et al., 2016) zmiňují možnost vzniku nozokomiální nákazy i po propuštění z nemocničního zařízení domů, a to i v řádu několika měsíců. Proto byly do skupiny kmenů od hospitalizovaných pacientů zahrnuty i ty, které byly sice zjištěny z odebraných hemokultur do 48 hodin po přijetí pacienta do nemocnice, ale zároveň bylo zjištěno, že pacient byl v posledních třech měsících hospitalizován v táborské nemocnici. Bohužel možnost předchozí hospitalizace v jiných zdravotnických zařízeních nebyla brána v potaz, neboť tato data nebylo možné u všech sledovaných pacientů spolehlivě zjistit. Byl tedy vytvořen přehled vykultivovaných kmenů zjištěných z pozitivních vzorků vyšetřovaného souboru, kdy detailněji se pozornost zaměřila na již zmíněné gramnegativní tyčinky.

Byla zjišťována také míra rezistence kmenů gramnegativních tyčinek k jednotlivým vyšetřovaným antibiotikům (k těm, sledovaným v EARS-Net – ampicilin, cefotaxim, ceftazidim, gentamicin, ciprofloxacín), a to u dvou nejčastějších bakteriálních druhů izolovaných z pozitivních hemokultivačních lahvíček. Jednalo se o výpočet podílu rezistence jednotlivých kmenů daného druhu k celkovému počtu zjištěných kmenů tohoto druhu.

Dále byla převzata data z databáze EARS-Net, která jsou uvedena na stránkách SZÚ. Jedná se o data ze zainteresovaných zdravotnických zařízení, konkrétně z jejich interních oddělení, za celé Česko. Bohužel ale v době zpracování této práce nebyla dostupná data za rok 2018, ke srovnání jsem tedy použila data z roku předešlého 2017 s vědomím, že závěry srovnání budou mít pouze orientační charakter.

Všechna data byla pomocí filtrů a kontingenčních tabulek zpracována v MS Excel do konečné podoby grafů a tabulek představených v této práci.

7. Výsledky

V následujících podkapitolách budou představeny výsledky analýzy získaných dat o pozitivních hemokultivačních lahvičkách a kmenech z nich určených s důrazem na gramnegativní tyčinky včetně přehledu o jejich rezistenci k antibiotikům.

7.1 Statistika hemokultivačních lahviček

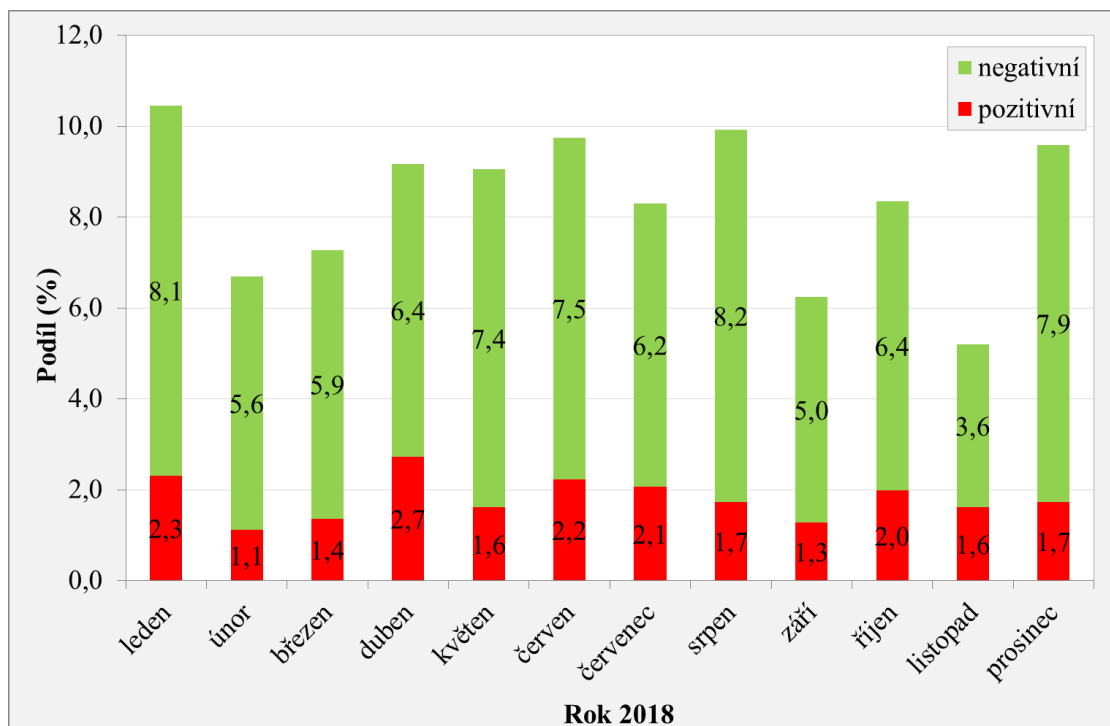
V roce 2018 bylo na pracovišti mikrobiologie NT, a.s. vyšetřeno celkem 2420 hemokultivačních lahviček (1212 aerobních a 1208 anaerobních) z interních oddělení a interních ambulancí (viz tabulka 2). Z tohoto počtu vyhodnotil automatický systém BactAlert 527 lahviček jako pozitivní (21,8 %) a 1893 jako negativní (78,2 %). Přičemž průměrná doba hlášení positivity byla 2,5 dne. Po odstranění duplicit (stejný kmen u jednoho pacienta ve více lahvičkách) a kontaminací bylo k další analýze týkající se patogenů použito 267 pozitivních lahviček.

Tabulka 2: Přehled o hemokultivačních lahvičkách z interních oddělení a ambulancí, NT, a.s., rok 2018

Hemokultivační lahvička	Negativní		Pozitivní		Celkem	
	Abs.	Rel. (%)	Abs.	Rel. (%)	Abs.	Rel. (%)
Aerobní	954	39,4	258	10,7	1212	50,1
Anaerobní	939	38,8	269	11,1	1208	49,9
Celkem	1893	78,2	527	21,8	2420	100,0

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře NT, a.s.; vlastní zpracování

Na následující straně je pak umístěn obrázek 9, který ukazuje rozložení negativních a pozitivních lahviček podle měsíců sledovaného roku 2018. Největší podíl pozitivních lahviček z celkového počtu odebraných byl zaznamenán v dubnu (2,7 %) a lednu (2,3 %) naopak nejméně v únoru (1,1 %) a září (1,3 %), zatímco negativních bylo nejvíce v srpnu (8,2 %) a lednu (8,1 %) a nejméně v listopadu (3,6 %) a září (5,0 %).

