



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

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

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Hana Žáková

Vedoucí práce: prim. MUDr. Věra Kůrková

České Budějovice 2019

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2019

.....

Poděkování

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

Základní mikrobiologické vyšetření hemokultur v automatickém hemokultivačním systému

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na téma vyšetření hemokultur v automatickém hemokultivačním systému. V teoretické části se věnuje zejména obecným pojmům přítomnosti bakterií v krvi a rozvoji sepse, dále popsání nejčastějších infekčních agens v hemokulturách u odlišných skupin pacientů a také různým typům hemokultivačních systémů od starších po nejnovější. Jsou popsány manuální systémy, jako např. Septi-Chek a Oxoid Signal systém, a automatizované systémy BACTEC a Bact/Alert, které pracují na odlišných principech. Rozebráno je také následné zpracování vzorků k identifikaci mikrobiálních původců a zjištění jejich citlivosti na antibiotika. Cílem bylo osvojit si praktické zpracování hemokultur v automatickém hemokultivačním systému BACTEC. Metodická část je věnována přípravě a zpracování vzorků pro hemokultivaci, následnému postupu inokulace na kultivační půdy a zhotovení mikroskopického preparátu barveného dle Grama. Dále se práce zabývá statistickým zpracováním dat poskytnutých na mikrobiologickém oddělení Nemocnice Písek, a.s., kde probíhalo také osvojení zpracování hemokultur. Statistické šetření bylo prováděno za účelem zjištění mikrobiálního spektra v hemokulturách a procenta pozitivit k celkovému počtu odebraných hemokultur v letech 2014-2018. Za zkoumané období bylo vyšetřeno celkem 9838 hemokultur. Z celkového počtu bylo pozitivních 2338, tzn. 24 %. 76 % hemokultur bylo negativních, nevykazovaly růst mikroorganismů. Mikrobiální spektrum je velmi široké, k nejčastějším nálezům patří *Staphylococcus plasmakoagulasa* negativní, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Klebsiella species*.

Klíčová slova

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

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

Abstract

This bachelor thesis is focused on examination of blood cultures in automatic blood culture system. In the theoretical part, it deals mainly with general terms of the presence of bacteria in the blood and the development of sepsis, as well with the description of the most frequent infectious agents in blood cultures in different groups of patients and also with different types from the oldest to newest blood culture systems. Manual systems are described, such as Septi-Chek and Oxoid Signal System, and automated BACTEC and Bact / Alert systems that work on different principles. The subsequent processing of samples is also discussed to identify microbial agents and determine their susceptibility to antibiotics. The aim was to acquire practical processing of blood cultures in automatic BACTEC hemocultivation system. The methodical part is devoted to the preparation and processing of samples for hemoculture, the subsequent procedure of inoculation on the cultivation soil and the preparation of a microscopic preparation stained by Gram. Furthermore, the thesis deals with the statistical processing of data provided at the microbiological department of the Nemocnice Písek, a.s. The statistical survey was carried out in order to determine the microbial spectrum in blood cultures and the percentage of positivity to the total number of collected blood cultures in 2014-2018. A total of 9838 blood cultures were examined during the study period. Of the total number, 2338 were positive. That is 24%. 76% of blood cultures were negative, did not show growth of microorganisms. The microbial spectrum is very wide, the most common infection agents are *Staphylococcus plasmakoagulasa* negative, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Klebsiella species*.

Keywords

Bacteraemia; sepsis; bloodstream infection; bloodculture; bloodculture system

Obsah

Úvod.....	8
1 Teoretická část	9
1.1 Bakteriémie	9
1.2 Infekce krevního řečiště.....	9
1.3 SIRS	9
1.4 Sepse	10
1.4.1 Etiologie.....	10
1.4.2 Patofyziologie	11
1.4.3 Septický šok.....	11
1.4.4 MODS	11
1.5 Nejčastější původci infekcí krevního řečiště	12
1.5.1 Ambulantní pacienti.....	12
1.5.2 Nemocniční pacienti	12
1.5.3 Novorozenci a děti	13
1.5.4 Imunokompromitovaní pacienti.....	13
1.5.5 Enterobakterie	13
1.5.6 Pyogenní koky	15
1.5.7 Grampozitivní tyčky	18
1.5.8 Gramnegativní tyčky.....	19
1.5.9 Anaerobní bakterie.....	20
1.5.10 Kvasinky	21
1.6 Mikrobiologické vyšetření hemokultur	21
1.6.1 Odběr a transport hemokultur	22
1.6.2 Manuální hemokultivační systémy	22
1.6.3 Automatizované hemokultivační systémy	24
1.6.4 Mikroskopie a kultivace.....	25

1.6.5 Identifikace	26
1.6.6 Vyšetření citlivosti	26
2 Cíle práce	27
3 Metodika	28
3.1 Princip metodické části	28
3.2 Příprava vzorků	28
3.3 Hemokultivační lahvičky systému BACTEC	29
3.4 Zpracování vzorků	29
3.5 Vložení lahviček do přístroje	30
3.6 Pozitivní lahvičky	30
3.7 Zpracování pozitivních hemokultur	31
3.8 Hodnocení výsledků hemokultivace	32
4 Výsledky	33
4.1 Mikrobiální spektrum	33
4.2 Procento pozitivit	38
5 Diskuze	41
6 Závěr	43
7 Seznam použité literatury	44
8 Seznam tabulek a obrázků	52
Příloha	53
Seznam zkratk	58

Úvod

Vyšetření hemokultur je v dnešní době nezastupitelnou metodou v klinických mikrobiologických laboratořích. Je to aktuální téma, jímž se bude bakalářská práce hlouběji zabývat. Metoda hemokultivace slouží k průkazu mikroorganismů v krevním oběhu. Tyto mikroorganismy vyvolávají bakteriémii a následnou infekci krevního řečiště, která může být doprovázena lokalizovaným infekčním onemocněním. Ve vážnějších případech dochází k rozvoji sepse, již definujeme jako život ohrožující selhání orgánů způsobené neadekvátní odpovědí organismu na infekci. Několikrát došlo ke změně definice sepse, jelikož je stále snaha o dostatečné porozumění a prozkoumání jejích mechanismů a patofyziologie. Jako infekční agens se uplatňují zvláště bakterie, v menším měřítku také viry, paraziti a houby. Vyplavení bakterií do krevního oběhu je provázeno vzestupem teploty, zimnicí a třesavkou. Nejčastěji je metoda hemokultivace spojená s diagnózou urosepse, pneumonie, katérové sepse, spondylodiscitidy a endokarditidy.

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

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

1 Teoretická část

1.1 Bakteriémie

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

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

1.2 Infekce krevního řečiště

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

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

1.3 SIRS

Syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) je akutní zánětlivá reakce, která vzniká jako obranný mechanismus a může být vyvolána infekcí, hypovolemií, hemoragií nebo traumatem. Zasahuje celý organismus intenzivní a nevyváženou imunitní odpovědí. Podstatou je eliminovat agens a reparovat poškozené tkáně. Dochází k selhání systému, který reguluje imunitní odpověď a z obranné činnosti imunitních mechanismů se stává autoagresivní deregulovaný proces. Následkem je poškození i původně zdravé tkáně a funkcí orgánů, které nemusely být zasaženy původní noxou. U hypersenzitivních

jedinců může dojít k rozvoji SIRS i po působení malého podnětu. Pro potvrzení diagnózy SIRS je nutné splnit dvě ze čtyř níže uvedených kritérií. (Bartůněk et al., 2016)

Kritéria SIRS (Matějovič, 2017):

- Tělesná teplota $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Srdeční frekvence $> 90/\text{min}$,
- Dechová frekvence $> 20/\text{min}$ nebo $\text{pCO}_2 < 32\text{ mm Hg}$ (4,3 kPa),
- Leukocytóza $> 12\ 000/\mu\text{l}$ nebo leukopenie $< 4\ 000/\mu\text{l}$

1.4 Sepse

Systémová zánětlivá reakce organismu navozená diseminovanou infekcí nebo těžkou lokalizovanou infekcí provázena přítomností mikroorganismů v krevním oběhu se nazývá seps. Za diseminovanou považujeme infekci rozšířenou do mnoha lokalit v těle. Tuto skutečnost může způsobit deficit některé složky imunitního systému, protože imunitní mechanismy mají za normálních okolností tendenci ohraničit infekci, nebo nepříznivá shoda okolností, při které dojde k proniknutí infekce do dalších míst. Tento stav je život ohrožující a dochází k němu, když odpověď organismu na infekci poškozují vlastní tkáně a orgány. Seps vede k šokovému stavu, selhání orgánů a smrti, pokud není včas rozpoznána a okamžitě léčena (Rozsypal, 2015; Ward a Levy, 2017).

1.4.1 Etiologie

Jakékoliv infekční agens, které pronikne do krevního řečiště a vyvolá systémovou imunitní odpověď, může způsobit rozvoj seps. Nicméně klinické symptomy se mohou objevit i bez přítomnosti patogenu v krvi. Většina případů seps je zapříčiněna bakteriemi a houbami. V rozvinutých zemích jsou viry a paraziti jen výjimečně etiologickými agens. Přesnější vyhodnocení etiologie seps je komplikované, protože téměř ve třetině případů není zjištěn původce navzdory použití všech dostupných mikrobiologických technik. Co se týče bakteriálních původců, za poslední desetiletí se změnil výskyt určitých patogenů. V roce 1980 v USA byly hlavním zdrojem seps gramnegativní bakterie, avšak v roce 2000 52,1 % bakterií zastávaly grampozitivní koky. Také jsou pozorované změny ve zdrojích infekce. Před rokem 1990 se

zaměřovalo nejvíce na břicho. V posledním desetiletí se staly nejdůležitějším zdrojem plíce a jsou zodpovědné přibližně za 50 % případů sepse. (Herwald a Eggesten, 2011).

1.4.2 Patofyziologie

Sepse je charakterizována na jedné straně abnormálně vysokou neregulovanou aktivitou zánětu. Na druhém pólu je utlumení obranné reakce, až imunitní paralýza (Krejsek et al., 2016, s. 179). Normální imunitní odpověď na patogenní podněty vede k aktivaci obranných mechanismů hostitele, aby nedošlo ke kolonizaci hostitelského organismu mikroby. Hostitelské molekuly a cizí produkty infekce konvergují na základě molekulárních mechanismů, což způsobí nekontrolovanou aktivaci vrozených imunitních mechanismů. Tento proces zahrnuje buněčnou aktivaci, vazodilataci, rekrutování leukocytů a zvýšenou endoteliální propustnost. Cizí a endogenní molekuly interagují s receptory rozpoznávajícími patogeny, které jsou exprimovány na buňkách imunitního systému. Aktivace těchto receptorů kulminuje uvolněním mediátorů, jež vytvářejí klinické příznaky sepse (Ward a Levy, 2017). Současně existují mechanismy zpětné vazby, jež zabraňují nadměrné aktivaci imunitní odpovědi hostitele a zajišťují návrat homeostázy. Porucha v imunitní regulaci může vést k přehnané odpovědi imunitního systému. Výsledkem je trvalý prozánětlivý stav, který vyústí v poškození tkáně a orgánů. V důsledku imunitní dysfunkce může také dojít k rozvoji trvalého protizánětlivého stavu, což vede k anergii a imunosupresi (Okeke a Uzonna, 2016).

1.4.3 Septický šok

Septický šok charakterizujeme jako sepsi provázenou oběhovými, buněčnými a metabolickými změnami, jež jsou spojeny s vyšším rizikem smrti než samotná sepe. Charakteristická je přítomnost perzistující hypotenze. K udržení dostatečného středního arteriálního tlaku alespoň 65 mm Hg se podávají vazopresory. Dále pozorujeme zvýšené hodnoty laktátu v séru > 2 mmol/l. Díky těmto kritériím dosahuje úmrtnost v nemocnicích více než 40 % (Shankar-Hari, 2016).

1.4.4 MODS

Syndrom multiorgánové dysfunkce je stav, kdy dochází k alteraci funkce dvou a více životně důležitých orgánů u těžce nemocného pacienta a je nutná náhrada nebo podpora těchto funkcí k udržení homeostázy organismu. Syndrom je klasifikován jako primární a sekundární. V případě primárního MODS je porucha způsobená přímým poškozením

tkáně (trauma, pankreatitida, popáleniny, rozsáhlé operace). Za rozvojem sekundárního MODS stojí septický šok doprovázený hypoperfuzí orgánů (Čermák, 2008; Bartůněk et al., 2016).