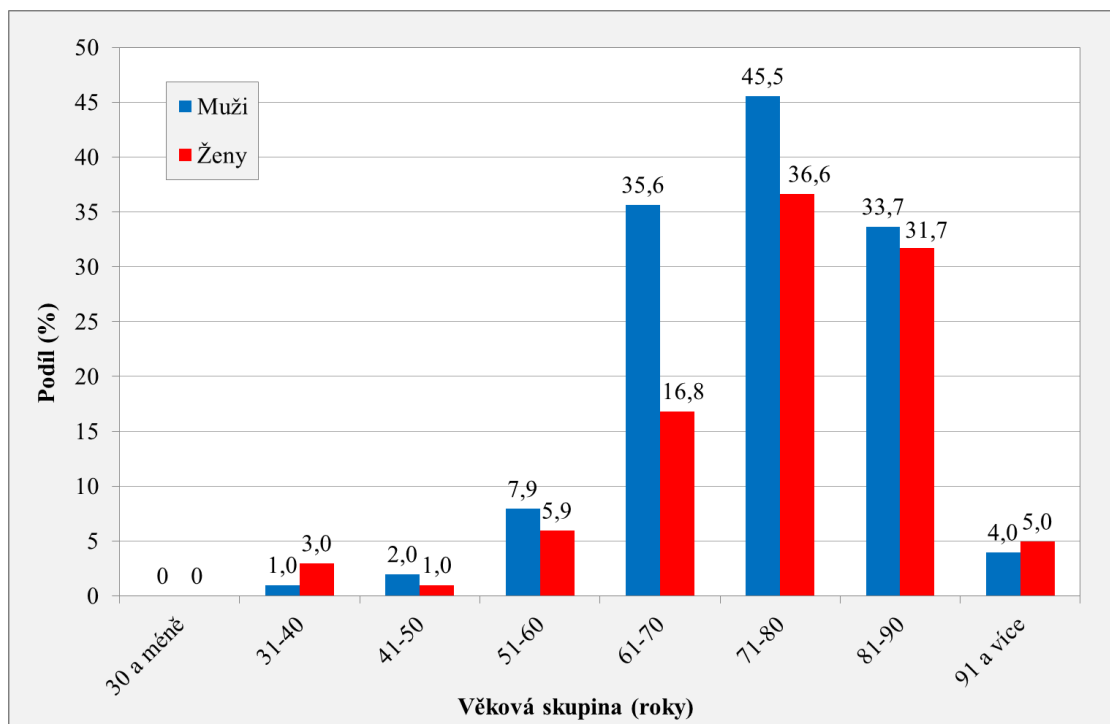


Obrázek 9: Negativní a pozitivní hemokultivační lahvičky, interní oddělení a ambulance NT, a.s., rozdělení dle měsíců, rok 2018

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře NT, a.s.; vlastní zpracování

7.2 *Struktura pacientů s pozitivním vzorkem*

V průběhu roku 2018 byla celkem u 218 osob, které byly hospitalizovány na interních odděleních či vyšetřeny na interní ambulanci NT, a.s., zjištěna pozitivní hemokultivace. Jednalo se o 122 mužů a 96 žen. Jejich strukturu podle věku uvádí obrázek 10 na následující stránce. Ve vyšetřovaném souboru nebyla ani jedna osoba mladší 30-ti let. U obou pohlaví převládala sice věková skupina 71-80 let, u žen z více jak jedné třetiny (36,6 %), u mužů z necelé poloviny (45,5 %), ale z grafu (obrázek 10) je při srovnání jednotlivých věkových skupin dle pohlaví zřetelný posun. Zatímco u žen je druhou nejvíce zastoupenou věkovou skupinou skupina 81-90, u mužů je to pak věková skupina 61-70 let.



Obrázek 10: Rozdělení osob s pozitivní hemokultivační lahvičkou dle pohlaví a věku, interní oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře NT, a.s.; vlastní zpracování

Rozložení pacientů dle oddělení téměř odpovídá i rozložení zachycených kmenů dle oddělení a ambulance – viz tabulka 3.

Tabulka 3: Rozdělení pacientů a kmenů dle interních oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018

Oddělení	Pacienti		Kmeny	
	Abs.	Rel. (%)	Abs.	Rel. (%)
Gastro-A	87	39,9	105	38,0
Gastro-C	31	14,2	42	15,2
Gastro-JIP	20	9,2	30	10,9
Kardio-B	21	9,6	27	9,8
Kardio-C	28	12,8	33	12,0
Kardio-JIP	23	10,6	30	10,9
PINTA	8	3,7	9	3,3
Celkem	218	100,0	276	100,0

Pozn.: „Gastro“ = gastroenterologické oddělení, „Kardio“ = kardiologické oddělení, JIP = jednotka intenzivní péče, PINTA = příjmová interní ambulance

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře NT, a.s.; vlastní zpracování

Největší množství pacientů i kmenů pocházelo z gastroenterologického oddělení, konkrétně z Gastro-A (87 pacientů a 105 kmenů), následovaného Gastro-C (31 pacientů, 42 kmenů). Obě tato oddělení mají 30 lůžek. Kardiologické oddělení rozdělené také na dva pavilony má 29 (Kardio-B) a 20 lůžek (Kardio-C). Obě jednotky intenzivní péče (=JIP) pak po 6-ti lůžkách. Jaký počet pacientů i kmenů pocházel ze zmíněných oddělení, ukazuje tabulka 3. Jedinou ambulancí, kde byly odebrány hemokultury, zastupuje Příjmová interní ambulance (= PINTA).

7.3 Struktura zjištěných patogenních mikroorganismů

Za rok 2018 bylo z 267 pozitivních hemokultivačních lahvíček (po odstranění duplicit a kontaminací) izolováno celkem 276 kmenů mikroorganismů od 218 osob. Z toho bylo 178 kmenů grampozitivních (64,5 %), 97 gramnegativních (35,1 %) a jednou byla zachycena kvasinka (viz tabulka 4).

Tabulka 4: Základní rozdělení mikroorganismů zachycených v pozitivních hemokultivačních lahvíčkách z interních oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018

Mikroorganismus	Frekvence výskytu	
	Abs.	Rel. (%)
G+	178	64,5
G-	97	35,1
Kvasinky	1	0,4
Celkem	276	100

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře NT, a.s.; vlastní zpracování

Za kontaminované bylo označeno 25 hemokultivačních lahvíček, ve kterých bylo identifikováno celkem 6 druhů bakterií uvedených v tabulce 5 na následující straně. Falešná pozitivita byla nejčastěji vyvolána přítomností *Propionibacterium species* (32,0 % případů), *Corynebacterium species* (24,0 % případů) a *Micrococcus luteus* (20,0 % případů). Ve 4 případech (16,0 %) se jednalo o kontaminaci koaguláza-negativními stafylokoky (*Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus hominis*) a ve dvou bakterií *Bacillus cereus* (8,0 %).

Tabulka 5: Původci kontaminací v hemokultivačních lahvičkách označených systémem jako pozitivní, interní oddělení NT, a.s., rok 2018

Mikroorganismus	Frekvence výskytu	
	Abs.	Rel. (%)
<i>Propionibacterium species</i>	8	32,0
<i>Corynebacterium species</i>	6	24,0
<i>Micrococcus luteus</i>	5	20,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	8,0
<i>Staphylococcus hominis</i>	2	8,0
<i>Bacillus cereus</i>	2	8,0
Celkem	25	100

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře NT, a.s.; vlastní zpracování

7.3.1 Gramnegativní tyčinky

Jak již bylo zmíněno, počet zachycených gramnegativních kmenů v pozitivních hemokultivačních lahvičkách byl 97. Toto číslo zahrnuje kmeny celkem 15 - ti druhů. Frekvenci jejich výskytu v absolutních počtech i relativně uvádí tabulka 6.

Tabulka 6: Frekvence výskytu gramnegativních mikroorganismů v pozitivních hemokultivačních lahvičkách, interní oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018

Mikroorganismus	Frekvence výskytu	
	Abs.	Rel. (%)
<i>Escherichia coli</i> *	47	48,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> **	22	22,7
<i>Proteus mirabilis</i>	9	9,3
<i>Enterobacter cloacae</i> komplex	5	5,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	3,1
<i>Morganella morganii</i>	2	2,1
<i>Providencia stuartii</i>	2	2,1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1,0
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	1,0
<i>Burkholderia multivorans</i>	1	1,0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1,0
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	1	1,0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1,0
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1,0
Celkem	97	100,0

* včetně 4 kmenů s produkcí ESBL a 1 s AmpC

** včetně 15 kmenů s produkcí ESBL

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře NT, a.s.; vlastní zpracování

Téměř polovinu z celkového počtu (48,5 %, 47 kmenů) tvořila *Escherichia coli* včetně kmenů s produkcí ESBL (4). Na druhém místě byla *Klebsiella pneumoniae* s hodnotou 22,7 % (celkem 22 kmenů, z toho 15 s produkcí ESBL), třetí pak *Proteus mirabilis*, kterého bylo vykultivováno 9 kmenů, což představovalo 9,3 % a za ním *Enterobacter cloacae* komplex (5,2 %). Druhy ostatních bakterií se vyskytovaly s četností nižší než 5 % (př. *Pseudomonas aeruginosa* 3,1 %).

7.3.2 Gramnegativní tyčinky – komunitní vs. hospitalizovaní pacienti

V tabulce 7 jsou gramnegativní mikroorganismy zjištěné z pozitivních hemokultivačních lahvíček pacientů interních oddělení a ambulance NT, a.s. tříděny dle skupin komunitní a hospitalizovaní pacienti. Do skupiny hospitalizovaní bylo zahrnuto 56,7 % gramnegativních tyčinek, tedy více než polovina. Více než jednu třetinu (konkrétně 36,1 %) pak tvořily kmeny gramnegativních tyčinek u skupiny komunitních pacientů. U 7,2 % bakteriálních kmenů (n = 7) se nepodařilo zjistit, k jaké skupině patří.

Tabulka 7: Struktura gramnegativních tyčinek – komunitní vs. hospitalizovaní pacienti, interní oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018

Mikroorganismus	Frekvence výskytu							
	Komunita		Nemocnice		Nezjištěno		Celkem	
	Abs.	Rel. (%)	Abs.	Rel. (%)	Abs.	Rel. (%)	Abs.	Rel. (%)
<i>Escherichia coli</i>	21	21,6	23	23,7	3	3,1	47	48,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	4,1	17	17,5	1	1,0	22	22,7
<i>Proteus mirabilis</i>	3	3,1	4	4,1	2	2,1	9	9,3
<i>Enterobacter cloacae</i> komplex	1	1,0	4	4,1	0	0,0	5	5,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1,0	2	2,1	0	0,0	3	3,1
<i>Morganella morganii</i>	1	1,0	1	1,0	0	0,0	2	2,1
<i>Providencia stuartii</i>	1	1,0	1	1,0	0	0,0	2	2,1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0,0	1	1,0	0	0,0	1	1,0
<i>Burkholderia multivorans</i>	0	0,0	1	1,0	0	0,0	1	1,0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1,0	0	0,0	0	0,0	1	1,0
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	1	1,0	0	0,0	0	0,0	1	1,0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1,0	0	0,0	0	0,0	1	1,0
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0,0	1	1,0	0	0,0	1	1,0
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	0,0	0	0,0	1	1,0	1	1,0
Celkem	35	36,1	55	56,7	7	7,2	97	100

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře a interní data NT, a.s.; vlastní zpracování

Při pohledu na zastoupení jednotlivých druhů gramnegativních bakterií v rámci sledovaných skupin lze konstatovat, že výraznějšího rozdílu dosahuje pouze druh *Klebsiella pneumoniae*, kdy do skupiny kmenů komunitních pacientů spadají pouze 4 kmeny tohoto druhu (z toho 2 s ESBL) oproti 17 kmenům ve skupině hospitalizovaní. Nutno poznamenat, že 15 kmenů druhu *Klebsiella pneumoniae* z celkových 22 je producentem ESBL, což jsou kmeny, které se hojně vyskytují tam, kde se hodně užívají antibiotika, tedy hlavně v nemocnicích.

7.4 Rezistence k antibiotikům u dvou nejčastěji zachycených mikroorganismů

U nejčastěji zastoupených gramnegativních kmenů, *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*, byla provedena analýza jejich rezistence a následně srovnání s EARS-Net.

7.4.1 *Escherichia coli*

V roce 2018 bylo v NT, a.s. z pozitivních hemokultivačních lahvíček identifikováno celkem 47 kmenů tohoto druhu. Přehled o jejich rezistenci ke sledovaným antibiotikům poskytuje tabulka 8.

Tabulka 8: Rezistence/citlivost k antibiotikům – kmeny *Escherichia coli* zachycené v pozitivních hemokultivačních lahvíčkách, interní oddělení a ambulance, NT, a.s., rok 2018

Antibiotika	<i>Escherichia coli</i> (n=47)*			
	Rezistentní		Citlivý	
	Abs.	Rel. (%)	Abs.	Rel. (%)
Ampicilin	18*	38,3	29	61,7
Gentamicin	0	0,0	47	100,0
Cefotaxim	5*	10,6	42	89,4
Ceftazidim	5*	10,6	42	89,4
Ciprofloxacin	6*	12,8	41	87,2

* z toho 4 kmeny s ESBL a 1 s AmpC

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře NT, a.s.; vlastní zpracování

Všechny zachycené kmeny *Escherichia coli* byly citlivé na gentamicin. Rezistenci k cefalosporinům třetí generace cefotaximu a ceftazidimu vykazovalo celkem 5 kmenů. Jednalo se o 4 kmeny s produkcí ESBL a 1 s AmpC, pro které je typické, že hydrolyzují právě cefalosporiny a kromě toho ještě peniciliny a monobaktamy (Hrabák a Vaniš et al., 2008). Všechny tyto kmeny s produkcí širokospektrých betalaktamáz byly

rezistentní ještě k ciprofloxacinu a ampicilinu. Z ostatních kmenů jen část byla rezistentní k ampicilinu (13 kmenů = 27,7 %) a 1 kmen k ciprofloxacinu.

7.4.2 *Klebsiella pneumoniae*

Druhým nejvíce zastoupeným patogenem zjištěným z pozitivních hemokultivačních lahvíček byla *Klebsiella pneumoniae* (n = 22). V tabulce 9 je přehled rezistence/citlivosti ke stejným antibiotikům, která jsou sledována i v EARS-net.