1.5 Nejčastější původci infekcí krevního řečiště

1.5.1 Ambulantní pacienti

U ambulantních pacientů se předpokládá vznik infekce z plného zdraví, kdy se bakterie dostanou do oběhu z neobjeveného ložiska nebo rezidentní mikrobiální flóry. Jako původci uplatňují *Escherichia coli* a další bakterie z čeledi Enterobacteriaceae, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, betahemolytické streptokoky, *Neisseria meningitidis*. Pro těhotné ženy je nebezpečná *Listeria monocytogenes*, která může způsobit postižení plodu až septický potrat. Aspleničtí pacienti mají predispozice pro infekci opouzdřenými *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Neisseria meningitidis*. U pacientů s endokarditidou se uplatňují koaguláza negativní stafylokoky, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium species* (Scharfen, 2013).

1.5.2 Nemocniční pacienti

Nemocniční pacienti jsou skupina osob, u kterých je bakteriémie způsobena buď přímo průnikem bakterií do krevního oběhu, nebo snížením obranyschopnosti organismu. Objevuje se v důsledku prováděných invazivních zákroků, imunosupresivní a antibiotické léčby nebo umělé ventilace. Původci se liší podle délky hospitalizace a typu pacientů. Obvyklými izoláty jsou koaguláza negativní stafylokoky (možná kontaminace), *Escherichia coli* a jiné bakterie čeledi Enterobacteriaceae, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, enterokoky, kvasinky, anaerobní mikroorganismy a v neposlední řadě *Burkholderia cepacia* komplex (Scharfen, 2013). Původci nozokomiální pneumonie jsou často kmeny *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* nebo meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), u kterého je nebezpečné nosičství. Nejčastější infekční agens uroinfekce jsou *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* a enterokoky. Katérové infekce vyvolávají především *Staphylococcus species* a intraabdominální infekce anaerobní bakterie, enterobakterie nebo enterokoky (Průcha et al., 2015).

1.5.3 Novorozenci a děti

Etiologie infekcí krevního řečiště u dětí prošla za poslední roky změnou. Díky očkování se snížil počet infekcí, které vyvolával *Haemophilus influenzae b*. Výskyt nozokomiálních infekcí vzrostl. Nejčastějšími původci jsou *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. U 2 % novorozenců se může rozvinout takzvaná časná novorozenecká sepe, jež se objeví do tří dnů po porodu nebo nozokomiální, způsobená rezistentními nemocničnými kmeny. Jako etiologická agens se uplatňují *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* (Muntau, 2009; Scharfen, 2013)

1.5.4 Imunokompromitovaní pacienti

Do této skupiny patří pacienti s autoimunitním onemocněním, imunosupresivní léčbou, AIDS, po transplantaci kostní dřeně nebo orgánů, onkologičtí pacienti. U osob s imunodeficiencí, ať už vrozenou či získanou, je sepe hlavní příčinou úmrtí. V důsledku imunosuprese dochází k poruše buněčné imunity, fagocytózy, komplementu a tvorby protilátek, což zvyšuje riziko infekce. Nejčastěji se uplatňují bakterie přirozené mikroflóry, které se u imunokompetentních jedinců diagnostikují jako kontaminanty - koaguláza negativní stafylokoky, enterokoky, viridující streptokoky. V souvislosti se zvýšenou spotřebou antibiotik a používáním centrálních žilních katétrů se uplatňují nefermentující gramnegativní bakterie, *Listeria monocytogenes*, korynebakteria, kandidy, nokardie a viry (Scharfen, 2013).

1.5.5 Enterobakterie

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

1.5.5.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli je nejznámějším zástupcem z rodu *Escherichia*. Osidluje tlusté střevo, kde je součástí běžné mikroflóry. Pokud se dostane mimo střevo, způsobuje infekce močových cest, infekce ran a septická onemocnění, kdy dochází k poškození hepatocytů provázené ikterem. V zaživacím traktu vyvolávají určité kmeny infekce provázené průjmy (Bednář et al., 1996; Ehrmann et al., 2014). Kmeny se rozdělují podle projevů virulence na enteropatogenní, enterotoxické, enteroinvazivní a enterohemoragické (Schindler, 2014):

1.5.5.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae je nejběžnější bakterie z rodu *Klebsiella*. Má polysacharidové pouzdro, které je hlavním faktorem virulence. Od escherichií se odlišuje pozitivním PYR-testem. Roste v bílých hlenovitých koloniích. Je podmíněně patogenní a druhým nejčastějším původcem infekce močových cest (Votava et al., 2003). Dále se také uplatňuje při gastroenteritidách, meningitidách u novorozenců a nozokomiálních sepsích. Disponuje přirozenou rezistencí k ampicilinu (Schindler, 2014).

1.5.5.3 *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis je mikroblem běžné vyskytující se v klinických vzorcích a může způsobit celou řadu komunitních nebo nemocničních onemocnění. Nejčastěji infekce močových cest včetně cystitidy a pyelonefritidy. Pokud se bakterie dostanou do krevního oběhu, způsobí bakteriémii, která se může rozvinout až v život ohrožující urosepsi. Hojně je nalezneme v půdě a vodě a také jako součást střevní mikroflóry. Na povrchu bakterii jsou přítomny bičíky, které umožňují pohyb. Rostou plazivým růstem, čemuž se říká „Raussův fenomén“. Mají tendenci překrýt další patogeny na kultivační půdě. Faktorem virulence je vysoká ureázová aktivita. *Proteus* také hydrolyzuje močovinu na amoniak, tím alkalizuje moč a mohou vznikat močové kameny. Podobně jako jiné gramnegativní bakterie produkuje endotoxin do krevního oběhu, což spustí další zánětlivé reakce hostitele, které mohou v konečném důsledku vést k sepsi nebo SIRS, závažnému stavu s 20 % až 50 % úmrtností (Schaffer a Pearson, 2015; Foris a Snowden, 2019).

1.5.6 Pyogenní koky

1.5.6.1 *Streptococcus pyogenes*

Patří mezi beta-hemolytické streptokoky serologické skupiny A podle Lancefieldové. Je to fakultativně anaerobní grampozitivní kok primárně patogenní pro člověka. Roste na krevním agaru obohaceném beraní krví v drobných bílých koloniích. Hlavním faktorem virulence je M protein, díky kterému bakterie aheruje bakterie na povrch sliznice a je chráněna před fagocytózou. Dalšími faktory virulence jsou streptolysin O a streptolysin S (toxické pro leukocyty, monocyty a fagocyty), pouzdro tvořené kyselinou hyaluronovou, enzymy streptokinasa a enolasa a v neposlední řadě streptokokové pyrogenní exotoxiny. *S. pyogenes* způsobuje nejčastěji akutní tonzilitidu a dále spálu, impetigo a erysepel. Pokud není infekce léčena, může dojít k rozvoji revmatické horečky a glomerulonefritidy. K léčbě se používá penicilin, erytromycin nebo tetracyklin (Bednář et al., 1996; Votava et al., 2003)

1.5.6.2 *Streptococcus agalactiae*

Druhý zástupce beta-hemolytických streptokoků skupiny B dle Lancefieldové. Může být přítomen u žen na poševní sliznici bez příznaků onemocnění. U těhotných žen je nebezpečí nakažení novorozence při porodu sepsí nebo meningitidou nebo pneumonií. Prognóza není příliš příznivá. U dospělých se infekce objevuje při poruše imunity. *S. agalactiae* je citlivý k penicilinu, ampicilinu a rezistentní na bacitracin. Diagnostika se provádí pomocí CAMP testu. U streptokoků skupiny B se vytvoří na krevním agaru hemolýza (Bednář et al., 1996; Votava et al., 2003).

1.5.6.3 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae neboli pneumokok je grampozitivní diplokok charakteristický svým lancetovitým tvarem. Může tvořit polysacharidové pouzdro v M fázi, kterým se obklopí a chrání před fagocytózou, tudíž je virulentní. Je známo asi 90 různých sérotypů lišících se pouzderným antigenem. Od ostatních pyogenních streptokoků se odlišuje absencí polysacharidu C ve stěně. Diagnostickým znakem je rozpustnost kolonií ve žluči a citlivost k optochinu na rozdíl od viridujících streptokoků. Pneumokoky jsou původci závažných onemocnění, jako je meningitida, pneumonie a sepse. Rovněž vyvolávají neinvazivní onemocnění horních cest dýchacích, zejména otitis media acuta, sinusitidu a konjunktivitidu. Riziková skupina osob jsou děti do 4 let, staří lidé

a imunokompromitovaní pacienti. Jako lék se podávají makrolidy kvůli rezistenci k penicilinům. Prevencí je očkování multivalentní vakcínou (Žemličková, 2012; Schindler, 2014).

1.5.6.4 Staphylococcus aureus

S. aureus je grampozitivní, nesporulující, koaguláza-pozitivní kok s uspořádáním do shluků. Kolonie mají smetanově bílý nebo béžový pigment. Produkuje enzym koaguláza, který má schopnost přeměňovat fibrinogen na fibrin a tím koagulovat plazmu. Na překonání obranných mechanismů hostitele mají zásluhu různé faktory virulence. Povrchové faktory, extracelulární faktory a stafylokokové (Arbuthnott, 1999).

Charakteristickým rysem infekcí je vznik abscesů, neboli ohraničených zánětlivých ložisek, kterým se říká pyodermie. Dochází k zanesení bakterií do rán, popálenin nebo cizího tělesa (katétr). Zdrojem onemocnění mohou být asymptomatictí nosiči, u kterých kolonizuje kůži, peritoneum a nosní sliznici. V lidské populaci je 30-40 % zdravých nosičů a může se jednat také o autoinfekci (Arbuthnott, 1999). Po průniku stafylokoků z infikovaného primárního ložiska nebo žilního katétru do krevního oběhu vzniká bakteriémie. Jednou z nejzávažnějších komplikací infekce krevního řečiště je diseminace bakterií do orgánů a kostí, což způsobuje endokarditidu nebo hnisavou artritidu. Methicilin rezistentní *S. aureus* (MRSA) představuje problém zejména v nemocničním prostředí. Nemocniční kmeny MRSA nejsou dostatečně citlivé na antibiotika (Von Eiff, 2001; Bergin et al., 2015).

1.5.6.5. Staphylococcus epidermidis

S. epidermidis je nejčastěji se vyskytující koaguláza-negativní stafylokok. Vyskytuje se na sliznicích a kůži jako součást přirozené mikroflóry. Kolonizuje převážně axily, kůži obličeje, končetiny a sliznici nosohltanu. Dříve byl považován za neškodný komenzální mikroorganismus na kůži, avšak v současné době je to významný oportunní patogen a nejběžnější nozokomiální zdroj infekce (Otto, 2009). V případě hemokultur je nejčastějším izolovaným mikroorganismem, ale je zde možnost kontaminace vzorku kmeny, které jsou součástí přirozeného mikrobiomu na kůži a sliznicích (Bednář et al., 1996). Při infekci dochází k rozvoji septikémie, endokarditidy, katetrové sepse, infekce ran nebo kloubních protéz. Nejvíce jsou ohroženi narkomani užívající drogy

intravenózně, imunokompromitovaní jedinci a pacienti s implantáty, např. katetry, umělé chlopně, kloubní náhrady nebo kardiostimulátory (Votava et al., 2003).

1.5.6.6 Enterokoky

Bakterie z rodu *Enterococcus* jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní koky, které tvoří drobné shluky nebo krátké řetízky a kultivace je nenáročná. Obvykle osidlují zažívací trakt lidí i zvířat a jsou podmíněnými patogeny. Vyvolávají nozokomiální infekce močových cest, operačních ran a krevního řečiště. Infekce se dělí na exogenní a endogenní. Exogenní se šíří kontaminovanými rukama zdravotníků nebo pomůckami. Endogenní způsobuje průnik bakterií do krevního oběhu a orgánů. Nejběžnějšími zástupci jsou *E. faecalis* a *E. faecium*. Řadí se do skupiny D podle přítomnosti polysacharidu C ve stěně. V posledních letech se objevují infekce vankomycin-rezistentními enterokoky jako následek nadužívání širokospektrých antimikrobiálních přípravků, které narušují přirozenou střevní mikroflóru. Prevencí je uvážlivé podávání antibiotik a cefalosporinů, k nimž jsou primárně rezistentní (Vágnerová a Kolář, 2003; Fisher a Phillips, 2009).