Tabulka 9: Rezistence/citlivost k antibiotikům – kmeny *Klebsiella pneumoniae* zachycené v pozitivních hemokultivačních lahvíčkách, interní oddělení a ambulance, NT, a.s., rok 2018

Antibiotika	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL (n=22)*			
	Rezistentní		Citlivý	
	Abs.	Rel. (%)	Abs.	Rel. (%)
Ampicilin	22	100,0	0	0,0
Gentamicin	7	31,8	15	68,2
Cefotaxim	15	68,2	7	31,8
Ceftazidim	15	68,2	7	31,8
Ciprofloxacin	13	59,1	9	40,9

* z toho 15 kmenů s ESBL

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře NT, a.s.; vlastní zpracování

Klebsiella pneumoniae je přirozeně rezistentní k ampicilinu, čemuž odpovídá i hodnota 100 % v tabulce 9. Další zjištěné rezistence se pak týkaly pouze kmenů s ESBL (zjištěno celkem 15 kmenů). U nich byla patrná 100% rezistence k cefalosporinům 3. generace – cefotaximu a ceftazidimu i vysoká rezistence k ciprofloxacinu 59,1 % (= 13 kmenů s produkcí ESBL). Zjištěných 7 kmenů rezistentních ke gentamicinu pocházelo také ze skupiny producentů širokospektrých betalaktamáz. U ostatních kmenů (bez produkce ESBL) byla zjištěna nulová rezistence ke všem sledovaným antibiotikům (vyjma výše zmíněného ampicilinu).

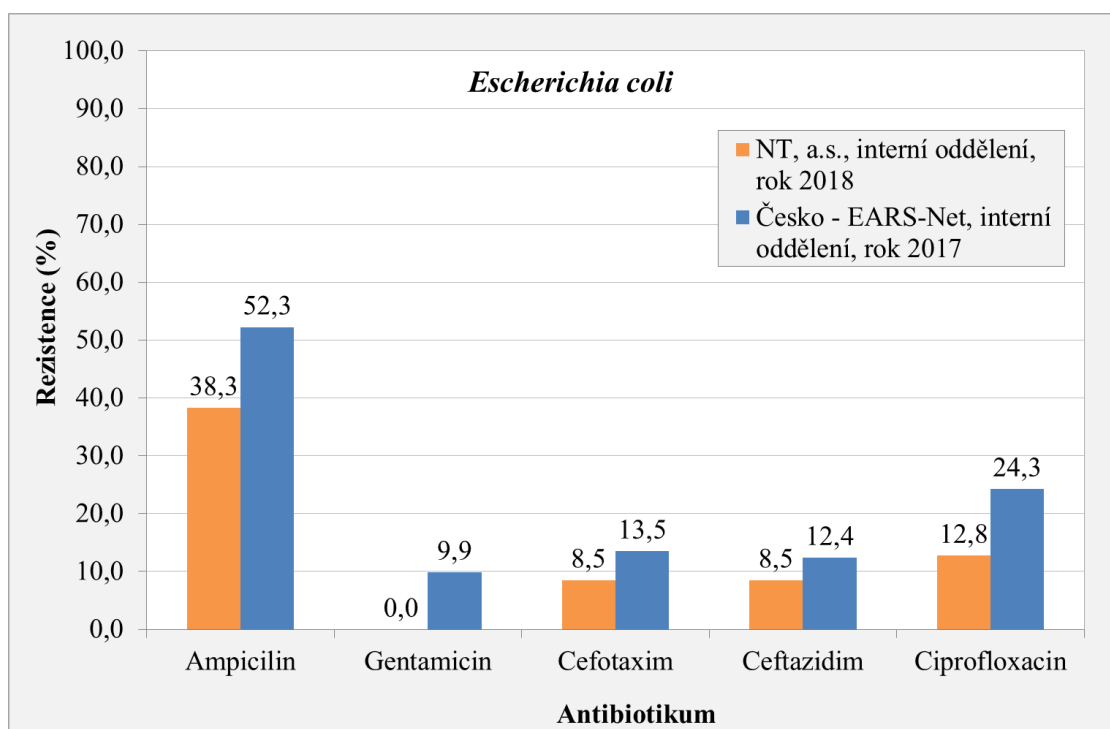
7.4.3 *Srovnání s daty z EARS-Net*

Rezistenci dvou nejčastěji zachycených gramnegativních kmenů *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* zjištěných v pozitivních hemokultivačních lahvíčkách od pacientů z interních oddělení NT, a.s., je možné také srovnávat s celorepublikovými daty, případně i s daty evropských zemí, a to sice díky EARS-Net. V rámci této práce to

však bude pouze orientační srovnání, neboť data za rok 2018 nebyla v době zpracování práce ještě zpřístupněná. Za celorepubliková data byl tedy použit rok 2017. Data za Česko z EARS-Netu budou stejně jako data z NT, a.s. z interních oddělení.

Escherichia coli

Obrázek 11 znázorňuje podíl rezistentních kmenů *Escherichia coli* zachycených v pozitivních hemokultivačních lahvičkách z interních oddělení a ambulance NT, a.s. ve srovnání s hodnotami za interní oddělení ze zdravotnických zařízení v rámci Česka, které se účastní sběru dat v EARS-Net. Lze vidět, že u všech sledovaných antibiotik měly kmeny *Escherichia coli* z NT, a.s. nižší rezistenci. Největší rozdíl v rezistenci byl u ciprofloxacinu, kde hodnota za NT, a.s. byla 12,8 % a naproti tomu hodnota za celé Česko 24,3 %.

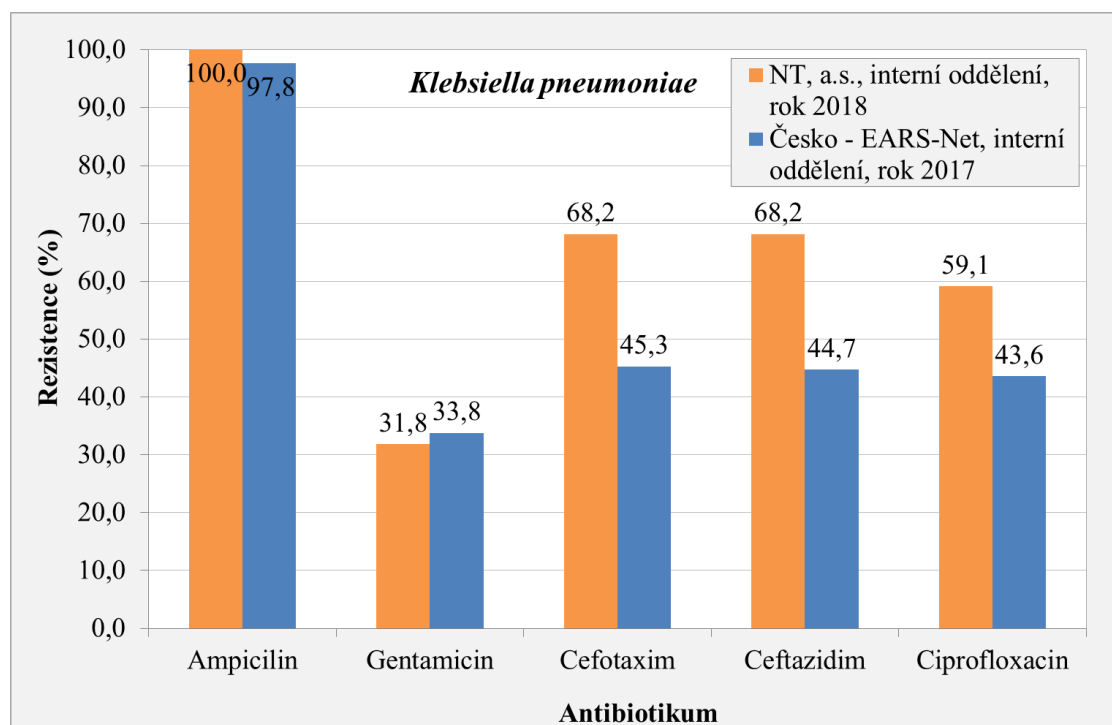


Obrázek 11: Rezistence (%) *Escherichia coli* ke sledovaným antibiotikům, interní oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018 a Česko - EARS-Net, rok 2017

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře NT, a.s., 2018; Databáze výsledků z EARS-Net, ©2010; vlastní zpracování

Klebsiella pneumoniae

Obrázek 12 znázorňuje srovnání dat o rezistenci kmenů *Klebsiella pneumoniae*. Kromě hodnot míry rezistence (%) u gentamicinu, jsou hodnoty z NT, a.s. vyšší než hodnoty za celé Česko a to nejvíce u cefalosporinů 3. generace – cefotaximu a ceftazidimu. Vzhledem k nízkému počtu kmenů *Klebsiella pneumoniae* z NT, a.s. - celkem 22, z čehož 15 kmenů bylo s produkcí ESBL, může být tak toto srovnání zkreslené.



Obrázek 12: Rezistence (%) *Klebsiella pneumoniae* ke sledovaným antibiotikům, interní oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018 a Česko - EARS-Net, rok 2017

Zdroj: LIS mikrobiologické laboratoře NT, a.s., 2018; Databáze výsledků z EARS-Net, ©2010; vlastní zpracování

8. Diskuze

Odběry hemokultur a jejich kultivace patří ke standardním metodám zjišťování původců sepse. V roce 2018 jich bylo z interních oddělení a ambulance táborské nemocnice zasláno na mikrobiologické pracoviště ke kultivaci 2420. Pozitivita byla zjištěna u 21,8 % z nich (n = 527). Pro další analýzu pozitivních byly vyloučeny duplicitní lahvičky a lahvičky kontaminované. Tímto postupem zbylo k hodnocení celkem 267 hemokultivačních lahviček odebraných 218 pacientům. Nejčastěji byla pozitivní hemokultivační lahvička zjištěna u osob ve věkové skupině 71-80 let, kteří byli hospitalizováni na oddělení Gastro-A (celkem 87 pacientů = 39,9 % z celkového počtu).

Zaměření této práce bylo na gramnegativní bakterie, proto budou jejich výsledky níže diskutovány. Gramnegativní kmeny bakterií byly zachyceny ve zhruba jedné třetině těchto lahviček, celkem se jednalo o 97 kmenů 15 druhů bakterií. Nejčastěji byly zachyceny kmeny *Escherichia coli* (ve 48,5 % případů) a *Klebsiella pneumoniae* (ve 22,7 % případů). Kolář et al. (2002) ve své studii o frekvenci gramnegativních patogenů u IKŘ a jejich rezistenci k antibiotikům v Česku uvádí, že v souboru malých nemocnic patří mezi bakteriální druhy s nejvyšším zastoupením právě *Escherichia coli* (38,9 %) a *Klebsiella pneumoniae* (24,3 %). Na prvních dvou pozicích zmiňuje tyto druhy i v souboru velkých nemocnic, i když s o něco nižším podílem zastoupení. Na dalších pozicích se pak v rámci této studie nachází *Pseudomonas aeruginosa*, která sice v této bakalářské práci nebyla na třetí pozici, ale zaujala místo v první pětici zachycených patogenů. Na třetí pozici byl *Proteus mirabilis* (9,3 %).

Z novějších prací zastoupení bakteriálních druhů v hemokulturách zmiňuje např. Kolář a Štrbová (2015), kteří se zaměřují i na rezistenci. Ve výsledcích své studie kromě prvenství grampozitivních koaguláza negativních stafylokoků uvádí, že z gramnegativních bakterií jsou nejčastěji zastoupeny právě kmeny druhů *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* (přibližně 10 % u obou druhů ovšem z celkového počtu patogenů a nejen gramnegativních). Interní oddělení NT, a.s. z hlediska struktury patogenů zjištěných v hemokultivačních lahvičkách v porovnání s těmito studiemi nijak nevybočují.

Důležité je ale také podotknout, že na zastoupení bakteriálních patogenů má vliv i složení pacientů a odlišnosti jejich základních onemocnění (Čermák, 2008). V případě

nesrovnalostí by tedy bylo vhodné zaměřit se i na tuto stránku věci a hledat faktory, které mohly výslednou strukturu patogenů ovlivnit.

V práci byly také v rámci druhé hypotézy hodnoceny rozdíly mezi spektrem gramnegativních patogenů izolovaných z pozitivních hemokultivačních lahvíček u komunitních a u hospitalizovaných pacientů. Toto téma bylo zatíženo řadou omezení, která mohly mít vliv na konečný výsledek analýzy. Jednalo se hlavně o stanovení a následné dodržení hranice zařazení kmenů z pozitivních vzorků mezi skupinu komunitních či hospitalizovaných pacientů. Hranicí je sice ona 48 hodinová lhůta (viz metodika), avšak důležité také je, zda daný pacient nebyl v poslední době léčen v jiném zdravotnickém zařízení a infekci si tak nemohl přinést odsud. To bohužel nebylo možné ze záznamů o pacientovi spolehlivě zjistit. Spolehlivě zjištěna mohla být pouze předchozí hospitalizace v NT, a.s., což bylo také provedeno. Pokud pacientovi při příjmu do nemocnice byla odebrána hemokultura, která byla následně pozitivní, spadal tento vzorek do skupiny komunitní pouze v tom případě, kdy daný pacient nebyl hospitalizován v táborské nemocnici v posledních třech měsících. V opačném případě byl zařazen do skupiny hospitalizovaní. O možnosti vzniku nozokomiální nákazy po propuštění pacienta domů píše i někteří autoři (Maďar et al., 2006, Bartůněk et al., 2016). Z této tříměsíční lhůty tedy v rámci této práce pocházelo celkem 22 zachycených kmenů, z čehož 12 bylo zachyceno do 1 měsíce od předchozí hospitalizace, 8 do 2 měsíců a 2 do třech měsíců. Takto byly roztrženy pozitivní vzorky se zachyceným gramnegativním mikroorganismem, přičemž do skupiny vzorků od komunitních pacientů jich bylo zařazeno celkem 35 a do skupiny od hospitalizovaných 55. U 7 pacientů se bohužel údaje k zařazení do jedné či druhé skupiny vůbec nepodařilo zjistit. Vzhledem k výše uvedenému tedy mohlo dojít ke zkreslení výsledků ve smyslu nadhodnocení skupiny komunita právě o pacienty, u nichž nebyla zjištěna předchozí hospitalizace, popřípadě i pobyt v domově důchodců či ústavu dlouhodobé péče (také rizikové faktory), ale i nadhodnocení skupiny hospitalizovaní, neboť ne všechny kmeny z oné tříměsíční lhůty musely být nozokomiální. S tímto vědomím byla provedena analýza spektra gramnegativních bakterií zjištěných z pozitivní hemokultivace u sledovaných skupin pacientů.

V zastoupení bakteriálních druhů u skupin komunitních a hospitalizovaných pacientů nebyly shledány významné rozdíly. Pořadí první pětky bakteriálních druhů bylo u obou skupin shodné. Nejčastěji byly zastoupeny kmeny druhu *Escherichia coli*, *Klebsiella*

pneumoniae a *Proteus mirabilis*. Větší rozdíl byl pouze v zastoupení kmenů *Klebsiella pneumoniae*. Z celkových 22 kmenů spadlo 17 do skupiny hospitalizovaných. Mezi těmito 17 kmeny bylo totiž celkem 15 kmenů s produkcí ESBL, což jsou kmeny, které vykazují rezistenci k jedné či více skupinám antibiotik. Ke vzniku či přenosu této rezistence pak nejčastěji dochází právě v nemocnicích, kde je přítomno více rizikových faktorů (Sas, 2010).