1.5.6.7 Neisserie

Rod *Neisseria* zahrnuje aerobní, případně mikroaerofilní gramnegativní diplokoky. V mikroskopu můžeme pozorovat specifický tvar kávového zrna. K patogenním druhům se řadí *N. gonorrhoeae* a *N. meningitidis*. Další skupinou jsou ústní neisserie, které se podílí na složení biofilmu v dutině ústní a nosohltanu. Disponují nízkou patogenitou, ale mimo ústní dutinu mohou způsobit infekci u oslabených jedinců. Kultivace u patogenních kmenů je náročná, vyžadují zvýšenou tenzi oxidu uhličitého a vlhké prostředí (Votava et al., 2003). *N. gonorrhoeae* zvaná gonokok je původcem klasického pohlavního onemocnění kapavky. Neléčená infekce vede ke komplikacím, jako jsou peritonitida, endokarditida, meningitida, záněty velkých kloubů a sepse. (Zimová a Zíma, 2013).

N. meningitidis též meningokok je morfologicky stejný jako gonokok. Podle přítomnosti polysacharidového kapsulárního antigenu se dělí do více než 13 sérologických skupin, z nichž nejvýznamnější jsou A, B, C, W 135, Y a Z. Vyskytují se také nekapsulární antigeny (Rouphael a Stephens, 2012). Meningokok je přirozeným patogenem pro člověka. Šíří se jako kapénková infekce nebo přímým kontaktem

nejčastěji s bezpříznakovým nosičem (asi 10 % populace). Nebezpečné jsou invazivní infekce u mladistvých s fatálním průběhem, mezi které patří sepse a meningitida. Prevencí je očkování konjugovanou vakcínou (Votava et al., 2003).

1.5.7 Grampozitivní tyčky

1.5.7.1 Korynebakteria

Zástupci z rodu *Corynebacterium* jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, nepohyblivé tyčinky s kyjovitým tvarem. Obsahují metachromatická granula, která slouží jako zásobárna energie. Rozlišujeme kmeny saprofytické, podmíněně patogenní a primárně patogenní (Schindler, 2014).

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

C. diphtheriae je lidský patogen a v případě, že produkuje difterický toxin, vyvolává onemocnění záškrť. Nekrotizující zánět postihuje hrtan, nosní dutinu, kůži, myokard, játra nebo ledviny. Je nutné rychle podat antitoxické sérum již při podezření na toto onemocnění. Prevencí je očkování difterickým toxoidem, které vedlo k omezení jeho výskytu (Votava et al., 2003; Schindler, 2014).

1.5.7.2 Listeria monocytogenes

L. monocytogenes je významný patogen pro člověka. Množí se při nízkých teplotách (v chladničce) a vyšších koncentracích soli, obzvláště v mléčných a masných výrobcích. V cytoplazmatické membráně se nacházejí virulentní proteiny, díky nimž bakterie proniknou do hostitelských buněk, kde přežívají a šíří se do dalších buněk, případně do krevního řečiště. Způsobuje alimentární onemocnění zvané listerióza. U zdravého dospělého jedince může infekce probíhat inaparentně. Vnímavými jedinci jsou novorozenci, těhotné ženy, starší osoby, imunokompromitovaní a aspleničtí pacienti. Nejzávažnější je infekce pro těhotné ženy, může dojít k potratu nebo se u plodu rozvine granulomatosi infantiseptica. Pozdní infekce se u novorozenců manifestují jako meningitida či sepse. Vzhledem k tomu, že jsou listerie primárně rezistentní na

cefalosporinová antibiotika, k léčbě se používá ampicilin (Votava et al., 2003; Blažková et al., 2005).

1.5.8 Gramnegativní tyčky

1.5.8.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je aerobní bakterie, kterou nalezneme v půdě, odpadních vodách nebo také ve stolici zvířat a lidí. Na základních půdách roste v koloniích s kovovým leskem. Většina kmenů produkuje modrozelený pigment pyocyanin a žlutozelený fluorescein. Pseudomonády se často uplatňují jako zdroj nozokomiálních nákaz, kontaminují např. katétrů nebo dýchací přístroje. Může dojít až k rozvoji systémového onemocnění. Nejzávažnější jsou infekce popálenin, oka a novorozenecké sepse. U zdravého jedince někdy pouze kolonizuje sliznice bez známek infekce (Bednář, 1996). V nemocničním prostředí představují pseudomonády hlavní příčinu bakteriémie a jimi způsobená infekce krevního řečiště je velmi závažné onemocnění. Nejčastěji se vyskytuje zdroj infekce v dýchacím a močovém traktu a dále v centrálním žilním katéttru, na kůži a měkkých tkáních. (Bassetti et al., 2018).

1.5.8.2 *Burkholderia cepacia* komplex

Bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* je soubor geneticky odlišných, ale fenotypově podobných bakterií, které jsou rozděleny do devíti druhů. Můžeme je nalézt v půdě, ve vodě a přežívají ve vlhkém prostředí. Jsou významnými oportunními patogeny převážně v nemocničním prostředí, jež mohou vyvolat u pacientů s cystickou fibrózou těžké plicní infekce, nekrotizující pneumonii, septikémii až závažný a život ohrožující cepacia syndrom. U této skupiny osob se nejvíce uplatňují druhy *B. cenocepacia* a *B. multivorans*. Také jsou příčinou infekcí u pacientů s poruchou imunitního systému a chronickým granulomatózním onemocněním (Mahenthiralingam, et al. 2005).

1.5.8.3 *Haemophilus influenzae*

Dalším patogenním mikroorganismem ze skupiny gramnegativních bakterií je *H. influenzae*. Drobné, nepohyblivé, pleomorfní tyčinky, které dobře rostou na čokoládovém agarů v prostředí s 5-10 % CO₂. K růstu vyžadují růstový faktor X a V. U některých osob můžeme nalézt na sliznici nosohltanu zejména neopouzdřené kmeny a to bez známek infekce. Podle kapsulárního antigenu se rozdělují na 6 sérotypů a-f.

Nejvirulentnější je typ b, který vyvolává hnisavou meningitidu u dětí do 2 let a akutní epiglottitidu u dětí od 2 do 5 let. Bakterie se dostávají z nosohltanu skrz epiteliální buňky, lymfou a krví do oblasti CNS (centrální nervová soustava). Pouzdro umožňuje hemofilům překonat obranné imunitní reakce jedince. Ostatní sérotypy vyvolávají lokalizované infekce dýchacího traktu, otitis media nebo hnisavou konjunktivitidu. Neopouzdřené kmeny způsobují hlavně exacerbace chronického onemocnění dýchacího traktu a středouší převážně u dospělých. Prevencí je povinné očkování jako součást hexavakcíny (Howard, 1999).

1.5.9 Anaerobní bakterie

1.5.9.1 Rod Bacteroides

Rod *Bacteroides* zahrnuje anaerobní gramnegativní pleomorfní tyčky, které jsou, podobně jako ostatní anaeroby, oportunně patogenní a mohou vyvolat různé infekce v celém těle. Infekce vznikají endogenně, když poškození sliznic umožní bakteriím přirozené flóry proniknout skrz tkáň. Krevním řečištěm může dojít k přenosu mikrobů do jakéhokoliv orgánu. Bakteroidy produkují několik exoenzymů, včetně kolagenázy a některých proteináz. Tyto enzymy pravděpodobně pomáhají bakteriím v invazi do hostitelské tkáň po počátečním traumatu. Nejdůležitějším členem rodu je *B. fragilis*, který je spojený s vážnými infekcemi dutiny břišní, dutiny ústní, krevního řečiště a malé pánve. Často se vyskytuje v koinfekcích s fakultativními anaeroby (Groman, 2009). Je rezistentní k solím žlučových kyselin, penicilinu a také může tvorbou beta-laktamázy rušit účinek beta-laktamových antibiotik (Votava et al., 2003).

1.5.9.2 Rod Fusobacterium

Zástupci z rodu *Fusobacterium* jsou anaerobní gramnegativní bakterie podobné vláknům se zašpičatělými konci. Objevují se jako součást normální flóry v gastrointestinálním traktu, dýchacích cestách a ve vagině. *F. nucleatum* a *F. necrophorum* jsou nejvirulentnější kmeny, které způsobují většinu invazivních infekcí (Broadley a Schweon, 2017). Lemierův syndrom je život ohrožující stav charakterizovaný předcházející orofaryngeální infekcí, diseminovanou infekcí nebo septickými emboliemi a bakteriemií, která je prokázána pozitivitou krevních kultur (Cheung a Bellas, 2007). Fusobakterie dále vyvolávají plicní, mozkové a jaterní

abscesy, nekrotizující pneumonie, chronické sinusitidy, septické artritidy nebo intraabdominální infekce (Votava et al., 2003).

1.5.10. Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotní mikroorganismy z říše hub. Patří mezi mikromycety. V cytoplazmatické membráně mají ergosterol a tím se liší od živočišných buněk, které obsahují cholesterol. V buněčné stěně nalezneme chitin, chitosan, mannany a glukany. Morfologicky se jedná o kulaté nebo oválné buňky, označované jako blastokonidie. Rozmnožují se většinou asexuálně, tzv. pučením. Nejvýznamnějšími rody kvasinek jsou *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Malassezia*, *Blastoschizomyces* a *Trichosporon* (Votava et al., 2003)

1.5.10.1 Rod *Candida*

Kandidy vytvářejí podobu typicky oválných blastokonidií, jež představují saprofytické stadium. Druhá forma jsou pseudomycélie, která prezentují parazitické stadium. *Candida albicans* je potenciální patogen a má schopnost tvořit zárodečné klíčky, tzv. germinace. Z těchto klíčků mohou vznikat pravé hyfy. Je nejčastějším původcem povrchových a systémových kandidóz endogenního původu. Další patogenní zástupci jsou, např. *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* a *C. krusei*. Uplatňují se často při vzniku nozokomiálních nákaz (Bednář et al., 1996). Infekce krevního řečiště způsobené kandidami jsou významnou příčinou komplikací a mortality u hospitalizovaných pacientů. Možné rizikové faktory jsou terapie antibiotiky, chemoterapie, intravaskulární katétr, chirurgický zákrok, parenterální výživa nebo předchozí kolonizace plísněmi (Shivaprakasha et. al, 2007). Růstově jsou kandidy nenáročné, ke kultivaci se používá Sabouraudův agar s glukózou nebo maltózou. (Zhao et al., 2016).

1.6 Mikrobiologické vyšetření hemokultur

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

1.6.1 Odběr a transport hemokultur

Důležitým krokem ve vyšetření hemokultur je řádné označení hemokultivační lahvičky nejlépe před samotným odběrem. Na lahvičky se uvádí jméno pacienta, rodné číslo, tělesná teplota před odběrem, oddělení, číslo, datum a čas odběru. Vzorky se odebírají před podáním antibiotik, při vzestupu teploty nebo třesavky. U infekční endokarditidy se odebírá více vzorků v krátkém časovém odstupu. U dětí postačuje jeden odběr do pediatrické lahvičky a při podezření na nekrotizující enterokolitidu se inokuluje také anaerobní lahvička. Před odběrem je nutné místo vpichu vydezinfikovat a nechat zaschnout. Krev se odebírá z periferní žíly a provádí se stěr z místa vpichu, kvůli vyloučení kontaminace. Odběr z katétru je možný pouze v krajních případech nebo při suspektní katéetrové sepsi. U dospělých je objem nesrážlivé krve 8-10 ml na lahvičku a u dětí 1-3 ml. Zátka na lahvičce se dezinfikuje alkoholem a nechá zaschnout. Není vhodné používat k dezinfekci přípravky s jódem, protože poškozují gumové septum lahvičky. Vzorek se rozdělí do lahviček na aerobní a anaerobní kultivaci. Nejprve se krev vstříkne do anaerobní lahvičky tak, aby se do ní nedostal vzduch. Pokud se vyšetřuje septická epizoda, provádí se dva odběry během 24 hodin.