Posledním bodem k diskuzi je zhodnocení zjištěné antibiotické rezistence zachycených kmenů a to i v porovnání s daty z programu EARS-Net. Jak bylo uvedeno již v metodice, tak toto srovnání má pouze orientační charakter, neboť v době přípravy a dokončení této práce nebyla ještě dostupná data z EARS-Net za rok 2018. Proto byl ke srovnání zvolen rok 2017. Zhodnocení a srovnání bylo provedeno pro dva nejčastěji zastoupené druhy – *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*.

Kmeny druhu *Escherichia coli* (celkem 47, z toho 4 s ESBL a 1 s AmpC) vykazovaly nejvyšší rezistenci (38,3 %) k ampicilinu (aminopeniciliny). Jedná se ale o hodnotu nižší než je celorepublikový průměr za interní oddělení sestavený z dat EARS-Net (52,3 %). U cefalosporinů třetí generace nepřesáhla rezistence 10 %, což je vzhledem k hodnotám z EARS-Net (13,5 % - cefotaxim, 12,4 % - ceftazidim) méně. Podle EARS-Net i Koláře a Štrbové (2015) vzrůstá rezistence u cefalosporinů třetí generace, ale u kmenů zachycených z pozitivních vzorků z interních oddělení NT, a s. není tento problém vzhledem k hodnotám interních oddělení za celé Česko v rámci EARS-Net zatím tak výrazný. Jiná je však situace u druhého nejvíce zastoupeného druhu *Klebsiella pneumoniae*.

Při zhodnocení antibiotické rezistence kmene *Klebsiella pneumoniae* je důležité upozornit, že 15 kmenů z celkových 22 bylo s produkcí ESBL. To se odrazilo i ve srovnání s daty z EARS, kdy kmeny druhu *Klebsiella pneumoniae* vykazovaly daleko vyšší rezistenci k cefalosporinům třetí generace (cefotaxim, ceftazidim - 68,2 %) oproti celorepublikovému průměru (cefotaxim – 45,3 %, ceftazidim - 44,7 %). Hodnoty rezistence tohoto druhu k cefalosporinům třetí generace dle dat z EARS-Net od počátku sledování (rok 2005) s drobnými výkyvy rostou. Vzestupný trend výskytu kmenů druhu *Klebsiella pneumoniae* s ESBL uvádí i Urbánek a Kolář et al. (2007). Zároveň poukazují na přímou souvislost mezi spotřebou cefalosporinů třetí generace a výskytem kmenů *Klebsiella pneumoniae* s ESBL. Také Htoutou Sedláková a Vojtová et al. (2012)

ve své práci udávají trend zvyšující se rezistence *Klebsielly pneumoniae* k cefalosporinům třetí generace a zároveň k fluorochinolonům, u kterých byla v této práci také zjištěna vyšší rezistence u kmenů z NT, a.s. oproti datům z EARS-Net. Ovšem již v jejich studii nebyla potvrzena přímá spojitost mezi spotřebou těchto antibiotik a frekvencí výskytu kmenů daného druhu. Hovoří spíše o nepřímé souvislosti, tedy že stoupá antibiotická rezistence, avšak spotřeba cefalosporinů třetí generace klesá.

Je důležité také zmínit to, že pro hodnocení rezistence k antibiotikům u zjištěných kmenů, a to i ve srovnání s daty z EARS-Net, by bylo jistě vhodnější zvolit delší časové období, což by mohlo více napovědět o tom, kterým směrem se daná problematika vyvíjí, a zda se rozdíl mezi daty za interní oddělení a ambulanci NT, a.s. a daty z EARS-Net za interní oddělení v Česku snižují či zvyšují. Nutné je též upozornit na možný vliv nízkých počtů kmenů v rámci NT, a.s. Zajímavé by pak také bylo mezinárodní srovnání. Jeho zařazení už by však bylo nad rámec i rozsah této práce.

9. Závěr

Kultivace hemokultur včetně následného zpracování pozitivního vzorku je významným diagnostickým prostředkem k určení původce infekce krevního řečiště. Pro tak závažný stav jakým je sepse, je velice důležitá, neboť pomáhá stanovit adekvátní antibiotickou terapii.

V rámci přípravy této práce jsem si zažila postup kultivace hemokultur i postup dalšího zpracování pozitivního vzorku. Kromě toho byla zhodnocena i data o hemokulturách z interních oddělení a ambulancí NT, a.s. za rok 2018 (spektrum patogenů, srovnání komunitních a hospitalizovaných pacientů). Uvedeny byly také informace o rezistenci nejčastěji zjištěných bakteriálních druhů včetně srovnání s daty z EARS-Net (průměr za interní oddělení Česka), což bylo také cílem této práce.

Navíc, shrneme-li výše uvedené informace ve výsledcích a diskuzi, lze konstatovat, že první hypotéza o tom, že nejčastěji zjištěné gramnegativní patogeny z hemokultur z interních oddělení a ambulance NT, a.s. se neliší od těch uváděných v odborné literatuře, byla potvrzena. Druhá hypotéza této práce vyslovující domněnku o rozdílu mezi spektrem patogenů zjištěných v pozitivních hemokultivačních lahvičkách od pacientů z komunity a hospitalizovaných pacientů sice potvrzena nebyla, ale je nutné zmínit, že výsledky mohly být částečně ovlivněny nadhodnocením jedné či druhé skupiny. Poslední hypotéza týkající neexistence rozdílu rezistence k antibiotikům zachycených patogenů ve srovnání s daty z EARS-Net také nebyla potvrzena (rozdíl byl patrný u *Klebsielly pneumoniae*). Na tento výsledek by však mohlo mít vliv to, že v případě dat za NT, a.s. byl nízký počet kmenů v souboru.

Na závěr je důležité podotknout, že data o struktuře patogenů včetně hodnocení jejich rezistence v rámci jednotlivých zdravotnických zařízení (a tedy i Nemocnice Tábor, a.s.) je důležité pravidelně sledovat, aby bylo možné na zjištěnou situaci reagovat a předcházet tak možným komplikacím. Kontrola antibiotické rezistence spolu s kontrolou užívání antibiotik a dalšími preventivními či epidemiologickými opatřeními má dopad nejen na frekvenci výskytu multirezistentních bakteriálních kmenů, ale ve výsledku může mít dopad i na kratší léčbu pacienta a s tím spojené nižší náklady.