Lahvičky se uchovávají max. 24 hodin při pokojové teplotě. Nikdy se nedávají do lednice. Ideálně by měly být neprodleně doručeny do laboratoře a vloženy do hemokultivačního systému (Scharfen, 2013; Laboratorní příručka oddělení klinické mikrobiologie, 2018).

1.6.2 Manuální hemokultivační systémy

Konvenční manuální systémy a média jsou k dispozici z mnoha komerčních zdrojů. Nicméně laboratoře mohou vyrábět také vlastní kultivační lahvičky v závislosti na svých zdrojích. Zpravidla obsahují 50-100 ml pomnožovacího bujónu, který je doplněn 0,025-0,05% polyanethol sulfonátem sodným (SPS). Lahvičky se inokulují krví a inkubují obvykle 7 dní. Každá lahvička se denně kontroluje pro makroskopické zachycení mikrobiálního růstu, jako je hemolýza, zákal média, produkce plynu nebo formace kolonií. Po první inkubaci aerobní lahvičky přes noc se provede subkultivace a udělá se preparát podle Grama. Konečná subkultivace se provádí na konci inkubace. Manuální systémy jsou flexibilní a poměrně levné, ale jsou náročnější na pracovní sílu. Dvoufázové systémy kultivace a Oxoid Signal systém jsou varianty, které šetří potřebu pracovní síly (Weinstein, 1996; Rohner a Auckenthaler, 1999).

1.6.2.1 Dvoufázová hemokultura

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

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

1.6.2.2 Oxoid Signal systém

Hemokultivační systém Oxoid Signal pracuje s jednou lahvičkou, která obsahuje speciální médium podporující růst aerobních, anaerobních i mikroaerofilních mikroorganismů. V médiu je obsaženo SPS pro svou schopnost srážení krve a inaktivovat některá antibiotika. SPS může působit inhibičně na některé kmeny *Peptostreptococcus anaerobis*, *N. meningitidis* a *N. gonorrhoeae*. Inhibici neutralizuje želatina přidaná do média. Po vstříknutí vzorku krve se na lahvičku pomocí jehly připevní nástavec indikátoru růstu. Během kultivace v termostatu mikroby produkují plyn a v lahvičce vzniká přetlak, ten vytlačí část média do komůrky nástavce a tím značí pozitivní výsledek (Hutchinson et al., 1992; Blood Culture, c2001-2019).

1.6.3 Automatizované hemokultivační systémy

Automatizace hemokultivačních systémů vedla ke spolehlivější detekci pozitivních kultur, jejich rychlejší identifikaci a snížení míry kontaminace. Detekce zvýšené koncentrace CO₂ v důsledku mikrobiálního růstu je široce využívaná různými technikami. První přístroje zavedené na počátku 70. let byly otevřené radiometrické systémy BACTEC 225, 301 a 460, které detekovaly radioaktivní CO₂ pomocí jehly, jež odebrala vzorek plynu z lahvičky. Nevýhodou bylo právě používání radioaktivních činidel. S vývojem infračervené spektrofotometrické detekce CO₂ byla v 80. letech představena nová generace přístrojů BACTEC 660, 730 a 860 s tou výhodou, že nevyžadují radioaktivní činidla. Nevýhodou u těchto systémů je pomalá detekce a riziko kontaminace. Přístroj BioArgos také využíval infračervenou spektrofotometrickou detekci, ale CO₂ se měřil skrz sklo lahvičky. Tato neinvazivní procedura eliminovala nevýhody otevřených systémů. Nelze však považovat za kontinuálně měřící systém. Významným pokrokem bylo zavedení kontinuálně monitorujících hemokultivačních systémů, které mají nesporné výhody. Detekční, inkubační a třepací jednotka je integrovaná. Systém je uzavřený, takže nedochází ke kontaminaci. Lahvičky jsou nepřetržitě monitorovány a tím se zvyšuje rychlost detekce. Přístroje jsou oproti manuálním systémům dražší a náročnější na údržbu (Rohner a Auckenthaler, 1999; Čermák, 2008).

1.6.3.1 Systém BacT/Alert

BacT/Alert (bioMérieux, Francie) je automatizovaný systém mikrobiální detekce založený na kolorimetrické detekci CO₂ produkovaného růstem mikroorganismů. Výsledky hodnocení detekčního systému ukazují, že spolehlivě odhalí širokou škálu bakterií a hub. Kultivační lahvičky aerobní i anaerobní obsahují 40 ml média a pojmu až 10 ml vzorku krve, s výjimkou pediatrických lahviček. Dostupné jsou také speciální lahvičky na kultivaci mykobakterií. Na dně lahvičky je připevněný CO₂ senzor a oddělený od kultivační půdy membránou propustnou pro CO₂. Ten difunduje do senzoru, snižuje pH a mění jeho barvu. (Thorpe et al., 1990; Čermák, 2008). Nevýhodou systému BacT/Alert je, že aerobní lahvičky musí být před vložením do přístroje ventilovány a to může mít za následek vyšší míru kontaminace (Rohner a Auckenthaler, 1999).

1.6.3.2 Systém BACTEC

Dalším široce využívaným hemokultivačním systémem je BACTEC (Beckton-Dickinson, USA). Na rozdíl od systému Bact/Alert k detekci růstu mikroorganismů v lahvičkách využívá fluorescenční technologii. Mikroorganismy metabolizují živiny v kultivačním médiu a uvolňují oxid uhličitý. Barvivo v senzoru na dně lahvičky reaguje s CO₂, tím dochází k modulaci množství světla, které je absorbováno fluorescenčním materiálem ve snímači. Fotodioda na přístroji měří úroveň fluorescence, jež odpovídá množství uvolněného CO₂. Fluorescence klesá, pokud roste koncentrace CO₂ a klesá pH. Měření je poté interpretováno systémem podle předem naprogramovaných algoritmů positivity. Doporučená teplota inkubace vzorků je 35-37 °C. Doba kultivace lze nastavit podle typu hemokultivační lahvičky, většinou trvá 5-7 dní. U infekční endokarditidy, pneumonie nebo horečky nejasného původu lze dobu prodloužit na 10 dní. (Čermák, 2008; Lamy et al., 2016).

1.6.4 Mikroskopie a kultivace

Z pozitivní lahvičky se provádí mikroskopické a kultivační vyšetření. Po promíchání obsahu se zátka vydezinfikuje a jehlou se odebere několik kapek vzorku. Na sklíčko se udělá tenký nátěr a obarví podle Grama (Scharfen, 2013). Mikroskopie je důležitým a nejrychlejším krokem k identifikaci bakteriálního původce infekce. Gramovo barvení rozdělí bakterie na grampozitivní a gramnegativní podle složení buněčné stěny. Obarvený preparát nám dá také informaci o velikost, tvaru a uspořádání buněk (Greenwood et al., 1999).

Několik kapek vzorku se také inokuluje na kultivační půdy a sterilní kličkou se izolát rozočkuje. Po získání čisté kultury se provádí dourčování konkrétního bakteriálního kmene. Jako základní kultivační média se používají krevní agar, Endova půda, A agar a SCS agar pro anaeroby. Při nálezů gramnegativních tyčinek se přidá čokoládový agar, AZ agar, SNVS agar a THB bujón, který se přeočkuje na H agar. V případě podezření na kvasinky a plísně je vhodný Sabouraudův agar. Pokud je mikroskopie negativní, kultivuje se na krevní agar, Endo agar a SCS agar. Kultivace půd probíhá v termostatu za vhodných podmínek. Tabulka č. 1 znázorňuje růst mikroorganismů na vybraných kultivačních médiích (Scharfen, 2013). Kultivace je sice pomalejší diagnostický postup, avšak velmi důležitý a nezastupitelný díky možnosti dále pracovat s izolovaným kmenem (Votava, 2005)

1.6.5 Identifikace

Mikrobiologické techniky, jako je kultivace buněk, barvení podle Grama a biochemické testy, jsou „zlatým standardem“ k určení patogenů způsobujících infekce krevního řečiště. Tyto techniky byly začleněny do automatizovaných systémů, díky čemuž je urychlen proces identifikace a předchází se kontaminaci. Biochemické metody, např. katalázové a koagulázové testy, rozlišují blízce příbuzné organismy podle jejich enzymatické aktivity (Chun et al., 2015). Všechny klinicky významné izoláty by měly být identifikovány do species (Scharfen, 2013). Nejmodernější metodou je identifikace mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie metodou MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight). Mikroorganismy jsou rozpoznávány pomocí získaných proteinových profilů, které přístroj porovnává s referenční databází (Sauget et al., 2017).

1.6.6 Vyšetření citlivosti

První vyšetření citlivosti na antibiotika se provádí hned po rozočkování krve na pevné půdy. Jsou to diskové difusní testy. Jako půda se používá Mueller-Hinton agar, na který se rozmístí disky s antibiotiky. Měří se zóny inhibice růstu, jež se tvoří okolo jednotlivých antibiotik podle citlivosti mikroba. Stanovuje se minimální inhibiční koncentrace (Votava, 2005). Definitivní citlivost se zjišťuje z čisté kultury. Další metody jsou kvantitativní diluční mikrometoda a Etest (Scharfen, 2013). Začátkem roku 2019 EUCAST zveřejnil doporučení pro rychlé vyšetření citlivosti s inokulem vyočkováním přímo z pozitivních lahvíček. Inkubace je zkrácená na 4, 6 a 8 hodin. Breakpointy jsou upraveny pro každý druh a čas odečítání (Urbášková, 2019).

2 Cíle práce

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

3 Metodika

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

3.1 Princip metodické části

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

3.2 Příprava vzorků

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

3.3 Hemokultivační lahvičky systému BACTEC

Aerobní kultivace

K aerobní kultivaci se používají lahvičky BACTEC Plus Aerobic/F, ve kterých je živná půda s výtažkem sójového kaseinu. Jsou určeny pro diagnostiku in vitro. Média jsou sycena CO₂. Chemické čidlo v lahvičkách detekuje zvýšení množství CO₂ vyprodukovaného růstem mikrobů. Doporučený objem vzorků je 8-10 ml. Pokud krev obsahuje antimikrobiální látky, může dojít k falešně negativnímu výsledku. Vysoký počet bílých krvinek naopak způsobí falešnou pozitivitu. Lahvičky se skladují na chladném a suchém místě mimo dosah přímého záření. Toto platí i pro anaerobní a pediatrické lahvičky (Příbalová informace BD BACTEC Plus Aerobic/F Culture Vials, 2015).

Anaerobní kultivace

Pro anaerobní kultivaci se využívají lahvičky BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F. Obohacená živná půda je předem redukována a obsahuje výtažek sójového kaseinu a CO₂. Stejně jako aerobní lahvička i tato obsahuje chemické čidlo, jež detekuje zvýšení množství CO₂ vytvořeného při metabolizaci substrátů. Objem vzorku krve je také 8-10 ml. Po přidání vzorku dojde hned k hemolýze krve a vznikne čokoládové až tmavé zbarvení. Anaerobní média jsou sycena CO₂ a N₂ (Příbalová informace BD BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F Culture Vials, 2016).

Kultivace pro pediatrii

Zejména u dětí a vzorků s objemem menším než 3 ml se používají lahvičky BACTEC Peds Plus/F pro kvalitativní kultivaci a průkaz aerobních mikroorganismů. Princip je stejný jako u předchozích lahviček, zaznamenává se zvýšení CO₂. Optimální objem krve ke kultivaci je 1-3 ml. Při odebrání menšího objemu než 0,5 ml může dojít k ovlivnění detekce náročných mikroorganismů, např. druhů *Haemophilus*, a je nutné použít vyživovací přídatek FOS (Fastidious Organism Supplement) značky BACTEC. (Příbalová informace BD BACTEC Peds Plus/F Culture Vials, 2016).

3.4 Zpracování vzorků

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

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

3.5 Vložení lahviček do přístroje

Přístroj BACTEC 9050 je starším typem automatického hemokultivačního přístroje s kapacitou 50 vzorků. Uvnitř je karusel, který se otáčí dokola, a tím jsou vzorky promíchávány. Před samotným vložením aerobní lahvičky do přístroje byly zapsány údaje o lahvičce do provozního deníku. V klasickém provozu je zapsán datum a čas vložení, jméno a příjmení pacienta, rodné číslo, zasilající oddělení, pořadové číslo hemokultury a u tohoto přístroje bylo důležité zapsat také pozici lahvičky v karuselu, který vykonává otáčivý pohyb. Po zastavení karuselu pomocí tlačítka na displeji přístroje byl načten barcode lahvičky a ta byla vložena do přístrojem určené pozice (viz Příloha č. 6). Pozitivita vzorků je hlášena zvukovým signálem.

U druhého novějšího přístroje BACTEC FX40 byl postup téměř stejný. Rozdílem bylo, že přístroj nemá otočný karusel, tudíž se nemusí zastavovat, je možné hned dveře otevřít a manipulovat s hemokulturami. Umožňuje kultivovat až 40 vzorků. Volné pozice pro vložení lahviček byly značeny zeleným signálem nad jednotlivými stanicemi (viz Příloha č. 7). Anaerobní a pediatrická lahvičky byly vloženy po naskenování kódu do volných pozic. Pozice v tomto případě nebylo nutné zapisovat, přístroj ví podle senzorů, kam byla lahvička umístěna. Pozitivita byla signalizována červeným světlem na dveřích přístroje a po otevření blikaly červeně stanice pozitivních hemokultur.

3.6 Pozitivní lahvičky

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

průnikem směsi krve a bujónu do průhledného růstového indikátoru nad úroveň nástavce (viz Příloha č. 9).

3.7 Zpracování pozitivních hemokultur

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

Barvení dle Grama:

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

Grampozitivní bakterie se zbarvily do modrofialové barvy. Díky silné vrstvě peptidoglykanu nedošlo k vymytí barevného komplexu violeti a jódu acetonem.

Gramnegativní bakterie měly růžovou barvu. Aceton vymyl barevný komplex a buňky byly obarveny až karbolfuchsinem.

3.8 Hodnocení výsledků hemokultivace

Mikroskopické preparáty a vykultivované půdy jsou prohlíženy lékařem nebo vysokoškolským pracovníkem, který rozhodne o dalším postupu. Identifikace a dourčování mikrobů je prováděno v bakteriologické laboratoři pomocí dalších testů.

4 Výsledky

Podle poskytnutých dat z oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a.s. bylo zjištěno, že za období od 1. 1. 2014 do 24. 12. 2018 byl proveden odběr 9839 hemokultur, které byly následně vyšetřeny.

Data byla rozdělena na kategorie „Dítě“, „Muž“ a „Žena“. Jako dětské vzorky byly vyfiltrovány všechny, které pocházely z dětského a dorostového oddělení. Z celkového počtu 9839 hemokultur bylo hemokultivačním systémem vyhodnoceno 7501 jako negativní a 2338 jako pozitivní. Jednotlivé počty pozitivit a negativit u každé z kategorií jsou zobrazeny v tabulce č. 1 a procenta v tabulce č. 2.

Tab. 1 Počet vyšetřených hemokultur

	Dítě	Muž	Žena	Celkem
Negativní	245	4121	3135	7501
Pozitivní	71	1176	1091	2338
Celkem	316	5297	4226	9839

(zdroj: vlastní zpracování)

Tab. 2 Procentuální zastoupení

	Dítě	Muž	Žena
Negativní	78 %	78 %	74 %
Pozitivní	22 %	22 %	26 %
Celkem	100 %	100 %	100 %

(zdroj: vlastní zpracování)

Pomocí programu MS Excel byly vypočítány očekávané četnosti negativních a pozitivních výsledků v kategoriích a funkcí CHITEST byla zjištěna hodnota signifikance $p = 0,02 \%$. Pokud je p -hodnota menší než 5 % (hladina významnosti), nulová hypotéza se zamítá. To znamená, že existuje rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými hodnotami, výsledek je statisticky významný. Výsledky výzkumu lze brát jako relevantní.

4.1 Mikrobiální spektrum

Druhým cílem bakalářské práce bylo zjistit mikrobiální spektrum v hemokulturách v letech 2014–2018. Poskytnutá data byla zpracována v kontingenční tabulce, pomocí níž došlo k přehlednému rozdělení a sečtení všech nálezů v hemokulturách. V tabulce č.

3 je znázorněno 124 mikrobiálních původců včetně výskytu vzhledem k pozorovaným kategoriím a procentuálního výskytu každého nálezu za celé zkoumané období.

Tab. 3 Mikrobiální spektrum 2014-2018

Nález	Děti	Muži	Ženy	Celkem	Procenta
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1		3	4	0,04%
<i>Acinetobacter species</i>		4	4	8	0,08%
<i>Actinomyces naeslundii</i>			1	1	0,01%
<i>Actinomyces viscosus</i>		1		1	0,01%
<i>Aerococcus urinae</i>		3		3	0,03%
<i>Aerococcus viridans</i>		4		4	0,04%
<i>Alcaligenes species</i>			1	1	0,01%
Alfa-hemolytické streptokoky	2	1	6	9	0,09%
Anaerobní koky blíže neurčené			1	1	0,01%
Anaerobní tyčky blíže neurčené			1	1	0,01%
<i>Bifidobacterium species</i>		1		1	0,01%
<i>Brevibacterium species</i>			1	1	0,01%
<i>Brevundimonas vesicularis</i>			1	1	0,01%
<i>Burkholderia cepacia</i>			3	3	0,03%
<i>Campylobacter species</i>		1		1	0,01%
<i>Candida albicans</i>		5	5	10	0,10%
<i>Candida glabrata</i>		6	2	8	0,08%
<i>Candida intermedia</i>		2		2	0,02%
<i>Candida parapsilosis</i>		1	2	3	0,03%
<i>Candida tropicalis</i>			2	2	0,02%
<i>Clostridium perfringens</i>		2	4	6	0,06%
<i>Corynebacterium jeikeium</i>			1	1	0,01%
<i>Corynebacterium macginleyi</i>		1		1	0,01%
<i>Corynebacterium species</i>		6	5	11	0,11%
<i>Corynebacterium striatum</i>		2		2	0,02%
<i>Corynebacterium xerosis</i>			2	2	0,02%
<i>Cutibacterium acnes</i>		7	3	10	0,10%
<i>Eggerthella lenta</i>		1		1	0,01%
<i>Enterobacter cloacae</i>		10	12	22	0,22%
<i>Enterobacter species</i>	1	18	16	35	0,36%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>		1		1	0,01%
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	8	1	10	0,10%
<i>Enterococcus faecium</i>		3	3	6	0,06%
<i>Enterococcus species</i>	1	21	25	47	0,48%
<i>Escherichia coli</i>	2	173	253	428	4,35%
<i>Escherichia coli haemolytica</i>		37	51	88	0,89%
G negativní tyčky nepatřící do <i>Enterobacterales</i>		3		3	0,03%
G negativní tyčky patřící do <i>Enterobacterales</i>			2	2	0,02%
<i>Gemella haemolysans</i>		1		1	0,01%
<i>Haemophilus influenzae</i>		3		3	0,03%
<i>Klebsiella oxytoca</i>		3	1	4	0,04%
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>		13	8	21	0,21%
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis</i>			2	2	0,02%
<i>Klebsiella species</i>		75	37	112	1,14%
<i>Klebsiella terrigena</i>		2	3	5	0,05%

<i>Kocuria kristinae</i>		1	1	2	0,02%
<i>Kocuria varians</i>		2		2	0,02%
Kvasinkové organismy		4	1	5	0,05%
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		4		4	0,04%
<i>Lactobacillus species</i>			2	2	0,02%
<i>Lactococcus species</i>		2		2	0,02%
<i>Leuconostoc species</i>		1	1	2	0,02%
<i>Listeria species</i>		1		1	0,01%
Methicilin/Oxacilin rezistentní <i>Staph.aureus</i> -MRSA		18	37	55	0,56%
<i>Micrococcus luteus</i>			2	2	0,02%
<i>Micrococcus species</i>		3	1	4	0,04%
<i>Moraxella osloensis</i>			3	3	0,03%
<i>Morganella morganii subsp. morganii</i>		10	8	18	0,18%
Negativní	245	4121	3135	7501	76,24%
<i>Oligella ureolytica</i>			1	1	0,01%
<i>Paenibacillus durus</i>		1		1	0,01%
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>			1	1	0,01%
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>		2		2	0,02%
<i>Propionibacterium avidum</i>		1		1	0,01%
<i>Propionibacterium species</i>		2		2	0,02%
<i>Proteus mirabilis</i>		2	1	3	0,03%
<i>Proteus species</i>		25	21	46	0,47%
<i>Providencia species</i>			2	2	0,02%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		7	11	18	0,18%
<i>Pseudomonas species</i>		2	3	5	0,05%
<i>Raoultella terrigena</i>		2		2	0,02%
<i>Rothia dentocariosa</i>		1		1	0,01%
<i>Salmonella enteritidis</i>	1	8	5	14	0,14%
<i>Serratia marcescens</i>		1	4	5	0,05%
<i>Serratia species</i>		2	2	4	0,04%
<i>Shewanella putrefaciens</i>		2		2	0,02%
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	3	161	97	261	2,65%
<i>Staphylococcus auricularis</i>		1		1	0,01%
<i>Staphylococcus capitis subsp. capitis</i>		2	3	5	0,05%
<i>Staphylococcus capitis subsp. ureolyticus</i>		1	1	2	0,02%
<i>Staphylococcus caprae</i>		5	2	7	0,07%
<i>Staphylococcus citreus</i>		1	1	2	0,02%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	67	70	139	1,41%
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	2	1		3	0,03%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4	12	20	36	0,37%
<i>Staphylococcus hominis</i>	5	35	22	62	0,63%
<i>Staphylococcus chromogenes</i>		3	1	4	0,04%
<i>Staphylococcus intermedius</i>			2	2	0,02%
<i>Staphylococcus lentus</i>			2	2	0,02%
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		4	3	7	0,07%
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	3	13	2	18	0,18%
<i>Staphylococcus petrasii subsp. jettensis</i>			1	1	0,01%
<i>Staphylococcus piscifermentans</i>			1	1	0,01%
<i>Staphylococcus plasmakoagulasa negativní</i>	29	238	229	496	5,04%
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>		1		1	0,01%
<i>Staphylococcus simulans</i>		4	11	15	0,15%
<i>Staphylococcus species</i>		1		1	0,01%

<i>Staphylococcus warneri</i>		10	2	12	0,12%
<i>Staphylococcus xylosus</i>			3	3	0,03%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	4	5	10	0,10%
<i>Streptococcus beta</i> - hemolytický ze skupiny C		1	1	2	0,02%
<i>Streptococcus beta</i> -hemolytický sk. C PNC citlivý		11	2	13	0,13%
<i>Streptococcus beta</i> -hemolytický sk. G PNC citlivý		13	1	14	0,14%
<i>Streptococcus beta</i> -hemolytický skupina F	1	1		2	0,02%
<i>Streptococcus constellatus</i>		6		6	0,06%
<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i>			1	1	0,01%
<i>Streptococcus equinus</i>		1	2	3	0,03%
<i>Streptococcus gallolyticus</i>		7		7	0,07%
<i>Streptococcus infantarius</i>			1	1	0,01%
<i>Streptococcus intermedius</i>		2		2	0,02%
<i>Streptococcus mitis</i>	2	12	1	15	0,15%
<i>Streptococcus oralis</i>		2		2	0,02%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		2		2	0,02%
<i>Streptococcus pneumoniae</i> v M fázi	4	4	5	13	0,13%
<i>Streptococcus pneumoniae</i> v S fázi	1	7	16	24	0,24%
<i>Streptococcus pyogenes</i> PNC +	1	5	2	8	0,08%
<i>Streptococcus salivarius</i>			4	4	0,04%
<i>Streptococcus sanguinis</i>		5	2	7	0,07%
<i>Streptococcus species</i>		2	1	3	0,03%
<i>Streptococcus thoraltensis</i>	1			1	0,01%
<i>Streptococcus vestibularis</i>	1			1	0,01%
Tyčky gram-pozitivní		1		1	0,01%
<i>Veillonella parvula</i>		1		1	0,01%
Vzdušné sporující mikroby	2	6	5	13	0,13%
Celkový součet		316	5297	4226	9839

(zdroj: vlastní zpracování)

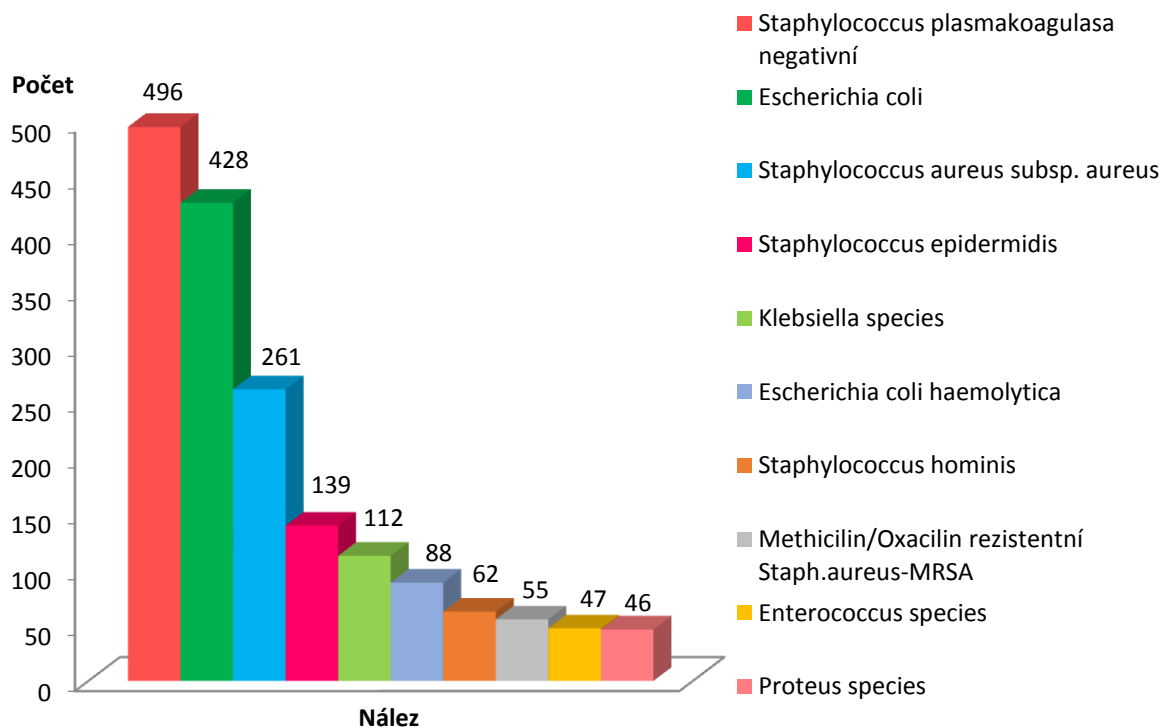
Nejčastější nálezy byly vybrány pomocí funkce podmíněného formátování v programu Microsoft Excel a samostatně zpracovány do tabulky (viz Tab. 4), ze které vznikl graf (viz Obr. 1).

Tab. 4 Nejčastější nálezy 2014-2018

Nález	Děti	Muži	Ženy	Celkem
<i>Staphylococcus plasmakoagulasa</i> negativní	29	238	229	496
<i>Escherichia coli</i>	2	173	253	428
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	3	161	97	261
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	67	70	139
<i>Klebsiella species</i>	0	75	37	112
<i>Escherichia coli haemolytica</i>	0	37	51	88
<i>Staphylococcus hominis</i>	5	35	22	62
Methicilin/Oxacilin rezistentní <i>Staph.aureus</i> -MRSA	0	18	37	55
<i>Enterococcus species</i>	1	21	25	47
<i>Proteus species</i>	0	25	21	46

(zdroj: vlastní zpracování)

Ze 149 nálezů v hemokulturách bylo vybráno 10 s nečastějším výskytem od začátku roku 2014 do konce roku 2018. Podle statistického testování pomocí funkce CHITEST s hladinou významnosti 5 % se prokázalo, že rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými hodnotami je statisticky významný. Hodnota signifikance $p = 0 \%$. Z toho vyplývá, že je pravděpodobnost 0 %, že by tyto výsledky vznikly náhodou.

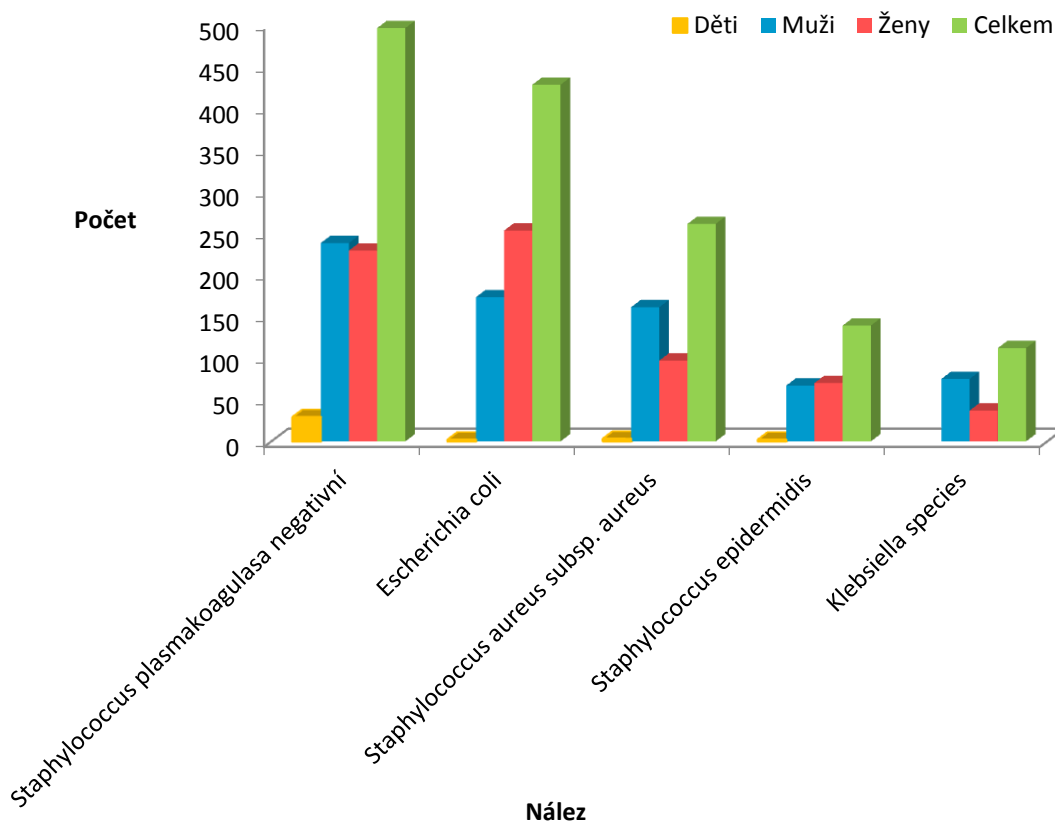


Obr. 1 Nejčastější nálezy

(zdroj: vlastní zpracování)

Podle tabulky č. 4, kde jsou seřazeny nejčastější nálezy sestupně vzhledem k celkovému počtu, je zřejmé, že nejčastějším izolátem za celé zkoumané období se stal *Staphylococcus plasmakoagulasa negativní*, který byl nalezen ve 496 vzorcích z celkového počtu 2338 pozitivních vzorků. Druhým a třetím nejčastějším izolátem byly *Escherichia coli* s výskytem ve 428 vzorcích a *Staphylococcus aureus subsp. aureus* s výskytem ve 261 vzorcích. *Staphylococcus epidermidis* byl izolován ze 139 vzorků, *Klebsiella species* ze 112 vzorků, *Escherichia coli haemolytica* z 88 vzorků, *Staphylococcus hominis* ze 62 vzorků, Methicilin/Oxacilin rezistentní *Staph.aureus-MRSA* z 55 vzorků, *Enterococcus species* ze 47 vzorků a *Proteus species* ze 46 vzorků

Dále byl vytvořen graf, který zobrazuje nejčastější nálezy u mužů, žen, dětí a celkový počet každého vybraného nálezu (viz Obr. 2).



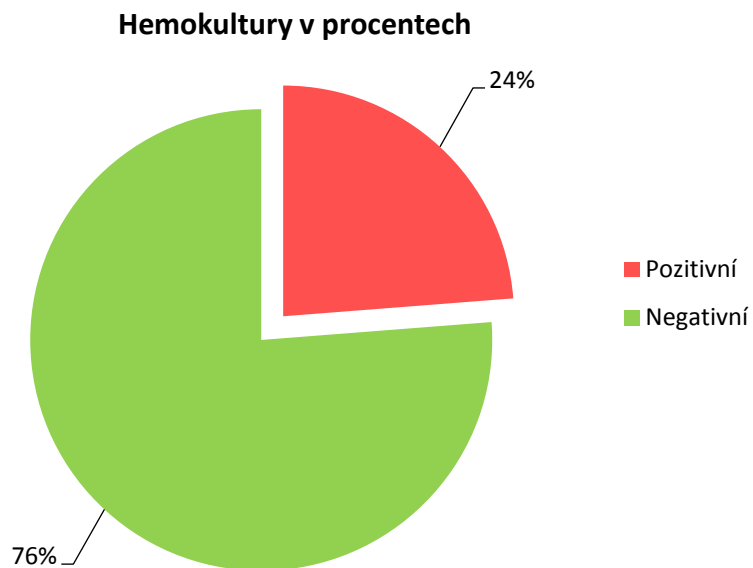
Obr. 2 Nejčastější nálezy u jednotlivých kategorií

(zdroj: vlastní zpracování)

Z grafu na obrázku č. 2 je patrné, že nejčastějšími nálezy u žen byly *Escherichia coli* a *Staphylococcus plasmakoagulasa negativní*. U mužů se nejčastěji objevoval taktéž *Staphylococcus plasmakoagulasa negativní*, skoro ve stejném počtu jako u žen. O druhou příčku nejčastějšího výskytu u mužů se dělí téměř se stejným výsledkem *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus subsp. aureus*. Dětské hemokultury vykazovaly nejvíce pozitivitu na plasmakoagulasa negativní stafylokoky, naproti tomu *Klebsiella species* nebyla prokázána v žádné hemokultuře.

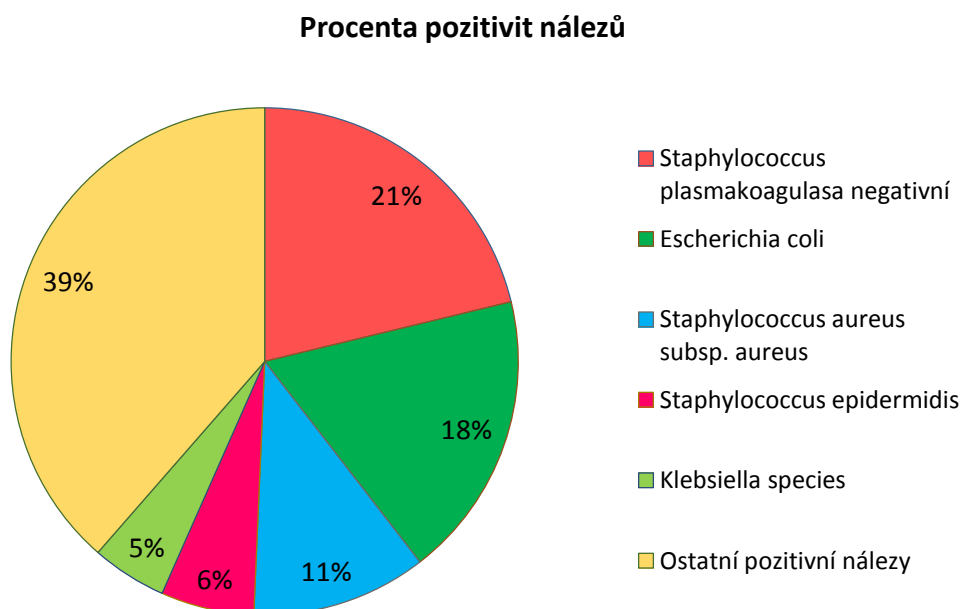
4.2 Procento pozitivit

Zjistit procento pozitivit k celkovému počtu odebraných hemokultur v letech 2014-2018 bylo posledním cílem této bakalářské práce. Z grafu na obrázku č. 3 je patrné, že vzhledem k celkovému počtu 9839 hemokultur bylo vyhodnoceno 24 % (2338) jako pozitivní.



Obr. 3 Procenta pozitivita a negativita

(zdroj: vlastní zpracování)



Obr. 4 Procenta pozitivit nálezů

(Zdroj: vlastní zpracování)

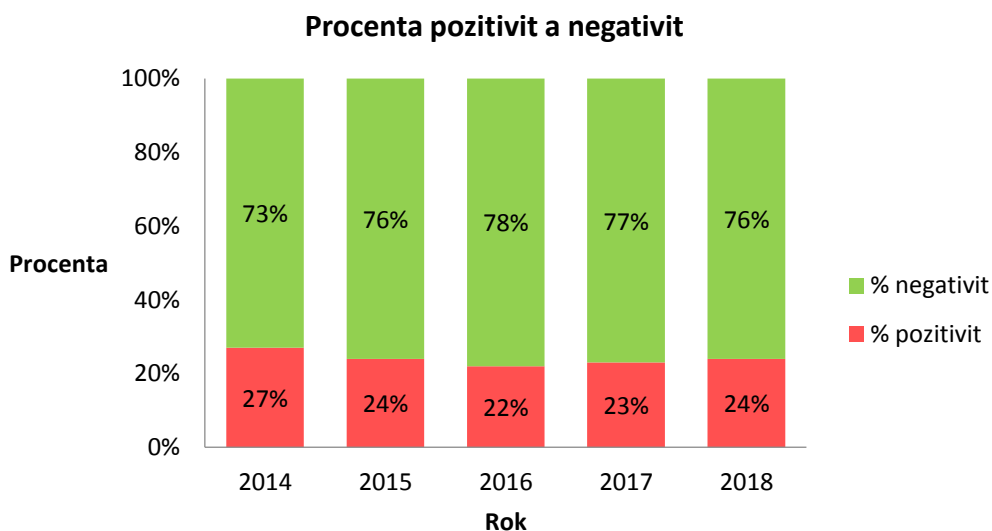
Ze všech pozitivních nálezů bylo vyfiltrováno 5 nejčastějších, ostatní byly sečteny, souhrnně označeny jako „ostatní pozitivní nálezy“ a z těchto dat vznikl graf (viz Obr. 4), na němž se ukázala procentuální pozitivita vybraných izolátů vzhledem k počtu všech pozitivních hemokultur. *Staphylococcus plasmakoagulasa* negativní tvoří 21 % všech pozitivních nálezů, *Escherichia coli* 18 %, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* 11 %, *Staphylococcus epidermidis* 6 %, *Klebsiella species* 5 % a ostatní pozitivní nálezy 39 %.

Tab. 5 Pozitivní a negativní nálezy za jednotlivé roky

	Pozitivní	% pozitivit	Negativní	% negativit	Celkem nálezů
Rok 2014	482	27 %	1327	73 %	1809
Rok 2015	468	24 %	1476	76 %	1944
Rok 2016	401	22 %	1441	78 %	1842
Rok 2017	465	23 %	1566	77 %	2031
Rok 2018	522	24 %	1691	76 %	2213
Celkem	2338		7501		9839

(zdroj: vlastní zpracování)

Tabulka č. 5 ukazuje počet pozitivních a negativních nálezů za jednotlivé zkoumané roky. Z těchto hodnot byl také vypočítán Chí kvadrát test. Dosažená hladina významnosti vyšla 0,98 %. Hodnota $p < 5 \%$, z toho vyplývá statistická významnost. Z dat v tabulce vznikl graf (viz Obr. č. 5), který ukazuje procenta pozitivit a negativit v jednotlivých letech.



Obr. 5 Procenta pozitivit a negativit

(zdroj: vlastní zpracování)

5 Diskuze

Během let 2014-2018 bylo na oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek, a.s. vyšetřeno automatickým hemokultivačním systémem BACTEC 9839 hemokultur. Z tohoto celkového počtu přístroj označil 2338 jako pozitivní. Procentuální míra pozitivivity je 24 %. Při odběru vzorků na hemokultivační vyšetření se obvykle odebírá více vzorků od jednoho pacienta a vzorky ve většině případů obsahují stejný nález, to znamená, že procento pozitivivity může být tímto faktem zvýšené.

Při provádění hemokultivačního vyšetření systémem BACTEC byly zřejmé všechny výhody automatizovaného hemokultivačního systému, které popisují autoři odborné literatury a jsou uvedeny v teoretické části.

Zjištěné mikrobiální spektrum obsahuje širokou škálu grampozitivních, gramnegativních, anaerobních i kvasinkových původců. Je zřejmé, že si do krevního řečiště najde cestu jakákoliv bakterie nebo kvasinka. Pomocí funkce CHITEST bylo zjištěno, že výsledky jsou statisticky významné. Nejčastějším nálezem izolovaným z hemokultur se stal v tomto výzkumu *Staphylococcus plasmakoagulasa* negativní. Do této skupiny patří *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* a *Staphylococcus haemolyticus*. Vyskytoval se ve 21 % všech pozitivních vzorků, což činí 496 hemokultur. Zjištěné procento pozitivivity může být zvýšené, jelikož se tyto stafyloky vyskytují na kůži, jsou oportunními patogeny a snadno může dojít ke kontaminaci hemokultury. Čermák (2008) uvádí, že pouze 12,4 % těchto izolovaných stafylokoků je klinicky významných. Podle Šenkýřové (2012) jsou koagulasa negativní stafylokoky nejčastější grampozitivní původci infekcí krevního řečiště spolu se *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* a *Enterococcus species*. *Staphylococcus aureus* byl zachycen ve 261 vzorcích, tj. 11 % z celkového počtu, *Streptococcus pneumoniae* ve 39 vzorcích a *Enterococcus species* ve 47 vzorcích. Nejčastějšími gramnegativními původci označila Šenkýřová (2012) *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter species*. Statistickým výzkumem v této práci bylo zjištěno, že *Escherichia coli* je významným a velmi častým nálezem. Tato enterobakterie byla potvrzena v 18 % (428) z celkového počtu 2338 pozitivních vzorků. Černý et al. (2005) uvádí přítomnost *Escherichia coli* ve 13 %. *Klebsiella species* se výzkumem potvrdila ve 112 vzorcích a přímo *Klebsiella pneumoniae* ve 21 vzorcích. *Pseudomonas aeruginosa* byla přítomna v 18

hemokulturách a *Enterobacter species* narostl ve 35 kulturách. Nálezy nejčastějších původců se potvrdily jako správné v porovnání s odbornou literaturou. *Escherichia coli* byla ve větším počtu nalezena ve vzorcích od žen a *Staphylococcus aureus subsp. aureus* a *Klebsiella species* ve větším počtu v mužských hemokulturách.

6 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala vyšetřováním hemokultur v automatickém hemokultivačním systému. Prvním cílem bylo osvojit si praktické zpracování hemokultur v automatickém hemokultivačním systému. Tento cíl byl splněn na oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice, Písek a.s., kde byla práce pod odborným dohledem vedena. Druhým cílem bylo zjistit mikrobiální spektrum v hemokulturách v letech 2014-2018 a třetí cíl byl formulován jako zjištění procenta pozitivit k celkovému počtu odebraných hemokultur v letech 2014-2018. Tyto dva cíle byly také splněny formou statistického výzkumu provedeného z dat poskytnutých mikrobiologickou laboratoří, kde probíhala práce s hemokulturami. Ze širokého mikrobiálního spektra byly nejčastějšími izoláty koagulasa negativní stafylokoky, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Z celkového počtu 9839 vyšetřených vzorků prokazovalo pozitivitu 2338, tj. 24 %.

7 Seznam použité literatury

1. ARBUTHNOTT, J. P., 1999. Stafylokoky: Infekce kůže a ran; absces; osteomyelitida; alimentární intoxikace. In: GREENWOOD, D. et al. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, s. 181-187. ISBN 80-7169-365-0.
2. BARTŮNĚK, P., JURÁSKOVÁ, D., HECZKOVÁ, J., NALOS, D., 2016. *Vybrané kapitoly z intenzivní péče*. Praha: Grada Publishing, 752 s. ISBN 978-80-247-4343-1.
3. BASSETTI, M., VENA, A., CROXATTO, A., RIGHI, E., GUERY, B., 2018. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context* [online]. 7, 1-18 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.7573/dic.212527. ISSN 17404398. Dostupné z: <http://www.drugsincontext.com/how-to-manage-pseudomonas-aeruginosa-infections>
4. BEDNÁŘ, M. et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. 560 s. ISBN 859-40-315-0528-0.
5. BERGIN, S. P. et al., 2015. Bacteremia, Sepsis, and Infective Endocarditis Associated with *Staphylococcus aureus*. In: BAGNOLI, F., RAPPUOLI, R., GRANDI, G. (eds). *Staphylococcus aureus: Current Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 409. Springer, Cham, s. 263-296. [online]. [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1007/82_2015_5001. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F82_2015_5001#citeas
6. BLAŽKOVÁ, M., KARAMONOVÁ, L., FUKAL, L., RAUCH, P., 2005. *Listeria monocytogenes* - NEBEZPEČNÝ PATOGEN A JEHO DETEKCE V POTRAVINÁCH. *Chem. Listy* [online]. 99, 467-473 [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_07_467-473.pdf
7. Blood culture: OXOID SIGNAL® BLOOD CULTURE SYSTEM. *Thermo scientific* [online]. c2001-2019 [cit. 2019-05-02]. Dostupné z: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=BC0100&c=UK&lang=EN

8. BROADLEY, M., SCHWEON, S. J., 2017. Get the facts about Fusobacterium. *Nursing* [online]. **47**(5), 64-65 [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1097/01.NURSE.0000515524.23032.d5. ISSN 0360-4039. Dostupné z: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00152193-201705000-00018>
9. ČERMÁK, P., 2008. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. Praha: MAXDORF-JESSENIUS. 182 s. ISBN 9788073451424.
10. ČERNÝ, V. et al., 2005. *Sepse v intenzivní péči: vybraná doporučení v diagnostice a terapii*. 2., rozš. vyd. Praha: Maxdorf. ISBN 80-7345-054-2.
11. EHRMANN, J. et al., 2014. *Hepatologie* [online]. 2. vydání. Grada. 658 s. ISBN 9788024780214. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=4nHeBAAAQBAJ&pg=PA284&lpg=PA284&dq=pyogenn%C3%AD+koky&source=bl&ots=SMRtAcmoXP&sig=ACfU3U2EG_-xBUeBJ1mW1gRiK6a6MxiaQ&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwiz0tXu3ZPhAhVNAKHx51C6YQ6AEwCXoECAUQAQ#v=onepage&q=pyogenn%C3%AD%20koky&f=false
12. FISHER, K., PHILLIPS, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology* [online]. **155**(6), 1749-1757 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1099/mic.0.026385-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.026385-0>
13. FORIS, L. A., SNOWDEN, J., c2019. *Proteus Mirabilis Infections* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442017/#_NBK442017_pubdet_
14. GREENWOOD, D. et al., 1999. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1., čes. Praha: Grada. ISBN 80-716-9365-0.
15. GROMAN, R. P., 2009. Gram-Negative Infections. *Small Animal Critical Care Medicine* [online]. Elsevier. 469-473 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1016/B978-1-4160-2591-7.10109-2. ISBN 9781416025917. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781416025917101092>

16. HERWALD, H., EGESTEN, A., 2011. *Sepsis: pro-inflammatory and anti-inflammatory responses: good, bad or ugly?* [online]. Basel: Karger, [cit. 2019-03-08]. Contributions to microbiology, v. 17. ISBN 3805597118. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=wZk7AQAAQBAJ&lpg=PP1&hl=cs&pg=PP1#v=onepage&q&f=false>
17. HOWARD, A. J., 1999. Hemofily: Infekce dýchacího ústrojí; meningitida; měkký vřed. In: GREENWOOD, D. et al. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada, s. 319-324. ISBN 80-7169-365-0.
18. HUTCHINSON, N. A., THOMAS, F. D., SHANSON, D. C., 1992. The clinical comparison of Oxoid Signal with Bactec blood culture systems for the detection of streptococcal and anaerobic bacteraemias. *Journal of Medical Microbiology* [online]. **37**(6), 410-412 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1099/00222615-37-6-410. Dostupné z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-37-6-410>
19. CHEUNG, W. Y., BELLAS, J., 2007. Fusobacterium: Elusive cause of life-threatening septic thromboembolism. *Can Fam Physician* [online]. **53**(9), 1451–1453 [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2234623/>
20. CHUN, K. et al., 2015. Sepsis Pathogen Identification. *Journal of Laboratory Automation* [online]. **20**(5), 539-561 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1177/2211068214567345. ISSN 2211-0682. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2211068214567345>
21. KREJSEK, J., ANDRÝS C., KRČMOVÁ, I., 2016. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon. 495 s. ISBN 978-80-86472-74-4.
22. *Laboratorní příručka oddělení klinické mikrobiologie*, 2018. [online]. Nemocnice Písek a. s. [cit. 2019-22-04]. Dostupné z: https://www.nemopisek.cz/media/ke_stazeni/OKMLabPrir2018.pdf
23. LAMY, B. et al., 2016. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Frontiers in Microbiology* [online]. [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00697.

ISSN 1664-302X. Dostupné z:

<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00697/abstract>

24. MAHENTHIRALINGAM, E., URBAN, T. A., GOLDBERG, J. B., 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **3**(2), 144-156 [cit. 2019-04-08]. DOI: 10.1038/nrmicro1085. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro1085>
25. MATĚJOVIČ, M., 2017. Sepse a její nová definice. *Postgraduální nefrologie* [online]. **15**(1), 4-8 [cit. 2019-02-16]. Dostupné z: <https://www.postgradualnefrologie.cz/cislo-xv-1/sepse-a-jeji-nova-definice/>
26. MUNTAU, A., 2009. *Pediatric*. Praha: Grada. 608 s. ISBN 978-80-247-2525-3.
27. OKEKE, E. B., UZONNA, J. E., 2016. In Search of a Cure for Sepsis: Taming the Monster in Critical Care Medicine. *Journal of Innate Immunity* [online]. **8**(2), 156-170 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1159/000442469. ISSN 1662-811X. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/442469>
28. OPAL, S. M., ESMON, Ch. T., 2002. Bench-to-bedside review: Functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Critical Care* [online]. **7**(1), 23-38 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1186/cc1854. ISSN 13648535. Dostupné z: <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc1854>
29. OTTO, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis* — the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **7**(8), 555-567 [cit. 2019-03-22]. DOI: 10.1038/nrmicro2182. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2182>
30. PRŮCHA, M., FEDORA, M., KIESLICHOVÁ, E., ŠRÁMEK, V., 2015. *Sepsis*. Praha: Maxdorf. 294 s. ISBN 978-80-7345-448-7.
31. *Příbalová informace BD BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F Culture Vials*, 2016. [online]. Becton Dickinson s.r.o. [cit. 2019-22-04]. Dostupné z: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=18403>

32. Příbalová informace BD BACTEC Peds Plus/F Culture Vials, 2016. [online]. Becton Dickinson s.r.o. [cit. 2019-22-04]. Dostupné z: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=35528>
33. Příbalová informace BD BACTEC Plus Aerobic/F Culture Vials, 2015. [online]. Becton Dickinson s.r.o. [cit. 2019-22-04]. Dostupné z: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9457>
34. ROHNER, P., AUCKENTHALER, R., 1999. Review on evaluations of currently available blood-culture systems. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. **5**(9), 513-529 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1111/j.1469-0691.1999.tb00429.x. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14645377>
35. ROUPHAEL, N. G., STEPHENS, D. S., 2012. Neisseria meningitidis: Biology, Microbiology, and Epidemiology. *Methods Mol Biol.* [online]. 1-20 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1007/978-1-61779-346-2_1. ISBN 978-1-61779-345-5. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4349422/>
36. ROZSYPAL, H., 2015. *Základy infekčního lékařství*, [online]. Charles University in Prague: Karolinum Press. 572 s. ProQuest Ebook Central, ISBN 978-80-2462-932-2. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/jcucb-ebooks/detail.action?docID=4395911>.
37. SAUGET, M. et al., 2017. Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria?. *Trends in Microbiology* [online]. **25**(6), 447-455 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1016/j.tim.2016.12.006. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X16302128>
38. SHANKAR-HARI, M. et al., 2016. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* [online]. **315**(8), 775-787 [cit. 2019-02-16]. DOI: 10.1001/jama.2016.0289. Dostupné z: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2492876>
39. SHIVAPRAKASHA, S., RADHAKRISHNAN, K., KARIM, P., 2007. Candida spp. other than Candida albicans: A major cause of fungaemia in a tertiary care centre. *Indian Journal of Medical Microbiology* [online]. **25**(4), s. 405-407 [cit.

- 2019-04-16]. DOI: 10.4103/0255-0857.37350. ISSN 0255-0857. Dostupné z:
<http://www.ijmm.org/text.asp?2007/25/4/405/37350>
40. SCHAFFER, J. N., PEARSON, M. M., 2015. Proteus mirabilis and Urinary Tract Infections. *Microbiology Spectrum* [online]. **3**(5) [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013. ISSN 2165-0497. Dostupné z:
<http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013>
41. SCHARFEN, J., 2013. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Praha: Nucleus HK. 236 s. ISBN 978-808-7009-321.
42. SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2. vyd. Praha: Grada. 248 s. ISBN 978-802-4747-712.
43. SVOBODA, P., KANTOROVÁ, I., ŘEHOŘKOVÁ, D., SCHEER, P., 2004. *Sepse v traumatologii a chirurgii*. Praha: Triton, 199 s. ISBN 80-7254-550-7.
44. ŠENKÝŘOVÁ, V., 2012. Hemokultura. *Urol. praxi* [online]. **13**(3), 135-136 [cit. 2019-05-02]. Dostupné z:
<https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2012/03/10.pdf?fbclid=IwAR3TD3vk0tzdTna2sEgsl7KGX-XKA4JjwJ7oGzJp8DGKdZhWkPvRlz8fAXY>
45. THORPE, T. C., et al., 1990. BacT/Alert: an Automated Colorimetric Microbial Detection System. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **28**(7), 1608-1612 [cit. 2019-04-23]. Dostupné z:
<https://jcm.asm.org/content/jcm/28/7/1608.full.pdf>
46. URBÁŠKOVÁ, P., 2019. *EUCAST dokumenty: Rychlé vyšetření antimikrobní citlivosti přímo z hemokultivačních lahvíček*. [online]. Státní zdravotní ústav. [cit. 2019-04-23]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/rychle-vysetreni-citlivosti-z-hemokultur>
47. VÁGNEROVÁ, I., KOLÁŘ, M., 2003. Možnosti terapie infekcí způsobených vankomycin-rezistentními enterokoky. *Klin Farmakol Farm* [online]. **17**(3), 170-173 [cit. 2019-03-23]. Dostupné z:
https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2003/03/09.pdf?fbclid=IwAR1WGA3K4Qyb3URz0qiGRx_bqjH2FtW0p-xWXlfY4w16F-LtcbugEv5HnAc

48. VISCOLI, C., 2016. Bloodstream Infections: The peak of the iceberg. *Virulence* [online]. **7**(3), 248-51 [cit. 2019-01-23]. DOI: 10.1080/21505594.2016.1152440. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4871637/>
49. VLASATÁ, V. et al., 2017. Korynebakteria v krevním řečišti člověka. *Zprávy CEM* [online]. SZÚ Praha. **26**(11-12), 408-411 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/26_2017/11_12_listopad_prosinec/408_korynebakteria.pdf?fbclid=IwAR1fqTd5Yf0BRK_X6qYFC1LcYXpCU0Ezv26q8yjXNpzDPr81H47CRh3MyM8
50. VON EIFF, Ch., BECKER, K., MACHKA, K., STAMMER, H., PETERS, G., 2001. Nasal Carriage as a Source of Staphylococcus aureus Bacteremia. *New England Journal of Medicine* [online]. **344**(1), 11-16 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1056/NEJM200101043440102. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200101043440102>
51. VOTAVA, M. et al., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
52. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun. 351 s. ISBN 80-868-5000-5.
53. WARD, N. S., LEVY, M. M., 2017. *Sepsis Definitions, Pathophysiology and the Challenge of Bedside Management* [online]. Switzerland: Humana Press, 271. [cit. 2019-01-23]. ISBN 9783319484709. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=_tslDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
54. WEINSTEIN, M. P., 1996. Current Blood Culture Methods and Systems: Clinical Concepts, Technology, and Interpretation of Results. *Clinical Infectious Diseases* [online]. **23**(1), 40-46 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1093/clinids/23.1.40. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/clinids/23.1.40>
55. ZHAO, L. et al., 2016. Prospective evaluation of the chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of non-Candida albicans Candida species. *Fungal Biology* [online]. **120**(2), 173-178 [cit. 2019-04-16]. DOI: 10.1016/j.funbio.2015.09.006. ISSN 18786146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878614615001725>

56. ZÍMOVÁ, J., ZÍMA, P., 2013. Kapavka – gonorrhoea, aktuálně a v přehledu (3. část). *Urol. praxi* [online]. **14**(2), 72-76 [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2013/02/07.pdf>
57. ŽEMLIČKOVÁ, H., 2012. Streptococcus pneumoniae – vliv pneumokokových konjugovaných vakcín na výskyt antibiotické rezistence. *Pediatr. praxi* [online]. **13**(6), 424-426 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://www.pediatriepropraxi.cz/pdfs/ped/2012/06/19.pdf>

8 Seznam tabulek a obrázků

Tab. 1 Počet vyšetřených hemokultur	33
Tab. 2 Procentuální zastoupení	33
Tab. 3 Mikrobiální spektrum 2014-2018	34
Tab. 4 Nejčastější nálezy 2014-2018	36
Tab. 5 Pozitivní a negativní nálezy za jednotlivé roky	40
Obr. 1 Nejčastější nálezy	37
Obr. 2 Nejčastější nálezy u jednotlivých kategorií	38
Obr. 3 Procenta pozitivity a negativity	39
Obr. 4 Procenta pozitivit nálezů	39
Obr. 5 Procenta pozitivit a negativit	40

Příloha

Příloha č. 1 Hemokultivační lahvičky Bactec



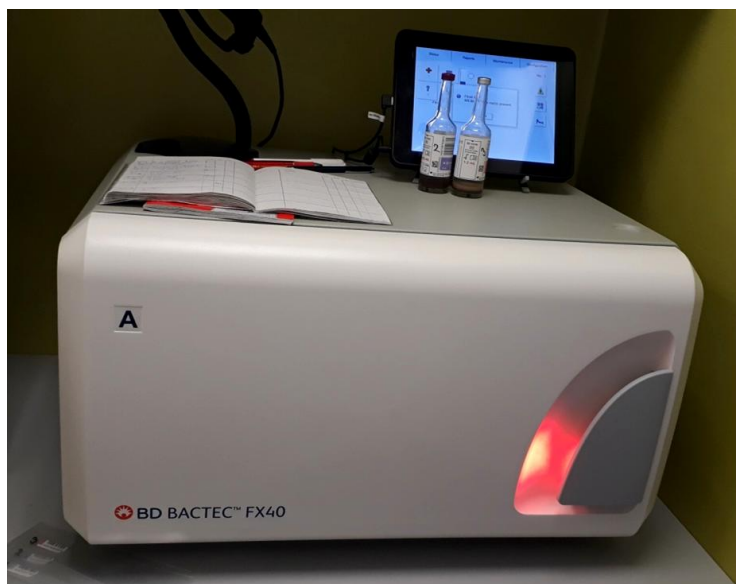
Příloha č. 2 Lahvička Oxoid Signal



Příloha č. 3 Příklad BACTEC 9050



Příloha č. 4 Příklad BACTEC FX40



Příloha č. 5 Inoklovaná lahvička Oxoid Signal



Příloha č. 6 Karusel přístroje BACTEC 9050



Příloha č. 7 Pozice pro hemokultury BACTEC FX40



Příloha č. 8 Pozitivní lahvičky Bactec (zákal)



Příloha č. 9 Pozitivní lahvička Oxoid Signal



Příloha č. 10 Inokulace kultivačních půd



Seznam zkratek

CNS	Centrální nervová soustava
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome
SIRS	Systemic inflammatory response syndrom
SPS	Polyanethol sulfonát sodný