10. Seznam literatury

1. BEDNÁŘ, M., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. 558 s.
2. BENEŠ, J., 2009. *Infekční lékařství*. Praha: Galén. 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.
3. BENEŠ, J., 2018. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada Publishing. 600 s. ISBN 978-80-271-0636-3.
4. BALK, R. A., BONE, R. C., 1989. The Septic Syndrome: Definition and Clinical Implications. *Critical Care Clinics* [online]. 5(1), 1-8 [cit. 2019-03-25], doi: 10.1016/S0749-0704(18)30447-0.
5. BARTŮNĚK, P., JURÁSKOVÁ, D., HECZKOVÁ, J., NALOS, D., 2016. Vybrané kapitoly z intenzivní péče. Praha: Grada Publishing, Sestra (Grada). 752 s. ISBN 978-80-247-4343-1.
6. BROWN, D., CANTÓN, R., DUBREUIL, L., GATERMANN, S., GISKE, C., MacGOWAN, A., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L., MOUTON, J., SKOV, R., STEINBAKK, M., WALTON, C., HEUER, O., STRUELENS, M. J., DIAZ HOGBERG, L., KAHLMETER, G., 2015. Widespread implementation of EUCAST breakpoints for antibacterial susceptibility testing in Europe. *Euro Surveill* [online]. 20(2) [cit. 2019-03-28], doi: 10.2807/1560-7917.ES2015.20.2.21008.
7. BURSOVÁ, Š., DUŠKOVÁ, M., NECIDOVÁ, L., KARPÍŠKOVÁ, R., MYŠKOVÁ, P., 2014. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 80 s. ISBN 978-80-7305-675-9.
8. CALANDRA, T., COHEN, J., 2005. The International Sepsis Forum Consensus Conference on Definitions of Infection in the Intensive Care Unit. *Critical Care Medicine* [online]. 33(7), 1538-1548 [cit. 2019-04-28], doi: 10.1097/01.CCM.0000168253.91200.83.
9. ČERMÁK, P., 2008. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. Praha: Maxdorf. Jessenius. 182 s. ISBN 978-80-7345-142-4.
10. *Databáze výsledků EARS-Net* [online]. Státní zdravotní ústav: ©2010 [cit. 27-4-2019]. Dostupné z: <https://apps.szu.cz/earsnet/uvod.php>.

11. EUCAST, 2019. *EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing* [online]. Version 7.0. EUCAST. [cit. 12-3-2019]. Dostupné z: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Manual_v_7.0_EUCAST_Disk_Test_2019.pdf.
12. European Centre for Disease Prevention and Control, 2018. *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017* [online]. Stockholm: ECDC [cit. 12-3-2019], doi: 10.2900/230516.
13. HOLUB, M., 2018. Definice sepsy a septického šoku. *Klinická biochemie a metabolismus*. 26(2), 76-78. ISSN 1210-7921.
14. HRABÁK, J., VANIŠ, V., BERGEROVÁ, T., URBÁŠKOVÁ, P., 2008. Průkaz beta-laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií [online]. Praha: Státní zdravotní ústav [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/prukaz-beta-laktamaz-sirokeho-spektra-esbl-a-typu-ampc-u>.
15. HTOUTOU SEDLÁKOVÁ, M., VOJTOVÁ, V., HANULÍK, V., SUCHÁNKOVÁ H., KOLÁŘ, M., 2012. Rezistence enterobakterií k vybraným antibiotikům v souvislosti s jejich spotřebou. *Klinická farmakologie a farmacie*. 26(2), 61-66. ISSN 1212-7973.
16. IDELEVICH, E. A., I. SCHÜLE, B. GRÜNASTEL, J. WÜLLENWEBER, G. PETERS a K. BECKER., 2014. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 20(10), 1001-1006 [cit. 2019-03-28], doi: 10.1111/1469-0691.12640.
17. KLABAN, V., 2005. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén. 654 s. ISBN 8072623419.
18. KOLÁŘ, M., 2016. Sepse z pohledu klinické mikrobiologie. *Klinická farmakologie a farmacie*. 30(3), 29-32. ISSN 1212-7973.

19. KOLÁŘ, M., HEINIGEOVÁ, B., BARTONÍKOVÁ, N., ČERMÁK, P., et al., 2003. Grampozitivní patogeny při infekcích krevního řečiště – multicentrická studie. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství*. 9, 244-52. ISSN 1211-264X.
20. KOLÁŘ, M., LÁTAL, T., ČERMÁK, P., 2002. Frekvence gramnegativních patogenů u infekcí krevního řečiště a jejich rezistence k antibiotikům v České republice. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 8(2), 61-7. ISSN 1211-264X.
21. KOLÁŘ, ŠTRBOVÁ, P., 2015. Vývoj rezistence invazivních bakterií v souvislosti se spotřebou antibiotik. *Klinická Farmakologie a Farmacie* [online]. 29(2). 49-52 [cit. 2019-04-07]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2015/02/01.pdf>.
22. KOPECKÁ, J., ROTKOVÁ, G., 2017. *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií* [online]. Brno: Masarykova univerzita [cit. 2019-04-07]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/docs/Mikrobiologie.pdf.
23. LAMY, B., DARGÈRE, S., C. ARENDRUP, M., PARIENTI, J.J., TATTEVIN, P., 2016. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Frontiers in Microbiology* [online]. 7 [cit. 2019-03-16], doi: 10.3389/fmicb.2016.00697.
24. LEVY, M.M., FINK, M.P., MARSHALL, J.C., ABRAHAM, E., ANGUS, D., COOK, D., COHEN, J., OPAL, S.M., VINCENT, J.L., RAMSAY, G., 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* [online]. 29(4), 530-538 [cit. 2019-03-16], doi.org/10.1007/s00134-003-1662-x.
25. MAĐAR, R., PODSTATOVÁ, R., ŘEHOŘOVÁ, J., 2006. *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*. Praha: Grada. 184 s. ISBN 80-247-1673-9.
26. MATĚJOVIČ, M., 2017. Sepse a její nová definice. *Postgraduální nefrologie* [online]. 15(1), 4-8 [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://www.postgraduálninefrologie.cz/cislo-xv-1/sepse-a-jeji-nova-definice/>.

27. OPOTA, O., CROXATTO, A., PROD'HOM, G., GREUB, G., 2015. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 21(4), 313-322 [cit. 2019-03-16], doi: 10.1016/j.cmi.2015.01.003.
28. SAS, I., 2010. Nozokomiální infekce a infekce multirezistentními organismy v podmínkách intenzivní péče. *Postgraduální medicína*. 12(9), 1079-1087. ISSN 1212-4184.
29. SCHARFEN, J., 2013. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Praha: Nucleus HK. 236 s. ISBN 978-80-87009-32-1.
30. SCHINDLER, J., (2014). *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. 248 s. ISBN 978-80-247-4771-2.
31. SINGER, M., DEUTSCHMAN C.S., SEYMOUR, CH.W. et al., 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* [online]. 315(8) [cit. 2019-03-16], doi: 10.1001/jama.2016.0287.
32. TREK Diagnostic Systems, 2013. VERSATREK® Uživatelský manuál [online]. BioVendor [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.biovendor.cz/versatrek-r-240-hemokultivacni-system-kapacita-96-vzorku/p91.6240-04-220/#tab=downloads>.
33. URBÁNEK, K., KOLÁŘ, M., LOVEČKOVÁ, Y., STROJIL, J., ŠANTAVÁ, L., 2007. Influence of third-generation cephalosporin utilization on the occurrence of ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* [online]. 32(4), 403-408 [cit. 2019-04-28], doi: 10.1111/j.1365-2710.2007.00836.x.
34. URBÁŠKOVÁ, P., 2008. O EARS-Net v České republice [online]. Praha: Státní zdravotní ústav [cit. 2019-02-14]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ears-net-4/o-earss-v-ceske-republice>.
35. URBÁŠKOVÁ, P., 2014. Metodika sběru dat [online]. Praha: Státní zdravotní ústav [cit. 2019-02-14]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ears-net-4/metodika-sberu-dat>.
36. VANIŠ, V., URBÁŠKOVÁ, P., LITOŠ, P., 2000. Multicentrická studie gramnegativních nozokomiálních kmenů na JIP v České republice. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství*. 4, 116-121. ISSN 1211-264X.

37. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
38. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vydání. Brno: Neptun. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
39. VOTAVA, M., 2010. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. 504 s. ISBN 978-80-86850-04-7.
40. *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2008 - 2017 – absolutně*, 2018. [online]. Státní zdravotní ústav [cit. 25-3-2019]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/2017/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2008-2017-absolute>.
41. ZADÁK, Z., HAVEL, E., 2007. *Intenzivní medicína na principech vnitřního lékařství*. Praha: Grada. 336 s. ISBN 978-80-247-2099-9.
42. *Zemřelí podle seznamu příčin smrti, pohlaví a věku v ČR, krajích a okresech*, 2018. [online]. Český statistický úřad. [cit. 12-3-2019]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/ceska-republika-podle-pohlavi-a-veku-2007-2016-770xpsf8rn>.

11. Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma znázorňující vztah pojmů bakteriémie, infekce krevního řečiště a sepse.....	10
Obrázek 2: Infekce, SIRS a sepse, vzájemný vztah a příčiny	10
Obrázek 3: Srovnání původních definic a nové definice sepse.....	14
Obrázek 4: Počet hlášených případů s diagnózou jiná septikémie (A40) na 100 tis. obyvatel, Česko, roky 2008 – 2017	15
Obrázek 5: Mortalita – infekční a parazitární onemocnění a jiná sepse, Česko, roky 2008 – 2017	16
Obrázek 6: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů v hemokulturách.....	17
Obrázek 7: Vitek 2 Compact	27
Obrázek 8: Systém ke kultivaci hemokultur BacT/Alert a kultivační lahvičky	36
Obrázek 9: Negativní a pozitivní hemokultivační lahvičky, interní oddělení a ambulance NT, a.s., rozdělení dle měsíců, rok 2018	40
Obrázek 10: Rozdělení osob s pozitivní hemokultivační lahvičkou dle pohlaví a věku, interní oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018	41
Obrázek 11: Rezistence (%) <i>Escherichia coli</i> ke sledovaným antibiotikům, interní oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018 a Česko - EARS-Net, rok 2017.....	47
Obrázek 12: Rezistence (%) <i>Klebsiella pneumoniae</i> ke sledovaným antibiotikům, interní oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018 a Česko - EARS-Net, rok 2017	48

12. Seznam tabulek

Tabulka 1: Mechanismy vzniku rezistence na antibiotika	22
Tabulka 2: Přehled o hemokultivačních lahvičkách z interních oddělení a ambulancí, NT, a.s., rok 2018	39
Tabulka 3: Rozdělení pacientů a kmenů dle interních oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018	41
Tabulka 4: Základní rozdělení mikroorganismů zachycených v pozitivních hemokultivačních lahvičkách z interních oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018.....	42
Tabulka 5: Původci kontaminací v hemokultivačních lahvičkách označených systémem jako pozitivní, interní oddělení NT,a.s., rok 2018	43
Tabulka 6: Frekvence výskytu gramnegativních mikroorganismů v pozitivních hemokultivačních lahvičkách, interní oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018	43
Tabulka 7: Struktura gramnegativních tyčinek – komunitní vs. hospitalizovaní pacienti, interní oddělení a ambulance NT, a.s., rok 2018	44
Tabulka 8: Rezistence/citlivost k antibiotikům – kmeny <i>Escherichia coli</i> zachycené v pozitivních hemokultivačních lahvičkách, interní oddělení a ambulance, NT, a.s., rok 2018	45
Tabulka 9: Rezistence/citlivost k antibiotikům – kmeny <i>Klebsiella pneumoniae</i> zachycené v pozitivních hemokultivačních lahvičkách, interní oddělení a ambulance, NT, a.s., rok 2018	46

13. Přílohy

Příloha 1: Povinně sledovaná antibiotika a antibiotika doporučená ke sledování u 7 druhů invazivních bakterií

Kód	Antibiotikum	Kód bakterie					
		spn	sau	efa, efm	eco, kpn	pae	acsp
AMK	Amikacin	D	D	D
AMP	Ampicilin	P	P
CAZ	Ceftazidim	P	P	...
CIP	Ciprofloxacin	P*	D**	...	P**	P	P
CLI	Klindamycin	D	D
COL	Kolistin	D	D
CTX	Cefotaxim	P	P
ERY	Erytromycin	P	P
FOX	Cefoxitin (skrining)	...	P
FUS	Kyselina fusidová	...	D
GEN	Gentamicin	...	D	...	P	P	P
GEH	Gentamicin-High	P	P
IMP	Imipenem***	D	P	D
LNZ	Linezolid	...	P	D
MEM	Meropenem***	D	P	P
NOR	Norfloxacin (skrining)	P
OXA	Oxacilin	...	P
PEN	Penicilin	P
RIF	Rifampicin	D	P
TEC	Teikoplanin	D
TCY	Tetracyklin	D	D
TOB	Tobramycin	...	D	...	D	D	P
TZP	Piperacilin/tazobactam	D	P****	...
SXT	Ko-trimoxazol	...	D	...	D
VAN	Vankomycin	...	P	P
ESBL	CAZ+CTX+AMC (skrining)	P

Vysvětlivky: P: povinně sledovaná antibiotika; D: antibiotika jejichž sledování je doporučeno; ... tato antibiotika se u daného druhu nesledují; Gentamicin-High, vysoká rezistence; * MIC CIP se vyšetřuje povinně, ukazuje-li výsledek skriningu s norfloxacinem na možnou rezistenci k fluorochinolonům; ** u sau, eco a kpn vyšetřují některé laboratoře místo preferovaného ciprofloxacinu ofloxacin, výsledek je proto uváděn jako fluorochinolony; *** lze vyšetřit IMP nebo MEM, výsledek uvádí karabapenemy; **** pokud se u *P. aeruginosa* vyšetřuje TZP, hodnotí se jako piperacilin (PIP); ESBL: průkaz inhibice ESBL kyselinou klavulanovou v diskovém testu DDS (double disk synergy).

Zdroj: Urbášková, 2014

14. Seznam zkratek

AST	Antimicrobial Susceptibility Testing
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EHK	externí hodnocení kvality
EPIDAT	epidemiologická databáze
ESCMID	The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GIT	gastrointestinální trakt
IKŘ	infekce krevního řečiště
ISIS	Informační systém infekční nemoci
KNS	koaguláza negativní stafylokoky
LIS	laboratorní informační systém
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
MH agar	Müller-Hinton agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace (z angl.. minimal inhibitory concentration)
NSVP	Národní standardní vyšetřovací postup
NRL pro ATB	Národní referenční laboratoř pro antibiotika
NT, a.s.	Nemocnice Tábor, akciová společnost
PCR	Polymerase Chain Reaction
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SLM	stanice lékařské mikrobiologie
SLM ČLP JEP	Společnost lékařské mikrobiologie Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, z.s.
SZÚ	Státní zdravotní ústav
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky