



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Mikrobiologické vyšetření hemokultur automatizovaným systémem BACTEC

Vypracovala: Petra Vanišová

Vedoucí práce: MUDr. Alena Procházková

České Budějovice 2015

Abstrakt

Cíl: Cílem práce bylo popsat výskyt patogenních mikroorganismů v krevním řečišti, které ohrožovaly zdraví a život pacienta. Pomocí automatického hemokultivačního systému BACTEC byly zjištěny bakterie či kvasinky podílející se na rozvoji sepse v dané oblasti a výsledky byly porovnány s odbornou literaturou. Bylo zhodnoceno procentuální zastoupení kontaminovaných vzorků s cílem poukázat na důležitost správného odběru materiálu a edukace zdravotnického personálu. Pro porovnání nálezů v kultivačních médiích byly využity kontrolní stěry kůže. Rovněž byla zaznamenána doba, po kterou kultivace probíhala, jelikož hraje důležitou roli v uzdravení pacienta a snižuje náklady na jeho případnou léčbu.

Metoda: Praktická část práce se na rozdíl od teoretického úseku soustřeďuje na přípravu vzorků v laboratoři a vlastní analýzu, včetně identifikace mikroorganismů pomocí mikroskopických, kultivačních a biochemických technik. Pro detekci infekčních agens v hemokulturách byl využit automatizovaný hemokultivační systém BACTEC 9050, který používá fluorescenční senzor k zaznamenání tvorby CO₂. Oxid uhličitý reaguje s vodou za vzniku kyseliny. Tento chemický děj je doprovázen poklesem pH. Obsah pozitivní aerobní lahvičky se vyočkuje na vhodnou kultivační půdu. Mikrobiální nárůst se hodnotí po uplynutí 17 až 24 hodin v termostatu, následně se provede testování citlivosti na antibiotika a určí se léčba.

Výsledky: Bylo odebráno 1643 vzorků, u 1359 se neprokázal výskyt žádných patogenních druhů. Práce se zabývá nálezy 284 hemokultivačních lahviček označených přístrojem jako pozitivní. *Escherichia coli* byla zjištěna nejčastěji. *Klebsiella pneumoniae* se v počtu nálezů řadila na druhé místo. Majoritní zastoupení měly gramnegativní bakterie (72 %). Kontaminace byla spojena s 4,7 % z celkového množství vyšetření a souvisela s chybami při odběru.

Závěr: Každoročně přibývá počtu infekcí krevního řečiště a jsou i v současné době spojeny s vysokým procentem úmrtí. Hemokultivační vyšetření prostřednictvím automatických systémů je stěžním bodem rychlé a přesné detekce mikroorganismů.

Klíčová slova: Hemokultivace, hemokultura, BACTEC, bakteriémie, sepse.

Abstract

Objective: The aim of this work is to describe a presence of pathogenic microorganisms in bloodstream that could possibly threaten the health and life of a patient. Using an automated microbial detection system Bactec we have detected bacteria or yeast that partake on an extension of a sepsis in given area, we have also compared results with special literature. We have evaluated the percentage of contaminated samples trying to point out the importance of a correct material sampling and also the importance of the level of education of the medical staff. After comparing samples in the cell culture medium we have used control skin smears. We have also marked the period of time for which the cultivation occurred since it is an important factor in the restoration of a patient and lowers the cost of a prospective treatment. **The method:** In contrast with the theoretical section of this this work, the practical part is focused on laboratory samples preparation and actual analysis, including identification of the microorganisms, using microscopic, cultivation and biochemical techniques. For the detection of infective agents in blood culture we have used automated microbial detection system BACTEC 9050 which uses fluorescent sensor for the registration of CO₂ creation. Carbon dioxide reacts with water and creates acid. This chemical process is followed with the decrease of pH. The content of a positive aerobic vial is vaccinated for the right cultivation broth. Microbial growth is then evaluated after 17 to 24 hours in thermostat, followed by antibiotics sensitivity tests and then the optimal treatment is determined. **The result:** We have collected 1643 samples, 1359 of which did not show any pathogenic species. The work deals with findings inside of 284 samples which the machine marked as positive. The most common was *Escherichia coli*. The second place in quantity was represented by *Klebsiella pneumoniae*. The majority of bacteria were gram-negative (72 %). Sample contamination occurred in 4.7 % of all samples and was connected with sampling errors. **The conclusion:** There is an annual growth in bloodstream infections that are also connected with a high percentage of death possibility. Blood cultivation examination with a use of automated systems is crucial for quick and precise detection of microorganisms.

Key words: blood culture, BACTEC, bacteraemia, sepsis.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 1. 5. 2015

.....

Vanišová Petra

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala paní MUDr. Aleně Procházkové za veškerý čas, který mi věnovala v průběhu roku, kdy tato práce vznikala. Spolupráce s paní doktorkou si velice vážím a děkuji za odborné a věcné komentáře, které mi byly vodítkem k napsání této bakalářské práce. Také si cením spolupráce s paní MUDr. Helenou Kopeckou při získávání a zpracování potřebných dat.

Rovněž jsem vděčná Městské nemocnici Plzeň, PRIVAMED a.s. za vhodné pracovní podmínky.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině a panu MUDr. Petrovi Anderlemu, kteří mi byli velikou oporou v průběhu celého bakalářského studia.

OBSAH

Seznam použitých zkratek	8
Úvod	9
Teoretická část	10
1 Obecné pojmy.....	10
1.1 Bakteriémie.....	10
1.2 Sepse.....	11
1.3 Těžká sepse.....	11
1.4 Septický šok.....	12
1.5 SIRS.....	12
1.6 Infekční endokarditida.....	13
2 Vznik sepse.....	14
2.1 Průnik bakterií do krve	14
2.2 Primární zdroj infekce	14
2.3 Původci infekcí krevního řečiště	15
2.4 Rizikové faktory	16
2.5 Mortalita	16
3 Diagnostika infekcí krevního řečiště.....	17
3.1 Indikace hemokultivačního vyšetření.....	17
3.2 Odběr biologického vzorku	17
3.2.1 Optimální parametry pro odběr hemokultur.....	18
3.2.2 Postup odběru	18
3.2.3 Nejčastější chyby.....	19
3.3 Transport vzorku	21
4 Automatické systémy hemokultivace.....	22
4.1 Hemokultivace.....	22
4.2 Kultivační média	22
4.3 Podmínky kultivace	23
4.4 Princip systému BACTEC.....	23
4.4.1 Hemokultivační lahvičky systému BACTEC.....	24
4.5 Princip systému BacT/ALERT	25
4.6 Výhody kontinuálně monitorujících hemokultivačních systémů	25
5 Stručná charakteristika hlavních původců sepse	26
5.1 Grampozitivní bakterie	26

5.2	Gramnegativní bakterie	28
5.3	Anaerobní bakterie	31
5.4	Kvasinky	31
	Výzkumná část.....	32
6	Materiál a metodika	32
6.1	Cíle práce	32
6.2	Hypotézy.....	32
6.3	Charakteristika souboru vyšetřovaných vzorků	32
6.4	Přístroje, reagentie a laboratorní pomůcky	33
6.5	Princip výzkumné části.....	33
6.5.1	Preanalytická fáze v laboratoři	34
6.5.2	Postup práce	34
6.5.3	Negativní hemokultury	34
6.5.4	Pozitivní hemokultury	35
6.6	Identifikace bakterií	35
6.6.1	Mikroskopický preparát	35
6.6.2	Kultivace – přehled nejčastěji využívaných pŮd	35
6.6.3	Biochemická identifikace bakterií.....	36
7	Výsledky.....	37
7.1	Roční analýza	37
7.2	Analýza výsledků jednotlivých měsíců	38
7.3	Mikroorganismy identifikované v hemokulturách	45
7.3.1	Bakterie s majoritním výskytem u pacientů	47
7.3.2	Kontaminace.....	49
7.4	Kontrolní stěry kůže u kontaminací	50
7.5	Hemokultivační lahvičky.....	51
	Diskuze	52
	Závěr	55
	Seznam tabulek a grafů.....	56
	Použitá literatura	58
	Příloha.....	61

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AK	Aminokyseliny
ATB	Antibiotika
BHIB	Bujon z mozkosrdcové infuze
CRP	C-reaktivní protein
FA	BacT/ALERT lahvička pro aerobní kultivaci s inhibitory ATB
FN	BacT/ALERT lahvička pro anaerobní kultivaci s inhibitory ATB
G-	Gramnegativní bakterie
G+	Grampozitivní bakterie
HACEK	<i>Haemophilus</i> , <i>Actinobacillus</i> , <i>Cardiobacterium</i> , <i>Eikenella</i> , <i>Kingella</i>
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
IE	Infekční endokarditida
IKŘ	Infekce krevního řečiště
IL	Interleukin
MODS	Syndrom multiorgánové dysfunkce
MOFS	Syndrom polyorgánového selhání
MRSA	Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
PCT	Prokalcitonin
PF	BacT/ALERT lahvička pro aerobní kultivaci v pediatrii
SA	BacT/ALERT lahvička pro standardní aerobní kultivaci
SIRS	Syndrom systémové zánětové odpovědi
SN	BacT/ALERT lahvička pro standardní anaerobní kultivaci
SPS	Polyanetholsulfonát sodný
TNF	Tumor necrosis factor
TSB	Tryptózo-sojový bujon

ÚVOD

Sepse je komplexní syndrom a v mnoha případech lze obtížně definovat. V jejím průběhu se děje řada změn jako důsledek reakce na vstup patogenních mikroorganismů do cévního řečiště pacienta. Prognóza záleží na druhu infekčního agens a imunitním systému jedince (Staňková, Marešová a Vaništa, 2008).

Jen v USA je ročně diagnostikováno více než 750 000 pacientů, 500 osob denně umírá na následek tohoto zdravotního stavu (Čermák, 2008). Představuje jedenácté místo v počtu úmrtí ve Spojených státech. Sepsa se vyskytuje u pacientů po úrazech různého původu, popáleninách či u osob po chirurgickém výkonu apod. Náchylnější jsou starší osoby a rizikové skupiny, kam řadíme mimo jiné pacienty s rakovinou a poruchou imunitních funkcí. Častější výskyt v populaci můžeme přisuzovat celkovému stárnutí obyvatelstva, zvyšujícím se počtům pacientů s imunitními potížemi či ATB rezistenci. Je kladen stále silnější důraz na urychlení a zpřesnění diagnostických postupů. Je nutné zmínit, že sepsa je rovněž velikým ekonomickým problémem.

Stav, kdy dochází k ohrožení života z důvodu selhání jednoho či více orgánů, se nazývá těžká sepsa. Mortalita v tomto případě je velmi vysoká a patří k celosvětově rozšířeným problémům. Každoročně dochází k nárůstu případů těžké sepsy až o více než jedno procento. Mezi další stádia se řadí septický šok a multiorgánové selhání.

Hlavní roli v určování původce infekce má kulturační vyšetření, které potvrdí výskyt mikroorganismů, ovšem nezískáme přesné informace o jejich množství. V současné době se využívají automatické kulturační systémy, které zlepšují interpretaci výsledků a zkracují dobu potřebnou pro potvrzení diagnózy. Setkáváme se s automatickými hemokulturačními systémy BACTEC či BacT/ALERT.

Cílem práce je poukázat na rychlou a přesnou detekci agens od samotného náběru krve až po vyhodnocení materiálu v klinické laboratoři. Práce se rovněž věnuje problematice správného odběru, poukazuje na důležitost edukace zdravotnického personálu a hodnotí zastoupení kontaminovaných vzorků. Dalším cílem je zjištění výskytu jednotlivých bakteriálních kmenů podílejících se na etiopatogenezi infekcí krevního řečiště v Městské nemocnici Plzeň, PRIVAMED a.s. v průběhu jednoho roku.

TEORETICKÁ ČÁST

1 OBECNÉ POJMY

1.1 Bakteriémie

Bakteriémie je stav popisující přítomnost bakterií v krvi nemocného, ale nebývá spojen s klinickými projevy. Může se jednat o přechodný, intermitentní či kontinuální stav (Scharfen, 2013). Krátkodobý výskyt bakterií v krevním oběhu probíhá asymptomaticky, přetrvává několik minut a vymizí bez následků (Havlík et al., 2002). Bakteriémie je spojena s extrakcí zubů, malými chirurgickými výkony, tonzilektomií, katetrizací močových cest, bronchoskopií, gastroskopií nebo apendektomií (Ševčík, 1997). Problémy se mohou objevit u citlivějších jedinců a jsou doprovázeny prudkými nárůsty tělesné teploty nebo zánětem. Při 10 až 20 bakteriích v 1 ml krve je definována tzv. nízká bakteriémie, střední je při nález 50 bakterií a vysoká při nejméně 80 bakteriích v téměř objemu krve (Čermák, 2008).

Pyémie značí infekci, která je doprovázena výskytem sekundárních metastatických abscesů (Potužník, 1978). Portální pyémie vzniká při hnisavém procesu v dutině břišní, tím je například cholecystitida či apendicitida. Centrální pyémie se objevuje v důsledku přítomnosti patogenních mikroorganismů na srdečních chlopních. Bakteriální endokarditida je infekční postižení vnitřní vrstvy srdce a zároveň může být počátkem dalšího šíření bakterií po těle. Periferní pyémie má původ v žilním systému.

Nález mykotických zárodků v cévách označujeme jako fungémie. Celkové mykózy jsou navozeny přítomností *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, vzácněji je způsobují rody *Aspergillus*.

Virémie je stav, kdy viry proniknou do krevního řečiště a expandují do dalších orgánů. Může docházet i k sekundárním virémiím v důsledku virového onemocnění.

1.2 Sepse

Systemová zánětlivá reakce organismu na přítomnost infekce se nazývá seps (Černý et al., 2005). Mikroorganismy se periodicky nebo neustále vyplavují z primárního ložiska infekce do oběhu, kde se mnohou utvářejí druhotná metastatická ložiska (Havlík et al., 2002). Onemocnění je doprovázeno typickými klinickými příznaky s komplexní symptomatologií. Horečka patří mezi nejvýraznější známky seps, zejména v remitujícím a intermitentním typu (Planta et al., 1997). Dochází k uvolňování mediátorů, které jsou charakteristické i pro řadu jiných chorob (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 a IFN γ). Interleukin-1, interleukin-6, TNF a interferony uvolňované monocyty, makrofágy řadíme mezi endogenní pyrogeny působící na hypotalamus, což vede ke zvýšení teploty těla (Ganong, 2005).

U 10 až 15 % pacientů zaznamenáváme hypotermii, ta bývá spojena s neblahou prognózou a objevuje se spíše u starých osob či u dětí. Pacienti jsou slabí, unavení, méně močí, trpí na nechutenství, zvracení, průjmy, psychické změny (neklid, dezorientace, snížená bdělost), bolesti v zádech, končetinách nebo v břiše. Dále pozorujeme tachykardii, tachypnoe, kožní projevy (např. petechie). Stoupá sedimentace erytrocytů, hladina CRP a fibrinogenu. Mezi další laboratorní známky patří trombopenie, hyperglykémie, leukocytóza nebo vzácně leukopenie (Havlík et al., 2002).

Existují 4 stádia seps – prostá seps, těžká seps, septický šok a multiorganové selhání. Rovněž se používá spojení septický syndrom, obzvláště v případech, kdy nejsme schopni bezpečně určit hlavního původce onemocnění.

Příčina vzniku seps je u 15 – 20 % smíšeného původu (Ševčík, 1997).

1.3 Těžká seps

Seps, která vede k orgánové dysfunkci, hypoperfúzi a hypotenzi, se označuje těžká seps (Havlík et al., 2002). Systolický krevní tlak klesá pod 90 mmHg nebo o 40 mmHg od počátku onemocnění u hypertoniků. Nastávají změny v chování nebo poruchy vědomí.

Postupně se objevují známky poškození ledvin i jiných orgánů. Typická je laktátová acidóza či oligurie.

1.4 Septický šok

Septický šok je velmi vážný stav, který může zapříčinit smrt pacienta. Je doprovázen sníženým průtokem krve v tkáních, nedostatečnou distribucí kyslíku a živin do periferie.

Diagnózu septického šoku si potvrdíme pozitivními hemokulturami a nízkým tlakem krve v tepnách, který přetrvává i po dostatečné hydrataci pacienta. Sledujeme zvýšenou frekvenci dýchání a abnormální počet leukocytů. Obzvláště u dětí, starších jedinců či osob s narušeným imunitním systémem je závažnost septického šoku velice vysoká, proto je jeho včasné rozpoznání stěžejní faktorem. Léčba spočívá v dodání kyslíku, cílené antibiotické terapii, podpoře selhávajících orgánů a sledování místa vstupu patogenů do organismu (Čermák, 2008).

Příkladem je syndrom toxického šoku. Jedná se o akutní postižení několika orgánů spojené s horečkou, nízkým tlakem, erytémovým rashem s následnou deskvamací kůže, průjmy až rozvojem šokového stavu, kdy dochází k selhání jater a ledvin (Lobovská, 2002). Syndrom toxického šoku je způsoben některými kmeny *Staphylococcus aureus* vytvářející značné množství toxinu, který vyvolává systémovou zánětlivou reakci (Ševčík, 1997). Původce se množí v drobných poraněních typu modřin, popálenin či operačních ranách. Syndrom toxického šoku může vznikat u žen používajících poševní tampony při menstruaci (Havlík et al., 2002).

1.5 SIRS

Pod označením SIRS se skrývá systémová zánětlivá reakce, *Systemic Inflammatory Response Syndrome*. SIRS může mít původ v infekčním onemocnění nebo se rozvíjí v důsledku fyzikálního či chemického poškození tkání, které není doprovázeno infekcí

(Závada, 2001). Seps je podskupinou SIRS a její příčina je vždy infekční (Čermák, 2008).

Tělesná teplota dosahuje hodnot nad 38 °C nebo klesá pod 36 °C. Tepová frekvence přesahuje hladinu 90/min, dechová je vyšší než 20/min. Hyperventilace vyvolává pokles arteriální koncentrace oxidu uhličitého pod 32 mmHg, to má za následek posun pH a vzniká respirační alkalóza. Leukocyty se dostávají nad hranici 12 000/mm³ nebo padají pod 4 000/mm³ a objevuje se více než 10 % nezralých forem bílých krvinek (Čermák, 2008).

Vyplavování katecholaminů vede k hyperglykemii a vzhledem k multiorgánové dysfunkci se hovoří o MODS – *Multiple Organ Dysfunction Syndrom* (Češka, 2010). Termín MOFS (*Multiple Organ Failure Syndrome*) je vyhrazen pro syndrom polyorgánového selhání (Beneš, 2009).

1.6 Infekční endokarditida

Infekční endokarditidu (IE) doprovází teploty septického původu s třesavkou, vzrůstající dušností a únavou, v některých případech se objevují petechie nebo jiné projevy embolizace (Lobovská, 2002).

Infekční endokarditida vzniká nejčastěji za přítomnosti *Streptococcus viridans*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis* nebo skupiny HACEK (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*), v menším procentu případů ji vytváří stafylokoky. Nejrizikovější částí populace jsou osoby s vrozenou srdeční vadou a drogově závislí.

Mezi faktory, které zvyšují nebezpečí počátku onemocnění, patří bikuspidální aortální chlopeč, perzistující tepenná dučej, stenóza plicnice a poškození septa komor (Klener et al., 2011).

Nabíráme nejméně 3 páry hemokultur v hodinových rozestupech, vyšetříme krevní obraz a diferenciální rozpočet, stanovíme ureu, elektrolyty, kreatinin, CRP a jaterní testy (Ball a Phillips, 2004). Každý desátý pacient infekční endokarditidě podlehne.

2 VZNIK SEPSE

2.1 Průnik bakterií do krve

Nejprve dochází k množení bakterií v oblasti vstupu infekce. Bakterie přilnou ke kožním či slizničním buňkám, po té pronikají do subepiteliálních tkání.

V první fázi obrany organismu proti infekci se zapojují neadaptivní imunitní mechanismy. Souhrnně můžeme tyto imunitní pochody přirovnat k bariérám, které znesnadňují nebo zcela znemožňují usídlení a pomnožení mikroorganismů (Votava, 2005). Mezi zmíněné bariéry patří kůže s normální kožní mikroflórou, sliznice, hlen, řasinkový epitel nebo kyselé pH žaludku. Neúspěšná imunitní odpověď v místě infekce umožní pronikání patogenních mikroorganismů do okolí včetně cévního systému a najdou-li zde vyhovující podmínky, začnou se hojně množit (Potužník, 1978).

Imunitní nástroje, které napadají a likvidují bakterie šířící se tělem hostitele, obvykle rozdělujeme na buněčné (fagocytóza) a humorální, kde hlavní roli hraje komplement, lysozym, bazické polypeptidy, interferony, cytokiny a proteiny akutní fáze. Ty jsou soustředěny obzvláště na identifikaci chemických látek typických pro mikroorganismy (Hořejší a Bartůňková, 2005).

Specifická imunita se po setkání s daným agens pomalu vyvíjí a zahajuje svou odpověď se zpožděním, hlavním prvkem jsou zde T a B-lymfocyty (Hořejší a Bartůňková, 2005).

2.2 Primární zdroj infekce

Primární zdroj infekce se může vyskytovat kdekoliv. Kožní infekce, infekce z centrálního žilního katetru, močové či gastrointestinální infekce, zápaly plic nebo místa chirurgických výkonů bývají nejčastějším místem vstupu mikroorganismů. Bakterie se mohou šířit po těle, vytvářet další ložiska a vážně ohrožovat pacientovo zdraví. Velmi

často je proces lokalizace ztížen patologickými procesy vyskytujícími se naráz nebo nasazením antibiotické terapie, která ovlivňuje mikrobiologické diagnostické postupy (Černý et al., 2005).

2.3 Původci infekcí krevního řečiště

Gramnegativní bakterie jsou častými patogenními mikroorganismy způsobující těžké sepse, tvoří 50 až 60 % nálezů v hemokulturách, grampozitivní bakterie se detekují u 30 až 40 % případů, dále se laboratoře setkávají i s kvasinkami (Ševčík, 1997).

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pneumoniae* se řadí podle Havlíka et al. (2002) mezi nejčastější původce infekcí krevního řečiště.

Existují ovšem další studie, podle kterých v současné době narůstá počet pozitivních hemokultur s nálezem koaguláza-negativních druhů stafylokoků a enterokoků (Čermák, 2008). Až 16 % infekcí podle Čermáka (2008) způsobují enterokoky, 13 % kmeny *Staphylococcus aureus*, pouze 6,4 - 6,9 % tvoří nálezy *E. coli*, mezi 3 - 5,6 % se vyskytuje *Klebsiella pneumoniae*, dalšími v pořadí jsou *Pseudomonas aeruginosa* (3,9 – 5,3 %), *Enterobacter sp.* (2,1 – 2,9 %) a *Acinetobacter sp.* (1,6 %).

Jen 12,4 % nálezů koaguláza-negativních stafylokoků má klinický význam, naprostá většina (87,6 %) záchytů je tedy řazena mezi kontaminace (Čermák, 2008).

Asi v 2 - 10 % případů potvrdí kultivační vyšetření výskyt anaerobních mikroorganismů v krvi pacienta, obzvláště *Bacteroides fragilis*, peptostreptokoky a peptokoky, ostatní anaerobní bakterie pak velmi vzácně (Ševčík, 1997). Sepse v takovýchto případech mají vážný a těžký průběh (Čermák, 2008).

Původ některých nemocí je spojen s invazí určitého mikrobiálního druhu. Zlatý stafylokok bývá vázán s akutní endokarditidou či sepsí objevující se brzy po popálení. Naopak *Pseudomonas aeruginosa* poukazuje na popáleniny dřívějšího charakteru.

Sepse často souvisí i s uroinfekcemi, kde hlavními původci jsou gramnegativní bakterie (zejména *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* apod.), mezi grampozitivní bakteriální zdroje nákazy patří

Staphylococcus aureus, *S. epidermidis* nebo *Enterococcus faecalis* či *E. faecium* (Bartoničková, 2000).

Nozokomiální sepsé způsobuje v největším měřítku *Staphylococcus aureus*.

2.4 Rizikové faktory

- Vyšší věk
- Těhotenství a šestinedělí
- Alkoholismus, narkomanie
- Močové a žilní katétrů
- Cukrovka, jaterní cirhóza, kardiovaskulární či plicní onemocnění, chronické selhání ledvin, obezita nebo malnutriční stavy
- Nádorové onemocnění, transplantace či umělé implantáty
- Imunodeficience (vrozené nebo získané v průběhu života)
- Operace, úrazy, invazivní zákroky

2.5 Mortalita

Infekce krevního řečiště jsou spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou (Seifert, 2009). Sepsé postihuje heterogenní skupinu pacientů včetně novorozenců. Mortalita pacientů s diagnózou SIRS se pohybuje v intervalech 6 - 27 %, sepsé 0 - 36 %, těžké sepsé 0 - 52 % a septického šoku 0 - 82% (Černý et al., 2005).

Počet úmrtí je srovnatelný s úmrtími v důsledku rakoviny tlustého střeva, plic či prsu dohromady. 750 000 osob je v USA ročně diagnostikováno. Denně zemře po celém světě 1400 lidí s touto diagnózou (Čermák, 2008).

Za posledních deset let ovšem došlo k poklesu úmrtí pacientů na závažnou sepsi a septický šok. Vždy záleží na včasném rozpoznání a na rychlé a adekvátní antibiotické léčbě.

3 DIAGNOSTIKA INFEKČÍ KREVNÍHO ŘEČIŠTĚ

3.1 Indikace hemokultivačního vyšetření

Infekce krevního řečiště doprovází typické klinické příznaky, které je nutné porovnat s výsledky laboratorní analýzy (Tabulka 1). Mezi nejdůležitější analytické ukazatele patří hladina C-reaktivního proteinu (CRP) a prokalcitoninu (PCT). Fyziologická hodnota PCT, která je nižší než 0,5 µg/l, roste při sepsi stokrát až tisíckrát a vzestup je dynamičtější než u CRP (Streitová a Zoubková, 2011).

Tabulka 1 : Hlavní klinické a laboratorní známky infekce krevního řečiště.

Klinické příznaky	Laboratorní známky
Febrilní stav	Leukocytóza
Hypotermie	Neutropenie
Tachykardie, tachypnoe	Trombocytopenie
Periferní vazodilatace	Laktátová acidóza
Rozvoj šoku	Změny jaterních a ledvinných funkcí
Mentální změny	Nárůst prokalcitoninu, CRP a cytokinů

3.2 Odběr biologického vzorku

Vyšetření je velmi citlivé na aseptické podmínky. Kontaminace znamená, že zkoumaný materiál byl sekundárně osídlen mikroorganismy (Melicherčíková, 2007). V případě nedodržení předepsaného postupu odběru, laboratoř nedokáže správně a rychle detekovat mikroorganismy v cévním řečišti.

3.2.1 Optimální parametry pro odběr hemokultur

Při podezření na sepsi se v optimálním případě nabírají dva až tři páry hemokultur (Cetkovský, 2004). Náběr se doporučuje uskutečnit za vzestupu tělesné teploty a to přibližně hodinu před jejím vrcholem. V případě, že pacient má po celou dobu fyziologickou tělesnou teplotu, odebereme hemokultury během dne s časovým odstupem. Obvykle se provádí standardní venepunkce periferní žíly.

3.2.2 Postup odběru

Hemokultivační lahvičky se před samotným použitím nechají ustálit na pokojovou teplotu a označí se štítkem s příslušnými identifikačními údaji. Zátku je nezbytné důkladně vydezinfikovat a vyčkat než antiseptické činidlo uschne. Obvykle se používá jódová tinktura.

Oblast, kde bude provedena venepunkce, otíráme dezinfekčním činidlem od centra k periférii. Přibližně jednu minutu vyčkáme, než antiseptikum zaschne. Následuje kontrolní stěr sterilním tamponem, díky kterému jsme schopni srovnat nález v hemokultuře s případnou kontaminací hemokultivační nádoby běžnou kožní mikroflórou. Jakmile ukončíme odběr vzorku, doporučuje se setřít tinkturu alkoholem z důvodu prevence možných alergických reakcí (Votava a Ondrovčík, 2002).

Ke zrušení účinku antibakteriálních látek v krvi je potřeba, aby odebraná krev zředila kultivační médium nejméně 10krát. Některé lahvičky mají vytvořený podtlak, který zajistí inokulaci adekvátního objemu krve. V optimálních případech se snažíme získat přibližně 20 ml žilní krve od dospělého jedince (8 - 10 ml na každou lahvičku) a za přísně aseptických podmínek rozdělíme získaný vzorek do dvou hemokultivačních nádobek. Na každou lahvičku použijeme nejlépe novou sterilní jehlu a lahvičky nezavzdušňujeme. Neprodleně po vstříknutí krve je potřeba obsah nádobky promísit.

Pokud od pacienta nezískáme požadovaný objem krve, celý vzorek dělíme na dvě poloviny. Nepodaří-li se nabrat více než 10 ml, přednost má lahvička pro aerobní

kultivaci, jelikož anaerobní kmeny tvoří méně než 10 % všech izolovaných mikroorganismů. Naopak množství nad 30 ml není spojeno s kvalitnějším či rychlejším dosažením výsledků. Čím se objem vzorku krve na hemokulturu blíží předepsané normě, tím docílíme včasnějšího záchytu (Votava a Ondrovčík, 2002).

Kojenci a děti mají často vyšší koncentrací bakterií v krvi, proto v některých případech postačí pro důkladnou analýzu i menší objem vzorku (1 ml) nebo 1 % cirkulujícího objemu krve dítěte.

Méně vhodný způsob je odebrání krve z centrálního žilního katetru, podobně jako odběr z dříve zavedených periferních katetrů. Nezpochybnitelnou nevýhodou takto získaného vzorku je velmi vysoké riziko kontaminace. Mezi mikroorganismy spojené s infekcí katetru patří *Staphylococcus aureus*, koaguláza negativní stafylokoky, *Corynebacterium sp.* a kvasinky (obzvláště druh *Candida*). Při odběru krve z nově zavedených periferních katetrů počítáme s nižším rizikem kontaminace a můžeme tohoto způsobu využít, není-li možno provést standardní venepunkci. Postupujeme tak, že odpojíme spoj katetru, sterilní jehlou odebereme alespoň 1 ml krve, až potom nabereme potřebný vzorek krve za použití nové jehly.

Optimální podmínky zahrnují dva nebo tři odběry, a to nejlépe s třiceti až šedesáti minutovým odstupem. Při více odběrech v průběhu jednoho dne označíme pořadí odebraných hemokultur i stěrů z kůže. Pokud zcela výjimečně provedeme jen jednu kultivaci, musíme brát v potaz, že kontaminace dosahuje 1 - 4,5 % a interpretace nálezu je velmi obtížná (Černý et al., 2005).

3.2.3 Nejčastější chyby

Vyšetření kromě analýzy obsahuje i přípravu pacienta, samotný náběr, transport získaného materiálu do laboratoře a přípravné práce (Průša et al., 2012). Vlastní analýza zahrnuje z tohoto procesu pouze 26 %, zatímco preanalytická část (ať mimo laboratoř nebo uvnitř laboratoře) tvoří 56 % a zbývajících 18 % zaujímá postanalytická fáze, kde hlavní slovo má ordinující lékař (Racek et al., 2006).

Až 60 % veškerých vzniklých nedostatků se objevuje v preanalytickém procesu. Nejvíce chyb se vyskytuje v době od indikace vyšetření po zahájení vyšetření biologického materiálu. Systémy interní kontroly a zapojení laboratoře do externích kontrol kvality značně eliminují chyby analytického procesu (Zima, 2013).

Pacient při venepunkci musí být v klidu a jeho paže by měla být natažená a uvolněná, bez nápadných jizev či krevních výronů. Materiál odebíráme z jiné ruky, než je zaveden katétr s infuzí (Zima, 2013).

Jakmile provedeme dezinfekci okolí místa vpichu, nelze znovu palpat žílu. V případě obtížné vizualizace cévy a nutnosti opětovné palpce si nasadíme sterilní rukavice nebo opakujeme postup dezinfekce a to od centra k postranním částem. Případná kontaminace vzorku bakteriemi na povrchu kůže pacienta by zapříčinila falešně pozitivní výsledek. Nepodaří-li se nám venepunkce napoprvé, musíme si pro opětovné nabodnutí žíly vzít pokaždé novou a sterilní jehlu. Při opakování odběru volíme různá místa pro vpich.

Vždy inokulujeme nejprve aerobní nádobku. Pro správnou interpretaci výsledků je důležité i řádné promíchání lahvičky, osm až desetkrát.

Existuje doporučení, že po odběru krve na hemokulturu je vhodné vyměnit injekční jehlu a do příslušné hemokultivační nádoby krev vstříkovat tou jehlou, kterou jsme nepoužili při náběru, jelikož se na jejím povrchu mohla usadit mikroflóra nacházející se fyziologicky v místě mazové žlázy, jež jsme náhodou narušili při průniku jehly do žíly. Výměna jehly tedy sníží procento kontaminace hemokultury přirozenou kožní mikroflórou (Votava a Ondrovčík, 2002). Jiné práce tvrdí, že riziko není tak veliké a můžeme tento krok vynechat.

Vysoká pravděpodobnost průkazu patogenů je tehdy, když biologický materiál od vyšetřovaného zajistíme před antibiotickou léčbou. V tom případě nehrozí negativní ovlivnění růstu inokula a vyvarujeme se chybnému vyhodnocení výsledku - tzv. falešné negativitě. V případě, že je pacient již léčen, je možné přistoupit i ke krátkodobému vysazení užívaných léků před provedenou hemokultivací. Pokud ze závažných důvodů nelze léčbu přerušit, krev odebereme těsně před příští dávkou antibiotika, tedy v době,

kdy je hladina antibiotika v krvi nejnižší. Je nezbytné podávaná farmaka zaznamenat na žádanku.

3.3 Transport vzorku

Odebrané hemokultivační lahvičky s kontrolním stěrem co nejdříve (obvykle do dvou hodin) transportujeme do příslušné mikrobiologické laboratoře, jelikož se mikroorganismy začínají množit v hemokultuře již před umístěním do hemokultivačních systémů.

Pokud nejsme schopni materiál transportovat ihned, nejlepším způsobem skladování hemokultur je při pokojové teplotě a mimo přímé světlo. Nikdy bychom lahvičky neměli umísťovat do chladniček. Tím bychom dobu následné kultivace i detekce pozitivních hemokultur značně prodloužili nebo zcela znemožnili. Tento způsob uchování by neměl přesáhnout jeden den.

Odběrový tampon přenášíme v transportní půdě taktéž při pokojové teplotě, což umožňuje přežití klinicky významných patogenních druhů (Ryšková, 2000).

V laboratoři se hemokultury neprodleně vkládají do automatického kultivačního systému, zde se vytváří vhodné prostředí pro růst kolonií.

Předběžné výsledky u pozitivního nálezu můžeme očekávat v rámci 24 hodin. Čas, kdy interpretujeme negativní výsledek, je zhruba týden.

4 AUTOMATICKÉ SYSTÉMY HEMOKULTIVACE

4.1 Hemokultivace

Posuzujeme vzorek žilní krve optimálního objemu odebraný do hemokultivačních lahviček za přísně aseptických podmínek nemocnému v určitém čase a z určitého místa. Hlavní význam spočívá ve zrychlení diagnostických procesů v mikrobiologii, tím napomáhá lékařům i ostatním pracovníkům laboratoře, kteří hemokultury bez tvorby CO₂ nevyočkovávají na půdy.

4.2 Kultivační média

Obvykle se používá tryptózo-sojový bujon (TSB), bujon z mozkosrdcové infuze (BHIB, *brain-heart infusion broth*) či bujon Columbia. U komerčních souprav často nebývá složení médií uvedeno. V minulosti jsme se nejčastěji setkali s Hemotestem I, který obsahoval iontoměniče namísto bujonu. Odebraná krev zbavená baktericidnosti sloužila jako vlastní kultivační medium. Iontoměniče se nacházejí v řadě systémech s bujonem a potlačují účinek komplementu i lysozymu a inhibují aminoglykosidy. Do kultivačního média se jako antikoagulans vkládají polyanetolsulfonáty sodné. Nevýhodou tohoto antikoagulančního činidla je negativní účinek na meningokoky i peptostreptokoky nebo gonokoky. Tento nežádoucí vliv se vyloučí přidáním 1,2 % želatiny. Za osmotický stabilizátor je považována 10 až 30 % sacharóza, takto vysoká koncentrace sacharózy ovšem zapříčiňuje hemolýzu červených krvinek. Hemolyzované erytrocyty mohou způsobit potíže při odečítání vzorku. Do kultivačních médií výrobci mnohdy přidávají pryskyřici z důvodu adsorpce antibiotik (Votava a Ondrovčík, 2002).

4.3 Podmínky kultivace

Růst a množení všech organismů podléhá vlastnostem daného prostředí. Nejmarkantnější vliv má dostupnost vody, živin, teplota, pH, přítomnost či nepřítomnost kyslíku, oxidoredukční potenciál, osmotický tlak, vliv záření nebo třeba přítomnost jiných mikroorganismů či toxických látek. Ideální teplota pro kultivaci se nalézá v intervalu od 35 °C do 37 °C (Votava a Ondrovčík, 2002).

Vakuum napomáhá při odběru vzorku, usnadňuje odebrání dostatečného objemu krve. Pro detekci na kyslíku závislých mikroorganismů je lepší zrušit vakuum u jedné z lahvíček pomocí jehly utěsněné sterilní vatou.

Anaerobní hemokultury obsahují atmosféru, která snižuje redox potenciál bujónu. Nejnovější práce tomuto přípravku připisují menší význam, hovoří o tom, že hodnota redox potenciálu medií v aerobních lahvíčkách s odsátou atmosférou postačí k odstartování růstu klinicky důležitých anaerobů (Votava a Ondrovčík, 2002). Anaerobní lahvička ale zvyšuje pravděpodobnost záchytu i fakultativně anaerobních bakterií díky zvýšenému objemu kultivované krve. Kultivace by měla trvat po dobu pěti až sedmi dnů.

4.4 Princip systému BACTEC

Přístroj BACTEC (série 9000) používají laboratoře klinické mikrobiologie k odhalování mikrobiálního růstu v hemokultivačních nádobkách. Jedná se o automatický hemokultivační systém, jehož principem je zjišťování koncentrace oxidu uhličitého. CO₂ vytváří bakterie, podobně jako lidé, oxidací Acetylu-KoA v citrátovém cyklu a je tedy běžným produktem jejich metabolismu (Bednář et al., 1996). K detekci plynu se využívá nejčastěji metod fluorescence.

Přístroj je nepřetržitě připojen k počítači, ten v pravidelných intervalech vysílá signály k zapojení detekčního systému. Ve spodní části hemokultivační lahvičky se nachází polopropustná membrána, která separuje senzitivní vrstvu. Membránou prostupuje pouze oxid uhličitý, který v senzitivní vrstvě ihned reaguje s přítomnou H₂O.

Vytváří se H_2CO_3 a v důsledku toho dojde k posunu pH k nižším hodnotám. Světlo vyzářené diodou je pohlceno fluoreskujícím materiálem v senzoru nádobky. Detektor pak změří úroveň fluorescence, která s klesajícím pH také klesá. Množství tohoto světla tedy odráží aktuální koncentraci CO_2 a přístroj tak nepřímo získá informace o bakteriích v lahvičkách (Čermák, 2008).

Mezi další možnosti detekce oxidu uhličitého patří fotometrické stanovení prostřednictvím záření v infračervené oblasti. Rovněž se využívalo i radiometrických metod, kdy laboratoře pracovaly s radioaktivním izotopem ^{14}C . Od těchto verzí se již ustupuje.

▪ **Práce s přístrojem**

Základní jednotkou je izolovaná a temperovaná skříň, ve které se nacházejí výkyvné bloky. Podle typu přístroje můžeme pracovat s 50 až 240 lahvičkami. Držadla k umístění nádobek jsou vybavena kontrolkami zelené a červené barvy. Průběh každé kultivace mapuje nepřetržitě počítačový program. Na pozitivní hemokulturu reaguje systém ihned zvukovým signálem a barevnou změnou kontrolky. Přístroj označí i negativní hemokultury po uplynutí předepsané doby kultivace. Jednotlivé bloky jsou vytápěny samostatně a systém je vybaven náhradním zdrojem energie z důvodu možné havárie (Čermák, 2008).

4.4.1 Hemokultivační lahvičky systému BACTEC

Hovoříme o diagnostické hemokultivační soupravě s určitým kultivačním médiem a atmosférou předepsaného složení a vlastností, která je vybavená detekčním systémem.

Plus Aerobic/F lahvička se používá pro zjišťování bakterií, hub i plísní. Plus Anaerobic/F je vhodná pro růst anaerobních či fakultativně anaerobních bakterií. PEDS Plus/F se využívá pro detekci aerobních bakterií, hub či plísní u pediatrických pacientů. Lahvičky jsou popsány v Příloze č. 1 a č. 2 (Tabulka 7 a 8).

4.5 Princip systému BacT/ALERT

BacT/ALERT odlišuje pozitivní hemokultury od negativních díky bakteriální produkci oxidu uhličitého. Využívá při tom kolometrické senzory, které jsou umístěny v každé hemokultivační nádobě (Čermák, 2008). Polopropustná membrána reguluje průchod a tok látek. Oxid uhličitý volně prochází, reaguje s vodou a mění hodnotu pH. Kyselé prostředí působí na senzor a dochází k barevné změně indikátoru ze zelené na žlutou. Kultury jsou monitorovány, vyhodnocovány několikrát do hodiny a výsledek podléhá rovněž zvukové i světelné signalizaci.

BacT/ALERT lahvička pro aerobní kultivaci s inhibitory ATB má označení FA. Zkratka FN náleží BacT/ALERT lahvičce vhodné pro anaerobní kultivaci s inhibitory ATB. Nádobka SA je BacT/ALERT lahvička pro standardní aerobní kultivaci, SN nese označení BacT/ALERT lahvička pro standardní anaerobní kultivaci a lahvička pro aerobní kultivaci v pediatrii se označuje PF.

4.6 Výhody kontinuálně monitorujících hemokultivačních systémů

1. Uzavřený systém znemožňuje kontaminaci v průběhu kultivačního měření.
2. Okamžité označení pozitivních nádobek a zkrácení detekčního času.
3. Finanční úspora za kultivační půdy, jelikož se vyočkovávají jen pozitivní lahvičky.
4. Menší množství personálu.

5 STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA HLAVNÍCH PŮVODCŮ SEPSE

5.1 Grampozitivní bakterie

- **Rod *Enterococcus***

Pro tento rod jsou charakteristické grampozitivní oválné koky, které se skládají do dvojic, řetízků či malých shluků. Jsou fakultativně anaerobní (Votava, 2003). Enterokoky jsou spojené se záněty močových a žlučových cest, meningitid, endokarditid a sepsí. V naprosté většině způsobuje infekce *Enterococcus faecalis* a v 7 % případů se setkáváme s *Enterococcus faecium* (Votava, 2003). Odlišná citlivost těchto druhů k antibiotické terapii vede k nutnosti identifikace izolovaných enterokoků (Votava a Ondrovčík, 2002).

- **Rod *Staphylococcus***

Fakultativně anaerobní, katalasapozitivní a oxidasanegativní koky, které měří přibližně 1 μm a uspořádávají se do tvaru hroznového vína. Rod *Staphylococcus* vyniká dobrou adaptací na zevní prostředí a s tím spojený vznik rezistence (Votava, 2003).

Staphylococcus aureus je řazen mezi koagulázapozitivní stafylokoky. U třetiny lidí se vyskytuje na povrchu kůže, sliznic dýchacího ústrojí i v gastrointestinálním traktu a nezpůsobuje žádné potíže (Staňková et al., 2008). Obranné mechanismy člověka překonává v případě poškození kůže nebo nejrůznějších poruch imunity, vše může vyústit až ve smrtelné sepse (Votava, 2003).

Kmeny *Staphylococcus aureus* vytvářející exotoxin T 1 vyvolávají syndrom toxického šoku, k průkazu toxinu se využívá reverzní pasivní latexová aglutinace či precipitace v gelu (Votava a Ondrovčík, 2002).

Spojujeme s ním tvorbu hnisavých abscesů a často zapříčiňuje infekce cévní nebo chlopenní. Sekundární ložiska se nalézají často v plicích, ledvinách, kostech, CNS, slezině, myokardu nebo v kůži. Rezistentní nemocniční kmeny osídľují oblast

chirurgických ran. Mortalita u nosokomiálních nákaz se se vyskytuje u 20 % případů, obzvláště rizikové jsou stafylokokové pneumonie postihující staré osoby či novorozence (Votava a Ondrovčík, 2002). Devadesát procent stafylokoků nereaguje na penicilin, proto se využívá nejčastěji oxacilin. Methicilin-rezistentní zlatý stafylokok (MRSA) je odolný kromě methicilinu i vůči ostatním ATB ze skupiny beta-laktamů, vůči makrolidům a fluorochinolonům (Jedličková, 2009).

Staphylococcus epidermidis společně s *S. haemolyticus* a dalšími patří do skupiny koagulázanegativních stafylokoků. Je běžnou součástí kožní, slizniční mikroflóry a bývá často spojen s kontaminací hemokultivační lahvičky při odběru nebo při přípravě analýzy v laboratoři. V jistých případech může mít *Staphylococcus epidermidis* patogenní význam a podílí se na rozvoji sepse, např. v důsledku infekce na umělých srdečních chlopních nebo zavedením jiných cizorodých materiálů, u oslabených či imunosupresivních pacientů (Votava a Ondrovčík, 2002).

▪ **Rod *Streptococcus***

Fakultativně anaerobní, grampozitivní a katalázanegativní koky, které se vyrovnávají do dvojic nebo řetízků. Rozeznáváme u nich hemolýzu beta, alfa a gama (Votava, 2003).

Streptococcus agalactiae se řadí mezi beta-hemolytické streptokoky skupiny B s pozitivním CAMP-testem. *Streptococcus agalactiae* je součástí vaginální mikroflóry u 15 % těhotných žen, u 20 % žen s opakujícími se záněty urogenitální oblasti a u 30 % žen v době blížícího se porodu. Časná forma infekce u novorozence je spojená s pneumonií či sepsí a úmrtnost je až u poloviny případů. Purulentní meningitida s mortalitou dosahující až 25 % je charakteristická pro pozdní formu nemoci u dětí do tří měsíců (Votava a Ondrovčík, 2002). U rizikových gravidních žen s hrozícím předčasným porodem se doporučuje kultivační vyšetření výtěru z pochvy i rekta ve 35. týdnu (Staňková et al., 2008).

Streptococcus pneumoniae je alfa-hemolytický streptokok, jehož grampozitivní opouzdřené koky se vyskytují ve dvojicích nebo krátkých řetízích. Pneumokoky se vyskytují v nosohltanu u 5 – 70 % populace (Greenwood, Slack a Peutherer, 1999).

Prvotním ložiskem pneumokokové sepse bývají infekce ve středoušní dutině, vedlejších nosních dutinách a dýchacích cestách. Pneumokoková meningitida, peritonitida, pneumonie či endokarditida podtrhuje vážnost pacientova stavu (Staňková et al., 2008). Letalita u bakteriemií dosahuje 25 %. Patogenita pneumokoků je umocňována jejich polysacharidovým pouzdem chránícím před fagocytózou a přítomností hyaluronidázy (Votava, 2003).

Streptococcus pyogenes společně s pneumokokem patří k nejvíce patogenním druhům tohoto rodu. Vyvolává hnisané infekce hltanu a kůže. Způsobuje různá onemocnění (angínu, spálu, růži, pneumonii, meningitidu, sepsi a dřívější horečku omladnic). I přes dobrou citlivost k penicilinu zůstává hrozbou (Votava, 2003).

Rizikem jsou rovněž pozdější následky streptokokových nákaz, akutní glomerulonefritidy a revmatické horečky (Votava a Ondrovčík, 2002).

Streptococcus mutans je grampozitivní bakterie, která patří do skupiny orálních streptokoků. Tyto oportunní patogeny pronikají do oběhu během žvýkání a u oslabených jedinců mohou zapříčinit subakutní bakteriální endokarditidu neboli loudavou sepsi. Bakteriémie se může objevit i u nedonošených novorozenců (Votava, 2003).

5.2 Gramnegativní bakterie

▪ Rod *Acinetobacter*

Skupina G⁻ nefermentujících bakterií, které se nalézají ve vodě, zemi i potravinách. *Acinetobacter baumannii* a *A. ursingii* jsou nejčastěji detekovaným druhem z hemokultur (Votava, 2003). Setkáváme se s tímto rodem na sliznicích dýchacího systému či na vlhkých zapárákách kůže hospitalizovaných osob (Votava a Ondrovčík, 2002).

- **Rod *Burkholderia***

Burkholderia cepacia byla dříve označována *Pseudomonas cepacia*. Jedná se o gramnegativní bakterii tyčkovitého tvaru, která se běžně vyskytuje v prostředí a je rezistentní na řadu antibiotických přípravků (Carey, Schuster a McGowan, 2011).

- **Rod *Enterobacter***

Klinicky významnými zástupci jsou *E. aerogenes* a *E. cloacae*. Uplatňují se u infekcí močových a dýchacích cest. Je nutné odlišit enterobaktery od klebsiel, jelikož enterobakter nereaguje na cefalosporinová antibiotika I. a většinou i II. generace (Votava a Ondrovčík, 2002).

- **Rod *Escherichia***

Escherichia coli vytváří na Endově agaru purpurové kolonie, štěpí glukózu a laktózu za tvorby plynu, produkuje indol a neštěpí močovinu. Pestrá směs různých sérotypů způsobuje zejména infekce močového systému, infekce operačních ran, dýchacích cest, meningitidy a sepse (Votava a Ondrovčík, 2002). Enteropatogenní kmeny vyvolávají průjmy novorozenců. Enteroinvazivní *E. coli* mají vliv na infekce gastrointestinálního ústrojí.

- **Rod *Klebsiella***

Nejvýznamnější *Klebsiella pneumoniae* obývá mimo jiné zažívací trakt člověka a za patologického stavu způsobuje infekce močových a dýchacích cest.

Sepse se objevuje u hospitalizovaných pacientů často s maligními nálezy. Tyto kmeny jsou vysoce rezistentní a zdrojem nákazy mohou být močové cévky, ventilátory, inhalační aparatury apod. Mimo *Klebsiella pneumoniae* bývá ze vzorků mnohdy identifikována i *Klebsiella oxytoca* (Votava a Ondrovčík, 2002).

- **Rod *Neisseria***

Gramnegativní aerobní bakterie vytvářející diplokoky a jejich přítomnost v hemokultuře je závažným nálezem (Votava, 2003).

Neisseria meningitidis - odběr hemokultur má významný vliv pro stanovení diagnózy hnisavé cerebrospinalní meningitidy a doplňuje vyšetření likvoru. Meningokok vstupuje přes nosohltan lymfatickými a krevními cestami do subarachnoideálního prostoru a zapříčiňuje zánět mozkových plen. Sepsí doprovází intravaskulární koagulace s hemorhagickou diatézou. Nalézáme i sekundární ložiska. 20 % případů plně rozvinuté sepse vede ke smrti pacienta (Votava, 2003).

- **Rod *Proteus***

Druhy protea lze nalézt ve střevním obsahu, také v půdě a hnilých odpadcích bohatých na proteiny. Patologické nálezy jsou spojeny s chronickými infekcemi močových cest. Nacházíme ho i ve výtěrech kožních lézí, u cholecystitidy, v dekubitech apod. Faktor usnadňující vznik proteové infekce je diabetes či léčba širokospektrými antibiotiky, na které může být proteus rezistentní.

- **Rod *Pseudomonas***

Pseudomonas aeruginosa patří mezi podmíněně patogenní druhy rodu *Pseudomonas*. Vyskytuje se mimo jiné v odpadních vodách, v nemocnicích se nacházejí ve výlevkách umyvadel, zvlhčovačích, plicních inhalátorech nebo na kartáčcích sloužících k mytí (Votava a Ondrovčík, 2002). Pseudomonádové sepse činí 10 - 11 % veškerých sepsí a úmrtnost s nimi spojená se blíží 60 % (Černý et al., 2005). Přispívá k tomu jejich rezistence k mnohým desinfekčním roztokům a řadě antibiotikům. Místem vstupu infekce je nejčastěji oblast urogenitálního traktu, popálenin, kůže nebo středního ucha při chronických zánětech. Kromě *Pseudomonas aeruginosa* se setkáváme i s dalšími druhy jako s původci nosokomiálních nákaz: *P. alcaligenes*, *P. mendocina* nebo *P. putida* (Votava a Ondrovčík, 2002).

- **Rod *Salmonella***

Salmonely se uplatňují v nemocničních nákazách vzniklých díky kontaminované potravě, pití nebo používaných zdravotnických pomůcek, ale mohou se objevovat i v dalších kolektivech mimo tato zařízení (Votava a Ondrovčík, 2002).

5.3 Anaerobní bakterie

Udává se, že 2 – 10 % bakteriemií vzniká přítomností anaerobních mikroorganismů (Černý et al., 2005). Velký podíl na vzniku anaerobních sepsí patří nesporelujícím gramnegativním tyčkám, tzv. bakteroidům. Bakteroidy se nalézají v orofaryngu a v ženském genitálním ústrojí. Kromě rodu *Bacteroides* se objevují zástupci rodů *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium* či *Actinomyces* (Votava a Ondrovčík, 2002). Závažné onemocnění vyvolávají rovněž bakterie z rodu *Clostridium*. Nedostatečné prokrvení tkání a hypoxie usnadňuje rozvoj těchto infekcí (Votava a Ondrovčík, 2002).

5.4 Kvasinky

90 % případů sepse je zapříčiněno bakteriální infekcí (Beneš, 2009). Mykotické infekce postihují pacienty s oslabeným imunitním systémem (infekce HIV), s kortikosteroidní a antibakteriální terapií nebo osoby se zavedenými kanylami či po transplantacích (Votava a Ondrovčík, 2002). Jedná se zejména o zástupce rodu *Candida* nebo *Aspergillus*. Klinicky se sepse neliší od sepsí způsobených bakteriemi, ale rozdíl je v léčebných postupech. V některých případech může probíhat kandidová sepe bez pozitivních hemokultur, proto se doporučuje nasazení antimykotické léčby v následujících stavech: pozitivní hemokultura je podtržena záchytem totožných kvasinek v moči; nález v hemokultuře je negativní, ale kvasinky byly zachyceny v bioptickém vzorku; sepsi provází kvasinková endoftalmitida (Potužník, 1978). Zjištění kandid z krve je úspěšné pouze u 50 – 70 % osob s touto diagnózou (Cetkovský a Kouba, 2009).

Aspergilová sepe vychází z prvotního ložiska v plicích (Potužník, 1978). Jejich spóry jsou všudypřítomné a vdechnutím se se dostávají do lidského organismu. U některých osob může být vyvolána invazivní aspergilóza s mortalitou dosahující 50 až 100 % (Cetkovský a Kouba, 2009). Detekce druhů z rodu *Aspergillus* se mnohdy považuje za kontaminaci, ale vždy musí dojít ke konzultaci s ošetřujícím lékařem.

VÝZKUMNÁ ČÁST

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Cíle práce

1. Osvojit si metody zpracování hemokultur od samotného odběru vzorku až po vyšetření automatizovaným systémem BACTEC.
2. Zhodnotit nálezy u mužů, žen a dětí.
3. Porovnat výskyt bakteriálních kmenů podílejících se na rozvoji sepse v konkrétní oblasti s informacemi v odborné literatuře.
4. Vypočítat procento falešně pozitivních vzorků a zjistit nejčastější kontaminanty.

6.2 Hypotézy

1. Sepsí mohou vyvolat infekční agens různých skupin.
2. 50 - 60 % sepsí přivodí gramnegativní bakterie, 30 – 40 % grampozitivní mikroorganismy a zbylá procenta tvoří zejména kvasinky.
3. 2 – 10 % infekcí krevního řečiště způsobují anaerobní bakterie.
4. Předpokládám, že nejčastějším kontaminantem je *Staphylococcus epidermidis*.

6.3 Charakteristika souboru vyšetřovaných vzorků

Materiály potřebné k vytvoření této práce byly získávány v Městské nemocnici Plzeň, PRIVAMED a.s. Byly vyhodnoceny všechny hemokultury odebrané v průběhu

jednoho roku (od září 2013 do srpna 2014). Ze vzorků vykazující pozitivitu, byl vytvořen mikroskopický preparát dle Grama. Na základě mikroskopického nálezu byl vyočkován obsah lahvičky na vhodné kultivační půdy a byly založeny orientační testy citlivosti na antibiotika.

6.4 Přístroje, reagentie a laboratorní pomůcky

Automatizovaný hemokultivační systém BACTEC 9050

Termostat MEMMERT BE 500 (37 °C)

Termostat MEMMERT INCO2 (37 °C, zvýšená tenze CO₂)

Termostat MEMMERT BE 400 (30 °C)

Mikroskop OLYMPUS BX 41

Lahvičky s kultivačními půdami a indikátorem

Bactec Plus aer.

Bactec Plus anaer.

Bactec Plus ped.

Gumové rukavice

Skříčka pro mikroskopii

Injekční jehly a stříkačky

Kultivační půdy

6.5 Princip výzkumné části

Inokulované aerobní a anaerobní lahvičky jsou ukládány do přístroje, který vytváří vhodné prostředí pro kultivaci a poskytuje nepřetržitou kontrolu přítomnosti mikroorganismů v nádobkách. Fluorescenční senzor detekuje mikrobiální tvorbu CO₂ vznikajícího v důsledku metabolizování substrátu kultivačního média. Ve spodní části

lahvičky dochází k barevné změně senzoru, zelená barva se proměňuje na žlutou. Systém upozorní na tuto reakci zvukovým a optickým signálem.

6.5.1 Preanalytická fáze v laboratoři

Odběr krve při podezření na infekci krevního řečiště provádí ošetřující lékař nebo sestra daného oddělení. Je nezbytné inokulovanou hemokultivační nádobku neprodleně transportovat do laboratoře. Materiál musí být označen pacientovými údaji a dodán s průvodním listem s daty potřebnými k dokumentaci v laboratorním informačním systému. Žádanky se ukládají do archivu. Hemokultivační lahvičky jsou označeny dvěma čárovými kódy, jeden slouží k načtení lahvičky přístrojem a druhý patří na průvodní list. Se vzorky se zachází dle zásad práce s biologickým infekčním materiálem.

6.5.2 Postup práce

Lahvičky pracovník laboratoře okamžitě promíchá a ihned umístí do kultivačního systému. Pomocí tlačítka s ikonou otočné šipky se zastaví rotor a otevřou se dveře přístroje. Po stlačení tlačítka s obrázkem nádoby se aktivuje čtecí zařízení čárového kódu. Po identifikaci lahvičky se na displeji ukáže pozice, kam následně materiál umístíme. Na zobrazovací jednotce je signalizováno obsazení jednotlivých poloh prázdným či plným kruhem. Inkubační doba trvá 5 dnů.

6.5.3 Negativní hemokultury

Po skončení inkubační doby je na negativní vzorky poukázáno znaménkem mínus, tyto hemokultury odebereme z přístroje a vše zdokumentujeme.

6.5.4 Pozitivní hemokultury

System BACTEC ohlásí zjištění mikroorganismů v hemokulturách zvukovým i světelným signálem, lahvičku je nutné vyndat a přečtením čárového kódu uvolnit její polohu v rotoru. Následně se vytvoří nátěr, který se obarví dle Grama. Podle mikroskopického preparátu se vybere vhodná kultivační půda a zakládají se orientační diskové citlivosti na antibiotika. Plotny jsou umístěny v termostatu při teplotě 37 °C a výsledek se hodnotí po uplynutí 17 až 24 hodin. Shaedlerův agar se využívá pro očkování materiálu z anaerobní nádoby, inkubace probíhá 48 hodin za anaerobních podmínek.

6.6 Identifikace bakterií

6.6.1 Mikroskopický preparát

Gramovo barvení patří ke stěžním bodům mikroskopické identifikace. Díky různé stavbě bakteriální stěny rozlišujeme na obarveném preparátu grampozitivní (modrofialové) a gramnegativní (červené) bakterie. Nejprve se provede fixace vzorku nad plamenem. Krystalová violet v buňkách reaguje s Lugolovým roztokem tvorbou komplexu, který je v případě grampozitivní skupiny bakterií odolný alkoholovému účinku a zůstává modrofialové zbarvení. U gramnegativních bakterií dojde působením acetonu k vyplavení komplexu a typické červené zbarvení získáme převrstvením preparátu karbolfuchsinem nebo safraninovým roztokem. Mezi jednotlivými kroky necháváme 20 – 60 vteřin (Juránková, 2011). Dnes se využívá přístrojové barvení sklíček.

6.6.2 Kultivace – přehled nejčastěji využívaných půd

Krevní agar je vyroben z přírodního polysacharidu, lze na něm kultivovat většinu běžně rostoucích bakterií a přítomnost 7 % beraní krve umožňuje prokázat

hemolytické reakce některých druhů. Čokoládový agar se využívá pro kultivaci náročných kmenů, např. hemofilů nebo neisserií. Endova půda podporuje růst G-bakterií, ukazuje štěpení laktózy a slouží k selekci enterobakterií. Desoxycholátový agar se řadí do skupiny selektivně diagnostických půd a slouží k diferenciaci salmonel a shigel. Schaedler agar byl vytvořen pro růst anaerobních mikroorganismů. Sabouraudův agar je půda využívaná pro záchyt kvasinek

Očkování na kultivační půdy se provádí sterilní bakteriologickou kličkou po jejím vyžháním nad kahanem.

6.6.3 Biochemická identifikace bakterií

Katalázový test – peroxid vodíků se rozkládá v přítomnosti katalázy na vodu a kyslík. Pozitivní reakce je doprovázena tvorbou bublinek O₂ a ukazuje na přítomnost bakterií rodu *Staphylococcus*, *Corynebacterium* nebo *Neisseria*. Negativní reakce je typická pro výskyt bakterií rodu *Streptococcus* a *Arcanobacterium*.

Bacitracinový test se využívá pro odlišení β-hemolytických streptokoků. Pozitivní výsledek hodnotíme v případě vytvoření zóny inhibice v okolí disku s bacitracinem, ve vzorku se nachází *Streptococcus pyogenes*. *Streptococcus agalactiae* má reakci negativní.

PYR test je spolehlivější než bacitracinový test. Přitiskne se diagnostický proužek na sledované kolonie a po 5 až 10 minutách se v případě positivity ukáže červené zbarvení. Tímto se prokázala přítomnost *Streptococcus pyogenes* nebo enterokoků.

Streptococcus pneumoniae od skupiny orálních streptokoků se rozlišuje prostřednictvím optochinového testu, opět sledujeme inhibiční zónu v okolí disku. Od dalších viridujících streptokoků se k diferenciaci využívá test rozpustnosti ve žluči.

Oxidázový test slouží k potvrzení nálezu bakterií například z rodu *Neisseria*, *Pseudomonas* nebo *Aeromonas hydrophila* a *Plesiomonas shigelloides*. Pozoruje se modré zbarvení na filtračním papírku diagnostického proužku.

Rezistence k novobiocinu slouží k odlišení *Staphylococca saprophytica* od ostatních plazmakoaguláza negativních stafylokoků.

Hydrolýza tributyrinu se využívá k diferenciaci *Branhamella catharalis*.

7 VÝSLEDKY

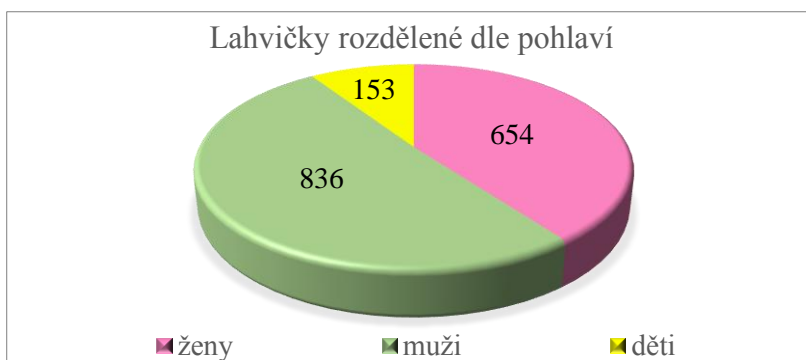
7.1 Roční analýza

Od září 2013 do srpna 2014 bylo v Městské nemocnici Plzeň, PRIVAMED a.s. provedeno 1643 hemokultivací (Tabulka 2). 1359 analyzovaných hemokultivačních lahviček bylo negativních (82,71 %). Inkubace probíhala od 1 do 5 (max. 6) dní a průměrná doba hlášení pozitivní hemokultury činila 2,2 dní. Nejčastěji byl materiál odebírán mužům (836 lahviček), 654 lahviček patřilo ženám a 153 dětem (Graf 1).

Automatický hemokultivační systém BACTEC označil během sledovaného období 284 pozitivních hemokultivačních lahviček (aerobních, anaerobních a pediatrických), které tvořily 17,3 % (Graf 2). Jednalo se o vzorky získané od 160 pacientů. Přítomnost patogenních mikroorganismů se však potvrdila u 118 jedinců a 42 hemokultur laboratoř vyloučila pro kontaminaci. IKŘ se prokázala u 72 mužů, 42 žen a 4 dětí.

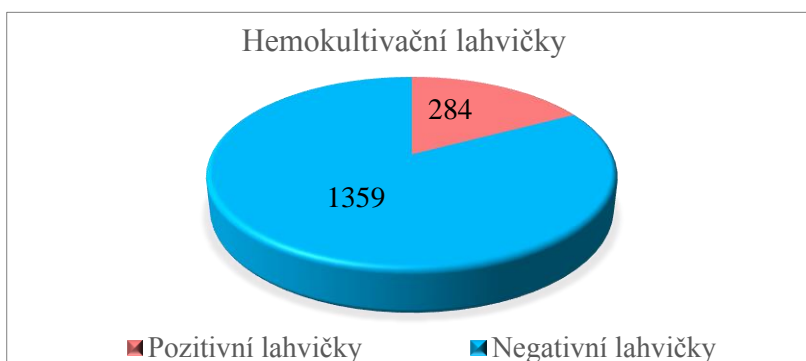
Tabulka 2: Analyzované hemokultivační lahvičky v průběhu sledovaného období.

Měsíc	Ženy	Muži	Děti	Celkem lahviček	Pozitivní lahvičky	Negativní lahvičky
09/13	50	64	12	126	27	99
10/13	52	72	14	138	27	111
11/13	48	76	10	134	30	104
12/13	44	78	13	135	26	109
01/14	72	56	17	145	18	127
02/14	64	78	17	159	23	136
03/14	54	66	10	130	23	107
04/14	52	70	23	145	25	120
05/14	62	44	14	120	20	100
06/14	36	70	9	115	19	96
07/14	56	74	9	139	9	130
08/14	64	88	5	157	37	120
Součet	654	836	153	1643	284	1359



Graf 1:

Hemokultivační lahvičky rozdělené dle pohlaví.



Graf 2:

Hemokultivační lahvičky rozdělené dle positivity a negativity.

7.2 Analýza výsledků jednotlivých měsíců

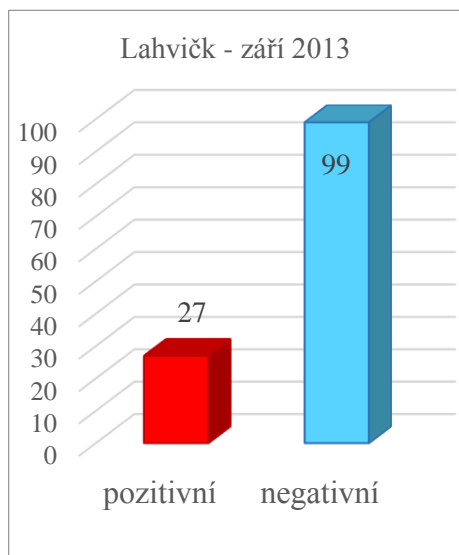
Během sledovaného období se laboratoř v průměru setkávala s 113 negativními a 24 pozitivními hemokultivačními nádobkami.

Ačkoli únor je nejkratším měsícem v roce, bylo vyšetřeno nejvíce pacientů. Laboratoře zaznamenaly 159 hemokultivací.

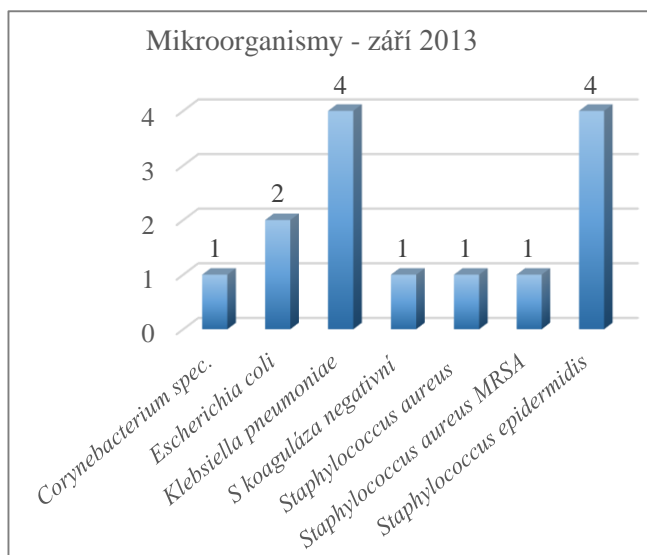
Srpen vynikal nárůstem zachycených mikrobiálních kolonií v hemokulturách, rovněž převyšoval ostatní měsíce v množství kontaminací. Celkem bylo v srpnu analyzováno 37 lahviček, které označil přístroj jako pozitivní.

V plzeňské městské nemocnici tvoří většinu pacientů dospělí jedinci. Duben se zapsal jako měsíc s nejvyšším počtem podezření na bakteriémii u dětí, bylo zkoumáno 23 pediatrických lahviček. U jednoho dítěte se odhalila přítomnost bakterie a jednalo se o výskyt *Branhamella catarrhalis*, 22 případů se nepotvrdilo. *Klebsiella pneumoniae* a *Streptococcus viridans* ohrozili zdraví dvou dětí v květnu. Poslední pozitivitu u dětského pacienta způsobila *Escherichia coli* v červenci.

Měsíc **září** se do databáze zapsal 27 pozitivními a 99 negativními hemokultivačními lahvičkami (Graf 3). Nejčastěji se v odebraném materiálu nacházela *Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus epidermidis* (Graf 4).

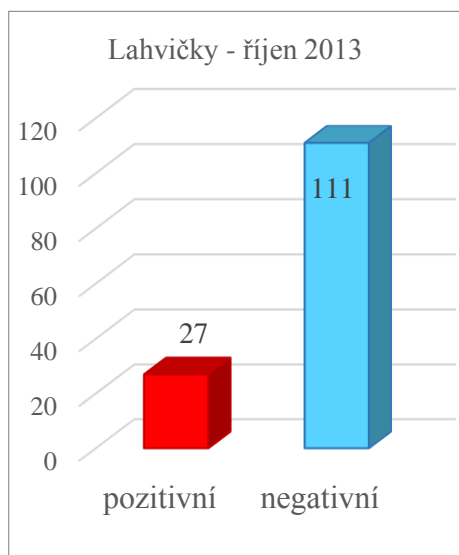


Graf 3: Hemokultivační lahvičky 9/2013.

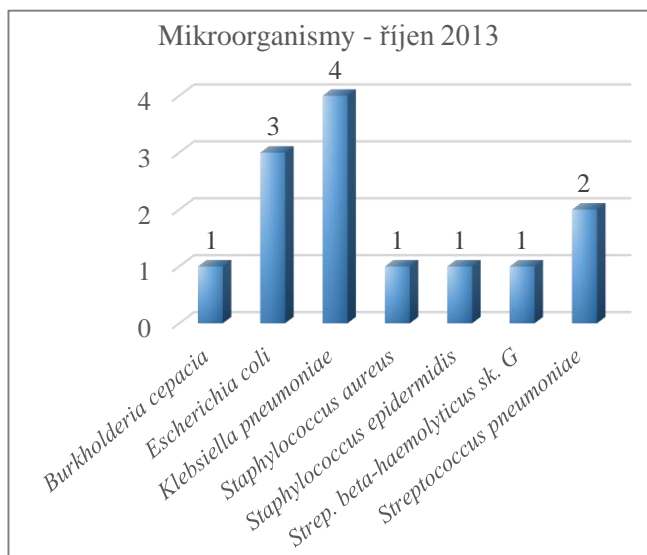


Graf 4: Nálezy u pacientů v září 2013.

V **říjnu** se potvrdil výskyt sedmi různých mikroorganismů. Jednalo se o 27 pozitivních lahviček a 111x byl výsledek negativní (Graf 5). *Klebsiella pneumoniae* byla detekována čtyřikrát a o jednu méně byla zachycena *E. coli* (Graf 6).

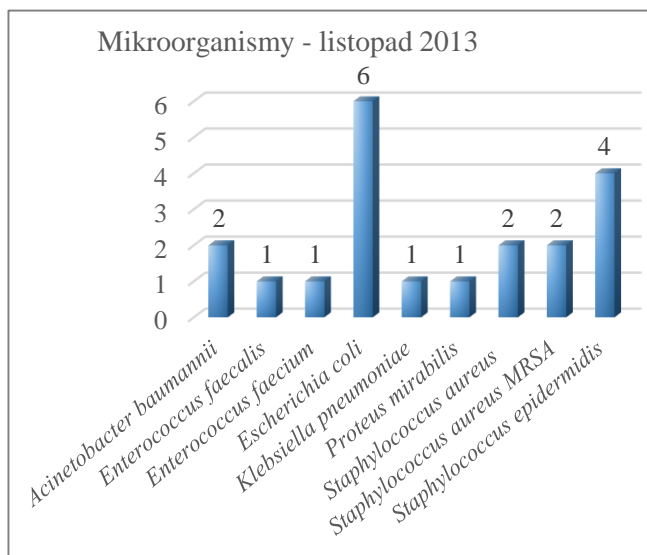
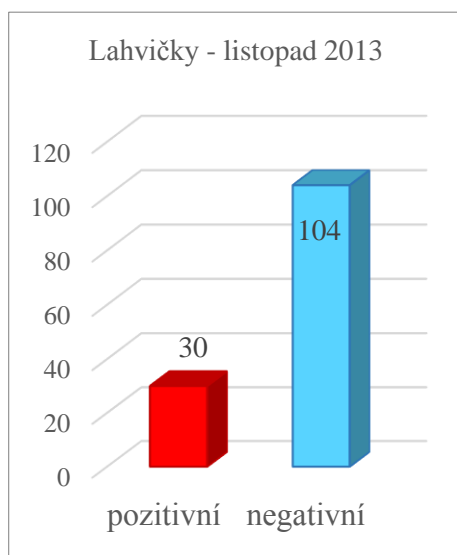


Graf 5: Hemokultivační lahvičky 10/2013.



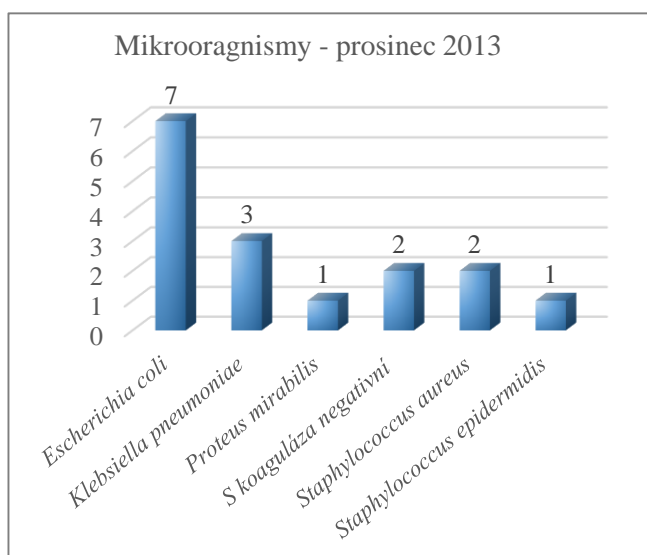
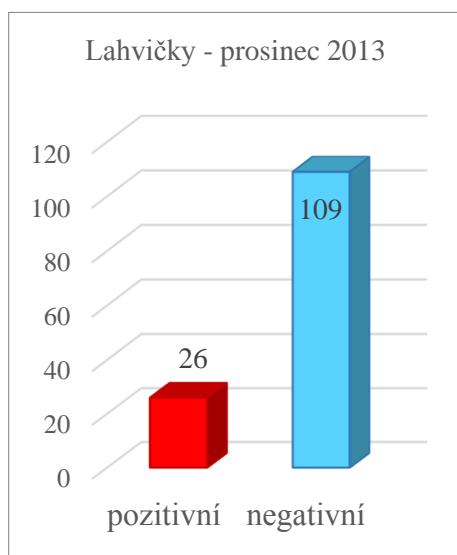
Graf 6: Nálezy u pacientů v říjnu 2013.

V **listopadu** bylo třicet pozitivních a sto čtyři negativních hemokultivací (Graf 7). *Escherichia coli* způsobila infekce krevního řečiště u 6 pacientů a *Staphylococcus epidermidis* byl zjištěn ve čtyřech případech (Graf 8).



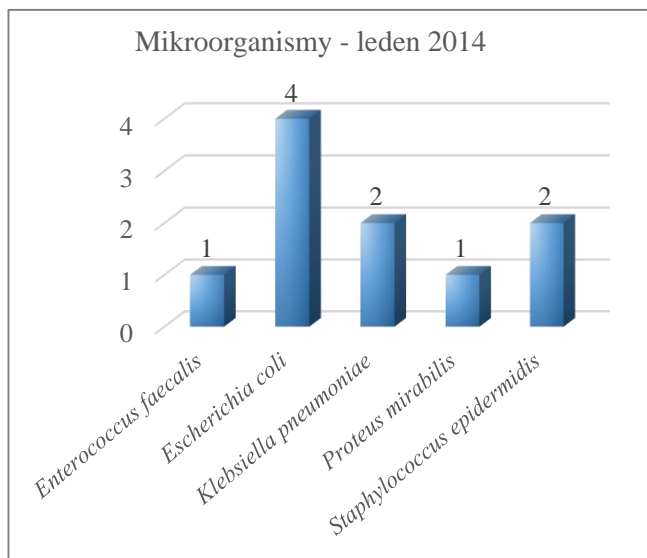
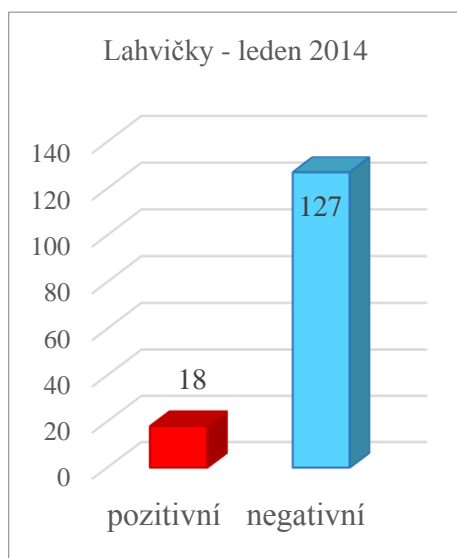
Graf 7: Hemokultivační lahvičky 11/2013. **Graf 8:** Nálezy u pacientů v listopadu 2013.

V **prosinci**, tedy ve čtvrtém sledovaném měsíci, se objevilo 26 pozitivních a 109 negativních hemokultivačních nádobek (Graf 9). *Escherichia coli* byla v majoritním zastoupení a jednalo se o sedm nálezů (Graf 10).



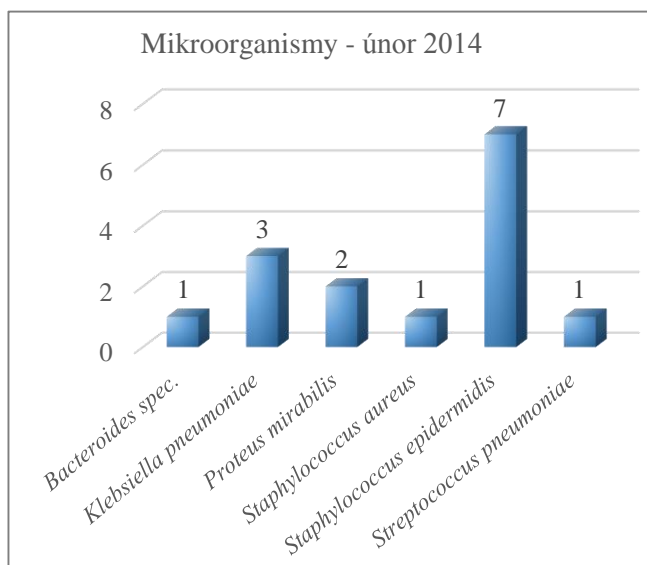
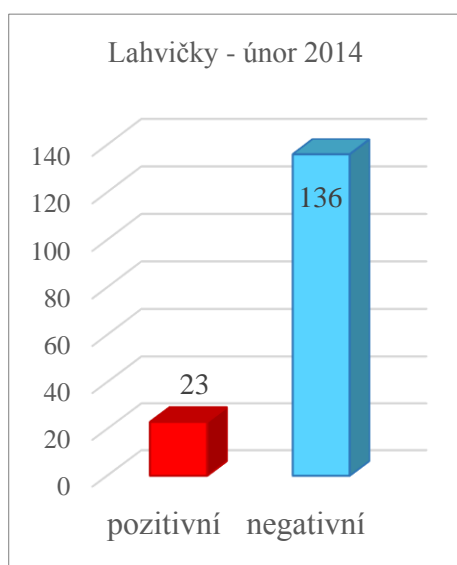
Graf 9: Hemokultivační lahvičky 12/2013. **Graf 10:** Nálezy u pacientů v prosinci 2013.

Lednové výsledky vypadaly takto: 127 nádobek bez mikroorganismů, 18 lahviček s mikrobiálním nárůstem a tvorbou CO₂ (Graf 11). *Escherichia coli* převyšovala počet ostatních nálezů, 2x se identifikovala *Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus epidermidis* (Graf 12).



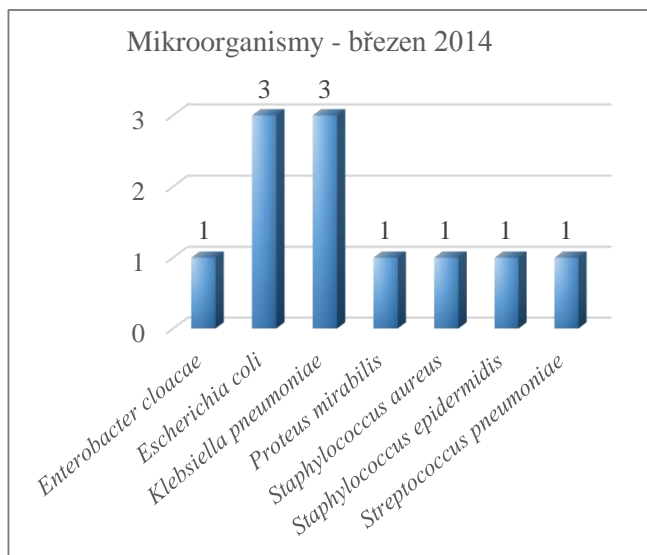
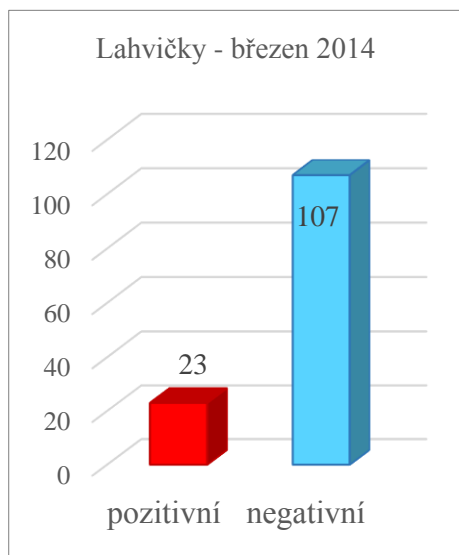
Graf 11: Hemokultivační lahvičky 1/2014. **Graf 12:** Nálezy u pacientů v lednu 2014.

V **únoru** byla odhalena přítomnost bakterií u 23 hemokultivací a 136 lahviček bylo negativních (Graf 13). *Staphylococcus epidermidis* převyšoval ostatní nálezy (Graf 14).



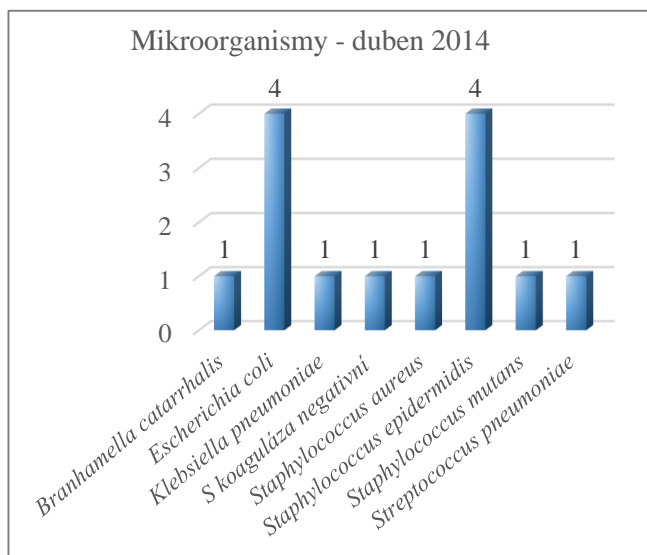
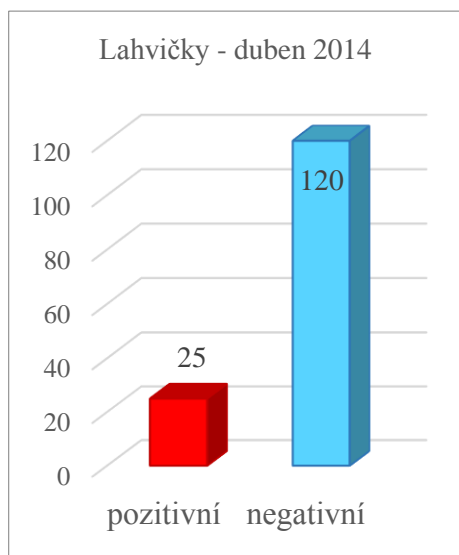
Graf 13: Hemokultivační lahvičky 2/2014. **Graf 14:** Nálezy u pacientů v únoru 2014.

Během měsíce **března** se prověřilo 130 hemokultivací, 23 bylo pozitivních a 107 lahviček bylo negativních (Graf 15). *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* tvořily většinový podíl nálezů (Graf 16).



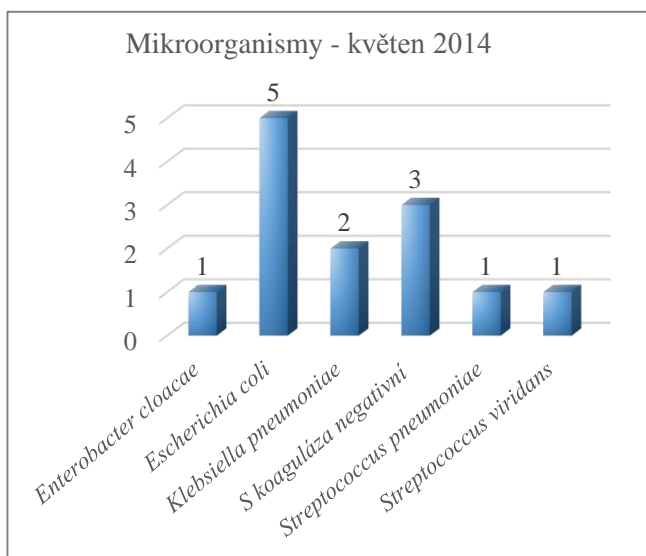
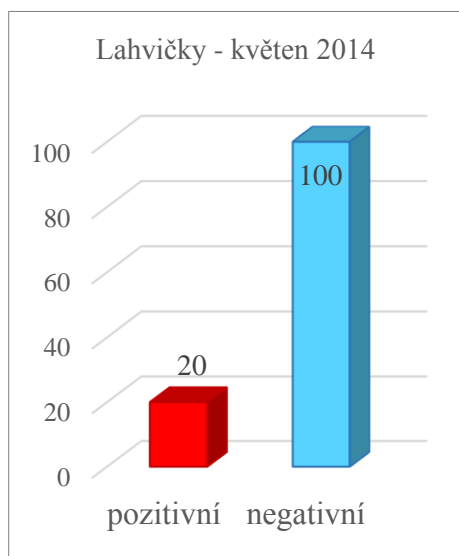
Graf 15: Hemokultivační lahvičky 3/2014. **Graf 16:** Nálezy u pacientů v březnu 2014.

Osmý měsíc v pořadí, **duben**, vykazoval 25 pozitivních hemokultivačních lahviček a 120 nádobek bez výskytu bakterií či kvasinek (Graf 17). Opět se objevovala především *Escherichia coli* nebo *Staphylococcus epidermidis* (Graf 18).



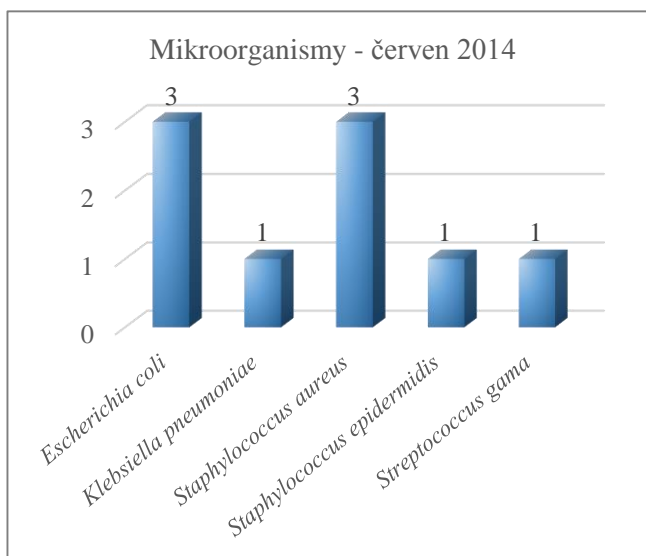
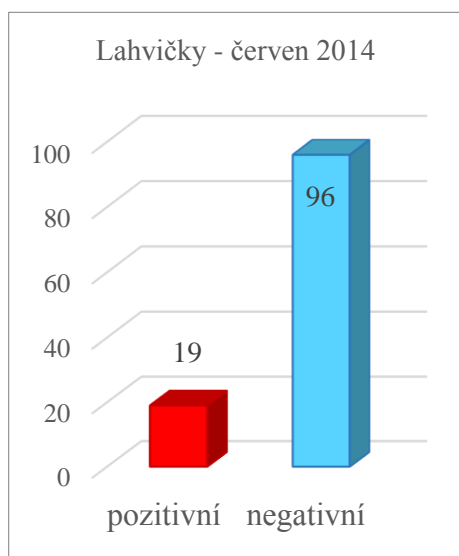
Graf 17: Hemokultivační lahvičky 4/2014. **Graf 18:** Nálezy u pacientů v dubnu 2014.

V průběhu měsíce **května** bylo mikrobiologicky vyšetřeno 120 hemokultivačních lahviček a u 20 z nich se potvrdil výskyt mikroorganismů (Graf 19). Pětkrát se v odebraném materiálu podařilo zachytit *E. coli* (Graf 20).



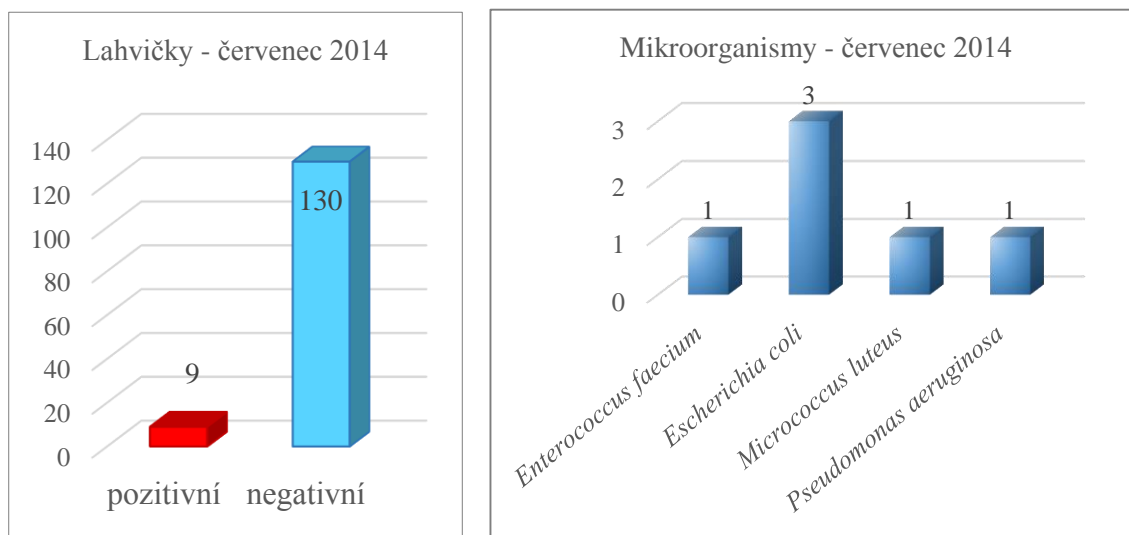
Graf 19: Hemokultivační lahvičky 5/2014. **Graf 20:** Nálezy u pacientů v květnu 2014.

V **červnu** se odhalilo 19 pozitivních lahviček a 96 hemokultivací bylo negativních (Graf 21). *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* představovali v tomto měsíci majoritní počet zachycených bakterií (Graf 22).



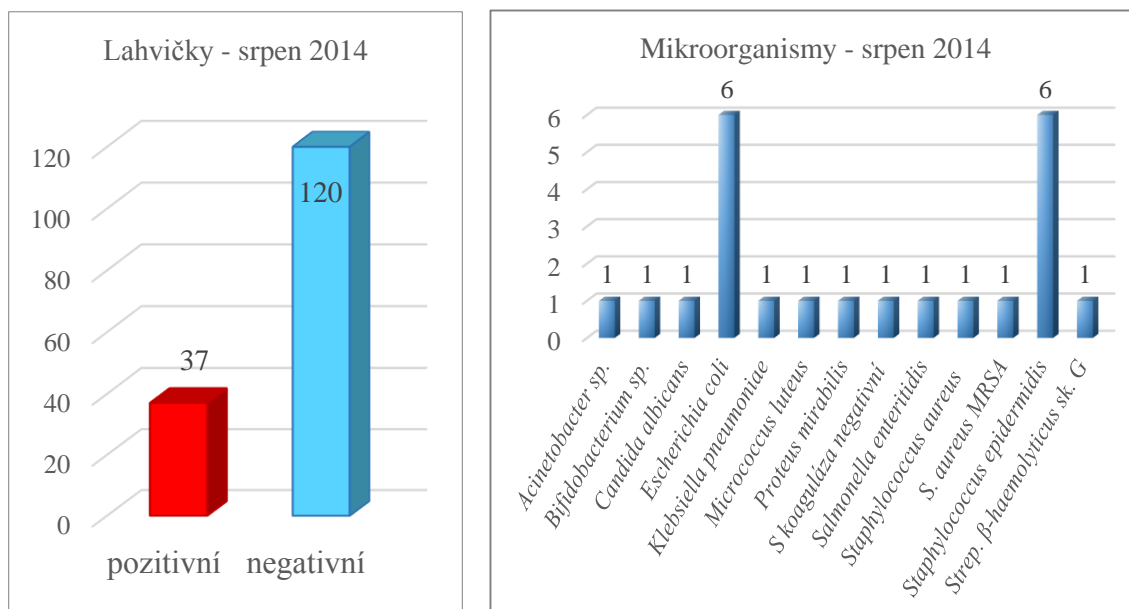
Graf 21: Hemokultivační lahvičky 6/2014. **Graf 22:** Nálezy u pacientů v červnu 2014.

V **červenci**, tedy jedenáctém měsíci tohoto výzkumu, byl detekován výskyt mikroorganismů u 9 hemokultivací a 130 vyšetřovaných lahviček bylo negativních (Graf 23). *Escherichia coli* byla hlavním původcem infekcí krevního řečiště (Graf 24).



Graf 23: Hemokultivační lahvičky 7/2014. **Graf 24:** Nálezy u pacientů v červenci 2014.

Studii uzavírá měsíc **srpen**, který vynikal 37 pozitivními hemokultivačními lahvičkami. 120 hemokultivací bylo negativních (Graf 25). V nejvyšším počtu byla zastoupena *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis* (Graf 26).

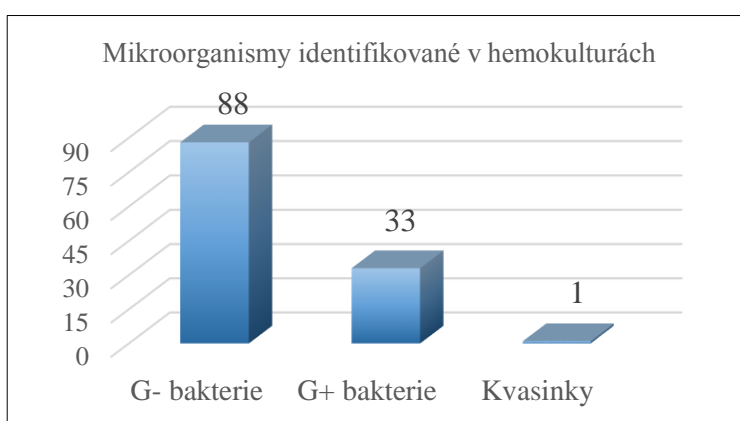


Graf 25: Hemokultivační lahvičky 8/2014. **Graf 26:** Nálezy u pacientů v srpnu 2014.

7.3 Mikroorganismy identifikované v hemokulturách

Roční sledování hemokultur ukázalo (po vyloučení kontaminací) na 21 druhů mikroorganismů, které se vyskytly v cévním systému pacienta (Tabulka 3). Dohromady bylo zaznamenáno 122 nálezů (nejčastěji *Escherichia coli*, celkem 46krát), přičemž u čtyřech pacientů potvrdila laboratoř výskyt více než jednoho patogenu.

72,1 % pozitivních nálezů způsobily gramnegativní bakterie, 27 % grampozitivní a 0,8 % tvořily kvasinky - *Candida albicans* (Graf 27). Striktní anaerobní bakterie se odhalily ve dvou měřeních (1,6 %), převládaly aerobní a fakultativně anaerobní druhy.



Graf 27: Obrázek pod mikroskopem (výskyt G⁻, G⁺ bakterií a kvasinek).

Podle získaných poznatků jsou hlavními původci infekcí krevního řečiště *Escherichia coli* (37,7 %), *K. pneumoniae* (19,67 %) a *Staphylococcus aureus* (10,66 %).

Opakovaně se podařilo prokázat přítomnost dalších druhů: *P. mirabilis* (5,74 %), *Streptococcus pneumoniae* (4,92 %) nebo *S. aureus* MRSA (3,28 %) a *Acinetobacter baumannii* (2,46 %).

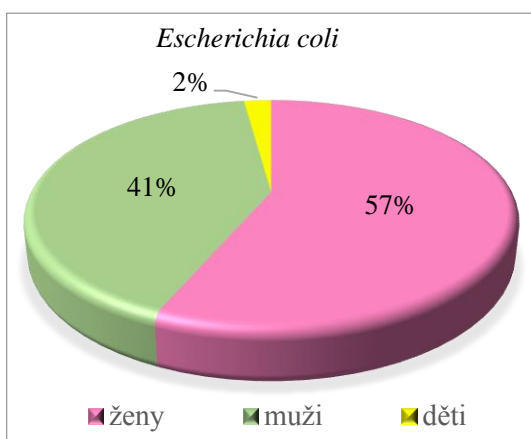
Dvakrát se v hemokulturách objevili: *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* a *Streptococcus* beta-haemolyticus skupiny G. Ojedinelé případy byly spojeny s výskytem: *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp., *Branhamella catarrhalis*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gama*, *Streptococcus viridans* nebo bakterie z rodu *Salmonella* (Tabulka 3).

Tabulka 3: Identifikované mikroorganismy v období od 9/2013 do 8/2014. Čísla jsou vztažena na pacienty.

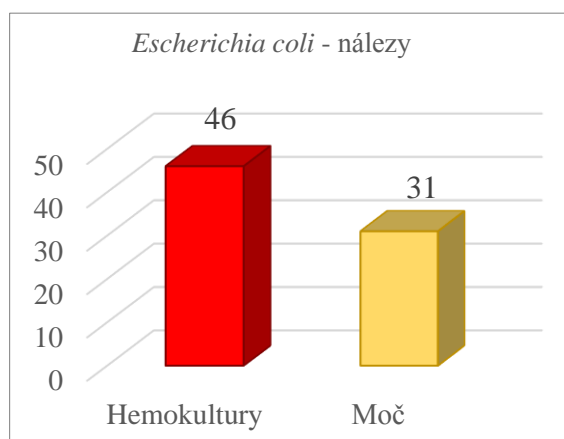
Mikroorganismus	Ženy	Muži	Děti	Celkem	Podíl (%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	3	0	3	2,46
<i>Bacteroides sp.</i>	0	1	0	1	0,82
<i>Bifidobacterium sp.</i>	1	0	0	1	0,82
<i>Branhamella catarrhalis</i>	0	0	1	1	0,82
<i>Burkholderia cepacia</i>	0	1	0	1	0,82
<i>Candida albicans</i>	1	0	0	1	0,82
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	2	0	2	1,64
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1	0	2	1,64
<i>Enterococcus faecium</i>	1	1	0	2	1,64
<i>Escherichia coli</i>	26	19	1	46	37,70
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	19	1	25	19,67
<i>Proteus mirabilis</i>	3	4	0	7	5,74
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	1	0	1	0,82
<i>Salmonella enteritidis</i>	0	1	0	1	0,82
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	11	0	13	10,66
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	1	3	0	4	3,28
<i>Streptococcus mutans</i>	0	1	0	1	0,82
<i>Streptococcus beta-haemolyticus</i> sk. G	1	1	0	2	1,64
<i>Streptococcus gama</i>	0	1	0	1	0,82
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	5	0	6	4,92
<i>Streptococcus viridans</i>	0	0	1	1	0,82
Součet	43	75	4	122	-

7.3.1 Bakterie s majoritním výskytem u pacientů

Escherichia coli převyšovala nálezy ostatních bakterií v hemokulturách. Do laboratorních statistik se zapsala celkem 46krát. 26 případů souviselo se ženami, 19 s muži a odhalena byla i v jednom dětském vzorku (Graf 28). Nejčastěji se objevovala v prosinci 2013. Pozitivní hemokultivace často doprovázel nález *E. coli* v moči (Graf 29).

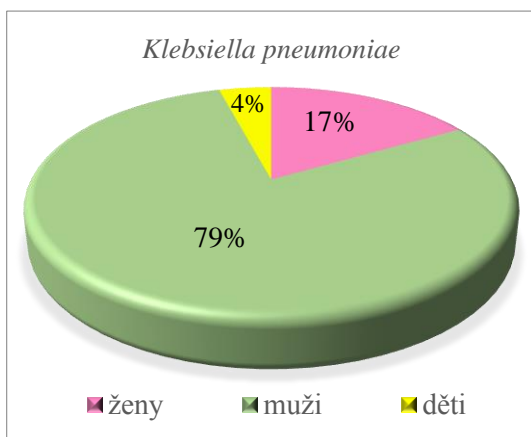


Graf 28: *Escherichia coli* dle pohlaví.

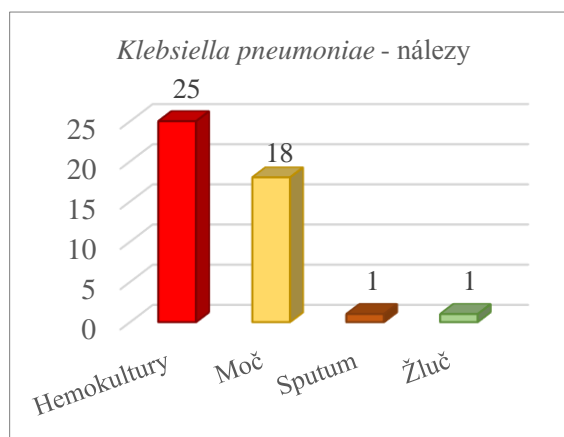


Graf 29: *E. coli* hemokultury a další materiál.

Klebsiella pneumoniae 25krát pronikla do cévního systému pacienta. Detekována byla u 19 mužů, 5 žen a jednoho dítěte (Graf 30). Čtyři pozitivní hemokultury byly zachyceny v září i v říjnu 2013, což byl maximální měsíční záznam. Rovněž se v několika případech potvrdil nález v moči, sputu nebo ve žluči (Graf 31).

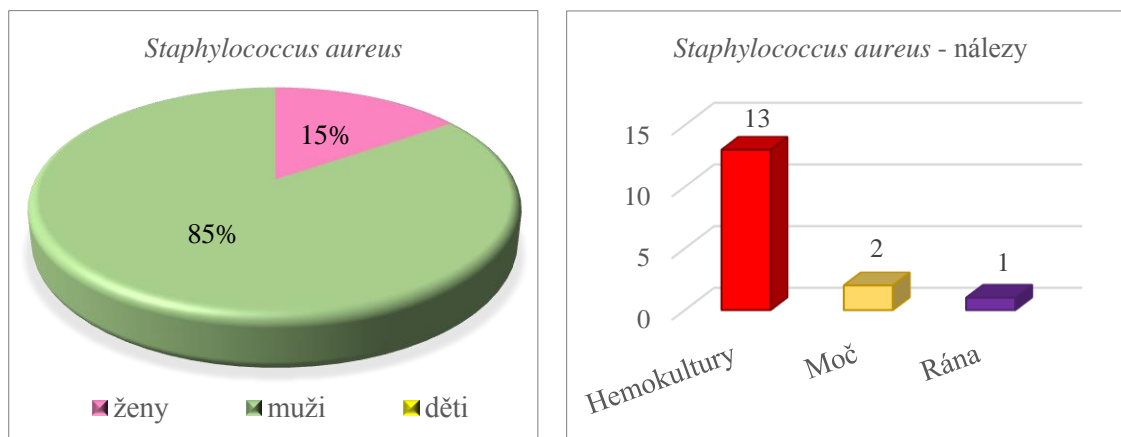


Graf 30: *K. pneumoniae* dle pohlaví.



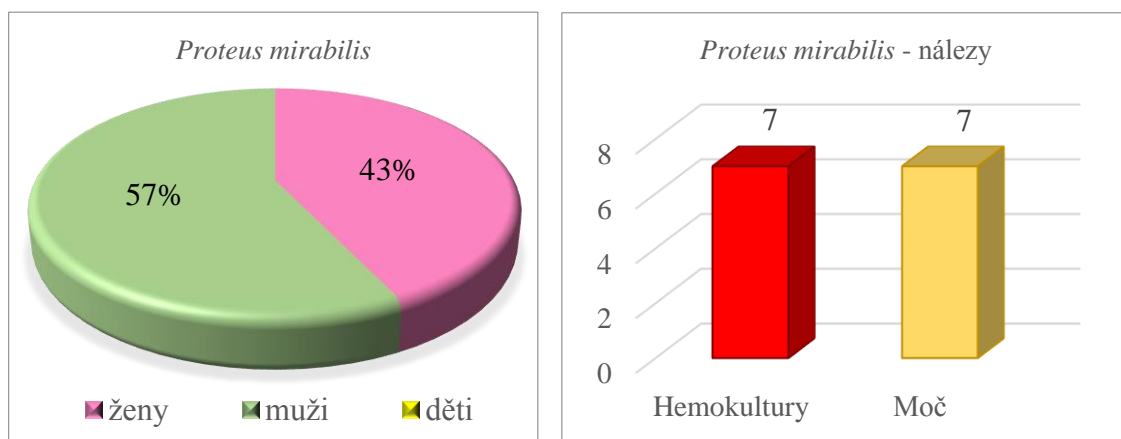
Graf 31: *K. pneumoniae* hemokultury a další materiál.

Staphylococcus aureus byl v hemokulturách přítomen celkem 13x, jednalo se o 11 vzorků od mužů a dva od pacientek (Graf 32). Do naší statistiky byl zapsán nejvyšší počet v červnu 2014. Ve třech případech se potvrdil výskyt rovněž v moči a ráně (Graf 33).



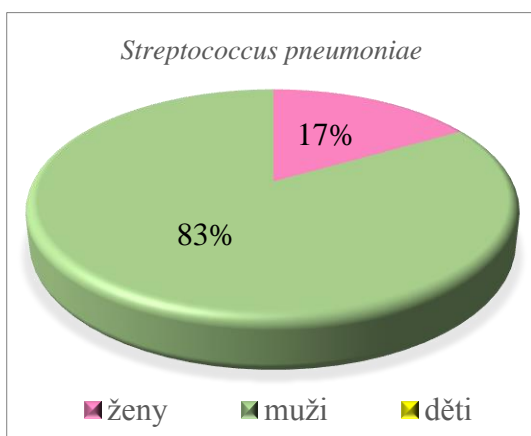
Graf 32: *S. aureus* zjištění dle pohlaví. **Graf 33:** *S. aureus* hemokultury a další materiál.

Proteus mirabilis byl zaregistrován u 3 žen a 4 mužů (Graf 34). V únoru byla tato bakterie detekována ve dvou vzorcích, u ostatních měsíců byl výskyt ojedinělý. Všechny sedm pozitivních hemokultivací podtrhovaly nálezy v moči (Graf 35).

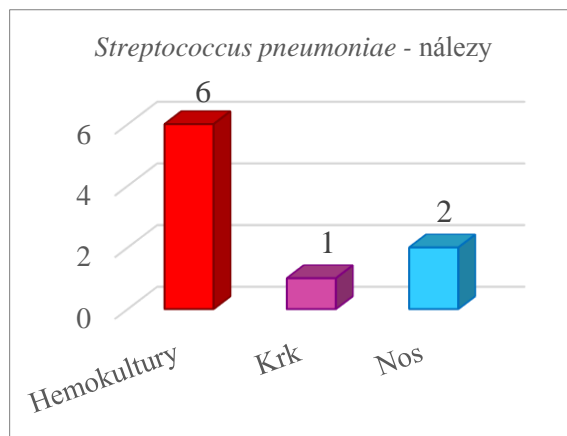


Graf 34: *P. mirabilis* zjištění dle pohlaví. **Graf 35:** *P. mirabilis* hemokultury a další materiál.

Streptococcus pneumoniae navýšil počet pozitivních vyšetření o šest. Bakteriemií vyvolanou tímto mikroblem postihlo 1 ženu a 5 mužů (Graf 36). V polovině případů se taktéž našel ve výtěrech z nosu či krku (Graf 37).



Graf 36: *S. pneumoniae* dle pohlaví.



Graf 37: *S. pneumoniae* hemokultury a další materiál.

7.3.2 Kontaminace

Po dobu 12 měsíců vykonala laboratoř klinické mikrobiologie v plzeňské městské nemocnici 1643 hemokultivací. Přístroj detekoval mikrobiální nárůst v lahvičkách se vzorky od 160 pacientů, z toho bylo kontaminováno 42 případů.

Falešnou pozitivitu ve více než 73,8 % vyvolávala přítomnost *Staphylococcus epidermidis*. Další koaguláza negativní stafylokoky kontaminovaly testovaný materiál v 19,1 % případů. Dvakrát byly vzorky vyloučeny pro pomnožení *Micrococcus luteus* a jednou pro nález *Corynebacterium sp.* (Tabulka 4).

Tabulka 4: Mikroorganismy, které vyvolávaly kontaminaci od 9/2013 do 8/2014.

Mikroorganismus	Ženy	Muži	Děti	Celkem	Procento
<i>Corynebacterium sp.</i>	0	1	0	1	2,38
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	2	2	4,76
<i>Staphylococcus koaguláza negativní</i>	4	3	1	8	19,05
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11	13	7	31	73,81
Součet	15	17	10	42	-

7.4 Kontrolní stěry kůže u kontaminací

Každá dvojice hemokultur by měla být opatřena kontrolním stěrem kůže. Kontaminace se vyskytla v průběhu dvanácti sledovaných měsíců 42x. 45,2 % kontaminací prokazatelně souviselo s chybami během odběru, jelikož se zjistil nález v kontrolním stěru kůže, který byl totožný s detekovaným mikroorganismem v médiu hemokultivačních lahvíček. 18x byl stěr sterilní a 5x nebyl dodán (Tabulka 5).

Nejčastějším zjištěním byla přítomnost *Staphylococcus epidermidis*.

Tabulka 5: Hodnocení kontrolních stěrů u 42 případů kontaminací.

Měsíc	Totožný nález (stěr/hemokultury)	Sterilní stěr	Stěr nedodán	Celkem
09/13	5	1	0	6
10/13	1	0	0	1
11/13	3	1	0	4
12/13	0	3	0	3
01/14	1	0	0	1
02/14	3	1	3	7
03/14	0	1	0	1
04/14	2	1	2	5
05/14	0	3	0	3
06/14	1	1	0	2
07/14	0	1	0	1
08/14	3	5	0	8
Součet	19	18	5	42

7.5 Hemokultivační lahvičky

Nejednou bylo k posouzení zdravotního stavu pacienta využito více než dvou hemokultivačních lahviček, častěji ale stačila jedna sada pro standardní aerobní a anaerobní kultivaci, Příloha č. 3 (Obrázek 1).

V celkových statistikách byl počet pozitivních lahviček Bactec Plus aer. o málo větší než Bactec Plus anaer. (Tabulka 6).

Tabulka 6: Hemokultivační lahvičky označené přístrojem jako pozitivní v období od 9/2013 do 8/2014.

Měsíc	Pozitivní lahvičky (celkem)	Pozitivní Bactec Plus aer.	Pozitivní Bactec Plus anaer.	Pozitivní Bactec Plus ped.
09/13	27	15	12	0
10/13	27	14	13	0
11/13	30	17	12	1
12/13	26	13	13	0
01/14	18	8	10	0
02/14	23	9	11	3
03/14	23	10	12	1
04/14	25	11	12	2
05/14	20	9	8	3
06/14	19	9	10	0
07/14	9	4	3	2
08/14	37	18	17	2
Součet	284	137	133	14

DISKUZE

V oddělení klinické mikrobiologie Městské nemocnice Plzeň, PRIVAMED a.s. od září 2013 do srpna 2014 byla infekce krevního řečiště odhalena u 118 pacientů. Automatický hemokultivační systém BACTEC zaznamenal díky fluorescenčnímu senzoru bakteriální tvorbu CO₂ u vzorků od 72 mužů, 42 žen a 4 dětí.

Celkem bylo vyšetřeno 1643 hemokultivačních lahviček, 1359 nevykazovalo výskyt žádného mikroorganismu. Nejvíce analýz provedla laboratoř v únoru 2014, kdy se vyšetřilo 159 hemokultivací. Doba inkubace, než se zachytil mikrobiální růst v pozitivních hemokulturách, se pohybovala okolo 2,2 dnů. Negativní vzorky byly vyloučeny po uplynutí pěti dnů v hemokultivačním systému. Automatické hemokultivační systémy výrazně zkracují detekční čas.

Naprostá většina (72,1 %) infekcí krevního řečiště byla vyvolávána gramnegativními bakteriemi, 27 % grampozitivními bakteriemi a méně než jedno procento bylo připsáno kvasinkám jako původcům tohoto vážného zdravotního stavu. Ševčík (1997) ve své knize uvádí, že 50 – 60 % zjištění odpovídá gramnegativním a 30 – 40 % grampozitivním mikroorganismům. Naše studie v konkrétní oblasti ukázala vyšší podíl infekcí způsobených gramnegativními bakteriálními druhy, než uváděla starší literatura.

Jako infekční agens vyvolávající sepsi se uplatňovaly zejména aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy. Anaerobní bakterie byly detekovány v cévních systémech pacientů v Městské nemocnici Plzeň u 1,6 % případů. Černý et al. (2005) udává vyšší podíl anaerobů, konkrétně mezi 2 až 10 %.

U 118 pacientů bylo nalezeno celkem 21 různých mikroorganismů. Obvykle se potvrdila přítomnost jednoho patogenního druhu u jedné osoby. Ve čtyřech případech (3,4 % pacientů s infekcí krevního řečiště) se v hemokultivačních médiích zjistil výskyt hned dvou patogenů a jednalo se o kombinace: a) *Escherichia coli* + *Proteus mirabilis*, b) *Staphylococcus aureus* MRSA + *Enterococcus faecium*, c) *Klebsiella pneumoniae* + *Escherichia coli* a d) *Staphylococcus aureus* MRSA + *Staphylococcus aureus*. Ševčík (1997) ve své publikaci píše, že 15 – 20 % sepsí má smíšený původ, v našem případě to bylo méně.

Podle Havlíka et al. (2002) jsou nejčastějšími původci sepse *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Streptococcus pneumoniae*. Toto tvrzení se v našem výzkumu potvrdilo, jelikož všechny tři uvedené mikroorganismy byly zařazeny mezi pět nejvíce detekovaných patogenních druhů ve sledované oblasti.

Escherichia coli byla v našem průzkumu odhalena u 26 žen, 19 mužů, jednoho dítěte a do statistik ze zapsala jako hlavní původce sepse. Tvořila 37,7 % všech nálezů. Kromě hemokultur se ve 31 případech detekovala taktéž v moči. *Klebsiella pneumoniae* představovala 19,7 % zjištění a to zejména u mužů, kde byla pozitivita u 19 vzorků. Tato bakterie byla pozorována také u 5 žen a 1 dítěte. Mimo hemokultivační lahvičky se potvrdila také v moči (18x), sputu (1x) a ve žluči (1x). *Staphylococcus aureus* byl odhalen v 10,7 % případů, 11krát u mužů a 2krát u žen. Nález v hemokulturách byl doprovázen záchytem v moči (2x) a ráně (1x). Čtvrtý v pořadí se vyskytoval *Proteus mirabilis* (5,7 %), hemokultivační systém označil materiál od 3 žen a 4 mužů. Všech sedm pozitivních případů bylo spojeno s nálezy téhož druhu v moči. *Streptococcus pneumoniae* se prokázal v necelých 5 % vzorků, společně se 6 hemokulturami se našel dvakrát ve výtěrech z nosu a jednou ve výtěrech z krku. Streptokokové bakteriémie se objevovaly zejména u mužů, konkrétně se jednalo o 5 pacientů a jednu pacientku.

Černý et al. (2005) ve své publikované práci prokázal, že pseudomonádové sepse činí 10 až 11 % veškerých sepsí a úmrtnost s nimi spojená je velice vysoká, dosahuje hodnot 60 %. V našem výzkumu tvořila přítomnost bakterií z rodu *Pseudomonas* pouze 0,83 %, jednalo se o jediný případ.

Čermák (2008) poukazuje na problematiku koaguláza-negativních stafylokoků vzhledem ke kontaminaci hemokultur. Udává, že 87,6 % záchytů nemá klinický význam. V našich záznamech se koaguláza-negativní stafylokoky vyskytují pouze jako falešně pozitivní výsledky kultivace. I další čísla uvedená v této knize (16 % infekcí způsobují enterokoky, 13 % kmeny *Staphylococcus aureus*, pouze 6,4 – 6,9 % *Escherichia coli* a 2,7 – 5,6 % *Klebsiella pneumoniae* apod.) se značně odlišovala od výzkumu provedeného v Městské nemocnici Plzeň.

Bartoníčková (2000) ve své knize uvádí spojení mezi sepsí a uroinfekcemi, kde hlavními původci jsou gramnegativní bakterie (obzvláště *Escherichia coli*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* apod.) a grampozitivní bakterie (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* nebo *Enterococcus faecalis* či *Enterococcus faecium*). Tento výrok se nám potvrdil v případě *Escherichia coli*, kdy 67 % nálezů bylo doprovázeno rovněž výskytem *E. coli* v moči. Podobný výsledek jsme získali v případě *K. pneumoniae*, u více než 70 % pozitivních hemokultivací jsme zjistili její přítomnost i v moči. *Proteus mirabilis* dokonce vykazoval 100 %, pozitivní výsledek byl u sedmi hemokultivací a sedmi vzorků moče od téhož pacienta či pacientky. Infekce krevního řečiště byly v řadě případů spojeny s uroinfekcemi.

V Městské nemocnici Plzeň tvoří děti jen malé procento pacientů. Roční studie zaznamenala čtyři bakterie, které cirkulovaly v krvi osob mladších osmnácti let. Jednalo se o *Branhamella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus viridans* a *Escherichia coli*. Jelikož se během dvanácti měsíců provedlo pouze 153 hemokultivací, výsledky u dětských pacientů mohou být zkresleny. Scharfen (2013) píše, že hlavními původci onemocnění u dětí jsou *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*.

Z celkového počtu vyšetření zaujímaly kontaminace 4,7 % a jednalo se o 42 hemokultivací. Černý et al. (2005) ve své publikaci udává podíl kontaminací mezi 1 až 4,5 %. Podle našich předpokladů byl hlavním mikroorganismem v kontaminovaných vzorcích *Staphylococcus epidermidis*, který se objevil 31krát. V osmi případech kontaminaci způsobili další koaguláza negativní stafylokoky, *Micrococcus luteus* znehodnotil analýzu dvakrát a v jedné hemokultivaci se objevil *Corynebacterium sp.* jako kontaminant.

Ze 42 hemokultur označených jako kontaminace byl kontrolní stěr sterilní v 18 případech a 5x nebyl dodán. To znamená, že 45,2 % falešně pozitivních vzorků souviselo s chybami během odběru, jelikož došlo k potvrzení totožné bakterie na kontrolním stěru kůže i v hemokultivačních nádobkách. Stěr osídloval zejména *Staphylococcus epidermidis*. Tím byl podložen význam správného odběru a nutnosti edukace zdravotnického personálu.

ZÁVĚR

Dochází ke každoročnímu zvýšení počtu pacientů s infekcemi krevního řečiště. Úmrtnost těžké sepsy převyšuje polovinu případů a septický šok je letální pro více než dvě třetiny pacientů. Celosvětovým tématem je rezistence mikroorganismů na ATB terapii. Diagnóza sepsy je v současné době postavena především na hemokultivačním vyšetření. Kontinuálně monitorující hemokultivační systémy znemožňují kontaminaci během kultivace a zkracují detekční čas, jelikož okamžitě označí pozitivní lahvičky na základě mikrobiální tvorby CO₂. Automatické systémy navíc snižují celkové náklady. Na kultivační půdy se vyočkovávají pouze přístrojem označené nádoby.

Z celkového počtu vyšetření bylo 82,71 % hemokultivačních lahviček negativních a 17,29 % pozitivních. Identifikovaly se zejména gramnegativní bakterie v čele s *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*. Ze skupiny grampozitivních bakterií byl nejčastěji detekován *Staphylococcus aureus*. Pouze 1,6 % odpovídalo striktním anaerobním mikroorganismům.

Z 284 pozitivních hemokultivačních lahviček, u kterých přístroj BACTEC zaznamenal tvorbu CO₂, byla prokázána infekce krevního řečiště u 118 osob. 42krát došlo ke kontaminaci a *Staphylococcus epidermidis* byl jejím majoritním původcem. Mezi hlavní problémy stále patří odběr krve, který musí být přísně aseptický. V současné době nastávají situace, ve kterých střední zdravotní personál provádějící náběr uskuteční kontrolní stěr kůže před desinfekcí místa vpichu či opomene provést desinfekci zátky lahvičky apod.

Hypotézy č. 1 (Sepsí mohou vyvolat infekční agens různých skupin) a č. 4 (Předpokládám, že nejčastějším kontaminantem je *Staphylococcus epidermidis*) se v našem výzkumu podařilo potvrdit. Stanovené hypotézy č. 2 (50 - 60 % sepsí přivodí gramnegativní bakterie, 30 – 40 % grampozitivní mikroorganismy a zbylá procenta tvoří zejména kvasinky) a č. 3 (2 – 10 % infekcí krevního řečiště způsobují anaerobní bakterie) byly vyvráceny. Zhodnocením hypotéz byl splněn cíl práce.

SEZNAM TABULEK A GRAFŮ

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1</i> : Hlavní klinické a laboratorní známky infekce krevního řečiště.	17
<i>Tabulka 2</i> : Analyzované hemokultivační lahvičky v průběhu sledovaného období.	37
<i>Tabulka 3</i> : Identifikované mikroorganismy v období od 9/2013 do 8/2014.	46
<i>Tabulka 4</i> : Mikroorganismy, které vyvolávaly kontaminaci od 9/2013 do 8/2014.	49
<i>Tabulka 5</i> : Hodnocení kontrolních stěrů u 42 případů kontaminací.	50
<i>Tabulka 6</i> : Hemokultivační lahvičky označené přístrojem jako pozitivní v období od 9/2013 do 8/2014.	51
<i>Tabulka 7</i> : Hemokultivační nádoby systému BACTEC - Plus Aerobic/F, Plus Anaerobic/F, Standard Aerobic/F, Standard Aerobic/F.	61
<i>Tabulka 8</i> : Hemokultivační nádoby systému BACTEC - Lytic/Anaerobic/F, PEDS Plus/F, PEDS Plus/F, Mycosis IC/F, Myco/F Lytic.	62

SEZNAM GRAFŮ

<i>Graf 1</i> : Hemokultivační lahvičky rozdělené dle pohlaví.	38
<i>Graf 2</i> : Hemokultivační lahvičky rozdělené dle pozitivivity a negativity.	38
<i>Graf 3</i> : Hemokultivační lahvičky 9/2013.	39
<i>Graf 4</i> : Nálezy u pacientů v září 2013.	39
<i>Graf 5</i> : Hemokultivační lahvičky 10/2013.	39
<i>Graf 6</i> : Nálezy u pacientů v říjnu 2013.	39
<i>Graf 7</i> : Hemokultivační lahvičky 11/2013.	40
<i>Graf 8</i> : Nálezy u pacientů v listopadu 2013.	40
<i>Graf 9</i> : Hemokultivační lahvičky 12/2013.	40
<i>Graf 10</i> : Nálezy u pacientů v prosinci 2013.	40
<i>Graf 11</i> : Hemokultivační lahvičky 1/2014.	41
<i>Graf 12</i> : Nálezy u pacientů v lednu 2014.	41
<i>Graf 13</i> : Hemokultivační lahvičky 2/2014.	41

Graf 14: Nález u pacientů v únoru 2014.	41
Graf 15: Hemokultivační lahvičky 3/2014.	42
Graf 16: Nález u pacientů v březnu 2014.	42
Graf 17: Hemokultivační lahvičky 4/2014.	42
Graf 18: Nález u pacientů v dubnu 2014.	42
Graf 19: Hemokultivační lahvičky 5/2014.	43
Graf 20: Nález u pacientů v květnu 2014.	43
Graf 21: Hemokultivační lahvičky 6/2014.	43
Graf 22: Nález u pacientů v červnu 2014.	43
Graf 23: Hemokultivační lahvičky 7/2014.	44
Graf 24: Nález u pacientů v červenci 2014.	44
Graf 25: Hemokultivační lahvičky 8/2014.	44
Graf 26: Nález u pacientů v srpnu 2014.	44
Graf 27: Obraz pod mikroskopem (výskyt G-, G+ bakterií a kvasinek).	45
Graf 28: <i>Escherichia coli</i> dle pohlaví.	47
Graf 29: <i>Escherichia coli</i> hemokultury a další materiál.	47
Graf 30: <i>K. pneumoniae</i> dle pohlaví.	47
Graf 31: <i>K. pneumoniae</i> hemokultury a další materiál.	47
Graf 32: <i>S. aureus</i> zjištění dle pohlaví.	48
Graf 33: <i>S. aureus</i> hemokultury a další materiál.	48
Graf 34: <i>P. mirabilis</i> zjištění dle pohlaví.	48
Graf 35: <i>P. mirabilis</i> hemokultury a další materiál.	48
Graf 36: <i>S. pneumoniae</i> dle pohlaví.	49
Graf 37: <i>S. pneumoniae</i> hemokultury a další materiál.	49

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Hemokultivační lahvičky systému BACTEC	63
--	----

POUŽITÁ LITERATURA

BALL, C. M. a R. S. PHILLIPS, 2004. *Akutní medicína do kapsy: na základě medicíny založené na důkazech*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0928-7.

BARTONÍČKOVÁ, Kateřina, 2000. *Uroinfekce*. Vyd. 1. Praha: Galén. ISBN 80-7262-027-4.

BEDNÁŘ, Marek et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.

BENEŠ, Jiří, 2009. *Infekční lékařství*. Vyd. 1. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-644-1.

CAREY, R. B., M. G. SCHUSTER a K. L. MCGOWAN, 2011. *Lékařská mikrobiologie v klinických případech*. Vyd. 1. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-480-3.

CETKOVSKÝ, Petr a Michal KOUBA, 2009. *Diferenciální diagnostika plicních infiltrátů a pokroky v léčbě mykotických infekcí u imunokompromitovaných pacientů*. Vyd. 1. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-343-1.

CETKOVSKÝ, Petr, 2004. *Intenzivní péče v hematologii*. Vyd. 1. Praha: Galén. ISBN 80-7262-255-2.

ČERMÁK, Pavel, 2008. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. Vyd. 1. Praha: Maxdorf-Jessenius. ISBN 978-80-7345-142-4.

ČERNÝ, Vladimír et al., 2005. *Sepse v intenzivní péči: vybraná doporučení v diagnostice a terapii*. Vyd. 2. Praha: Maxdorf. ISBN 80-7345-0542.

ČEŠKA, Richard, 2010. *Interna*. Vyd. 1. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-423-0.

GANONG, William F., 2005. *Přehled lékařské fyziologie*. Vyd. 20. Praha: Galén. ISBN 80-7262-311-7.

- GREENWOOD, D., R. C. SLACK a J. F. PEUTHERER, 1999. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1. Překlad Jiří Schindler. Praha: Grada. ISBN 80-7169-3650.
- HAVLÍK, Jiří et al., 2002. *Infekční nemoci*. Vyd. 2. Praha: Galén. ISBN 80-7262-173-4.
- HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ, 2005. *Základy imunologie*. Vyd. 3. Praha: Triton. ISBN 80-7254-686-4.
- JEDLIČKOVÁ, Anna, 2009. *Antimikrobiální terapie: v každodenní praxi*. Vyd. 3. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-208-7.
- JURÁNKOVÁ, Jana, 2011. *Klinická mikrobiologie v laboratorní praxi: bakalářský obor Zdravotní laborant*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-5657-2.
- KLENER, Pavel et al., 2011. *Vnitřní lékařství*. Vyd. 4. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-705-9.
- LOBOVSKÁ, Alena, 2002. *Infekční nemoci*. Vyd. 1. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0116-8.
- MELICHERČÍKOVÁ, Věra, 2007. *Sterilizace a dezinfekce v prevenci nozokomiálních nákaz*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-468-3.
- PLANTA, Martin von et al., 1997. *Differix: vnitřní lékařství*. Vyd. 1. Překlad Vlastimil Víšek. Praha: Scientia Medica. ISBN 80-85526-09-3.
- POTUŽNÍK, Vladislav, 1978. *Klinická mikrobiologie Sepse*. Vyd. 1. Praha: Avicenum.
- PRŮŠA, Richard et al., 2012. *Průvodce laboratorními nálezy*. Praha: Raabe. ISBN 978-80-87553-68-8.
- RACEK, Jaroslav et al., 2006. *Klinická biochemie*. Vyd. 2. Praha: Galén. ISBN 80-7262-324-9.

- RYŠKOVÁ, Olga, 2000. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie: učební texty pro bakalářské studium*. Vyd. 1. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0135-4.
- SEIFERT, Harald, 2009. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. *Clinical Infectious Diseases*. č. 4, s. 238-245. ISSN 1537-6591.
- SCHARFEN, Josef, 2013. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Vyd. 1. Praha: František Skopec - Nucleus HK. ISBN 978-80-87009-32-1.
- STAŇKOVÁ, M., V. MAREŠOVÁ a J. VANIŠTA, 2008. *Repetitorium infekčních nemocí*. Vyd. 1. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-056-0.
- STREITOVÁ, Dana a Renáta ZOUBKOVÁ, 2011. *Prevence sepse v intenzivní péči*. Vyd. 1. Ostrava: Lékařská fakulta Ostravské univerzity v Ostravě. ISBN 978-80-7368-830-1.
- ŠEVČÍK, Pavel, 1997. *Sepse v intenzivní medicíně*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-250-7.
- VOTAVA, Miroslav a Petr ONDROVČÍK, 2002. *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-1805-4.
- VOTAVA, Miroslav, 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Vyd. 2. Brno: Neptun. ISBN 80-86850-00-5.
- VOTAVA, Miroslav, 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Vyd. 1. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5.
- ZÁVADA, Josef, 2001. *Syndrom multiorgánové dysfunkce*. Vyd. 1. Praha: Grada. ISBN 80-7169-781-8.
- ZIMA, Tomáš, 2013. *Laboratorní diagnostika*. Vyd. 3. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-062-2.

PŘÍLOHA

Příloha č. 1

Tabulka 7: Hemokultivační nádoby systému BACTEC - Plus Aerobic/F, Plus Anaerobic/F, Standard Aerobic/F, Standard Aerobic/F (Čermák, 2008).

Název	Plus Aerobic/F	Plus Anaerobic/F	Standard Aerobic/F	Standard Aerobic/F
Použití	Zjišťování bakterií, hub i plísni	Zjišťování anaerobních či fakultativně anaerobních bakterií	Zjišťování aerobních bakterií, hub nebo plísni	Zjišťování anaerobních či fakultativně anaerobních bakterií
Vlastnosti	Vhodné pro pacienty s ATB léčbou	Vhodné pro pacienty s ATB léčbou	U pacientů s ATB léčbou není tak účinné jako médium obsahující resin.	U pacientů s ATB léčbou není tak účinné jako médium obsahující resin.
Medium	Sójový - kaseinový hydrolyzát obsahující hemin, manadion, glukózu, pyridoxin, kvasničný extrakt, resin (= kuličky sorpční pryskyřice) a katex.	Oproti aerobní nádobce přidán savčí tkáňový lyzát arginin, thioly, citrát sodný či fosfát draselný.	Sójový - kaseinový hydrolyzát obsahující hemin, manadion, glukózu, pyridoxin, kvasničný extrakt.	Oproti aerobní nádobce přidán savčí tkáňový lyzát, fruktóza, arginin, thioly, citrát sodný či fosfát draselný.
Objem	8 až 10 ml	8 až 10 ml	8 až 10 ml	5 až 7 ml
Barva	šedá	hnědo-oranžová	modrá	žlutá

Příloha č. 2

Tabulka 8: Hemokultivační nádobky systému BACTEC - Lytic/Anaerobic/F, PEDS Plus/F, PEDS Plus/F, Mycosis IC/F, Myco/F Lytic (Čermák, 2008).

Název	Lytic/Anaerobic/F	PEDS Plus/F	Mycosis IC/F	Myco/F Lytic
Použití	Zjišťování anaerobní a fakultativně anaerobních bakterií	Zjišťování aerobních bakterií, hub či plísni	Selektivní detekce hub, plísni a kvasinek	Neselektivní detekce mykobakterií, hub, plísni a kvasinek
Vlastnosti	Vhodné pro pacienty bez ATB léčby	Vhodné pro pediatrické pacienty a menší objemy vzorků. Využití i u pacientů s ATB léčbou.	Velice vhodné pro imunosupresivní osoby. Obsahuje ATB a saponin.	Vhodné obzvláště pro pacienty s AIDS.
Medium	Tekutá půda obsahující SPS a saponin.	Složení jako PLUS Aerobic/F, navíc přidán savčí tkáňový lyzát, pyruvát sodný, resin a 1 % kationtově-výměnných přísad.	Obsahuje tobramycin a chloramphenicol (inhibují bakteriální růst), saponin (napomáhá uvolňování kvasinek a hub z bílých krvinek).	Oproti aerobní nádobce přidán saponin jako lyzační činidlo.
Objem	8 až 10 ml	3 ml	8 až 10 ml	1 až 5 ml
Barva	modrofialová	růžová	zelená	červená

Příloha č. 3



Obrázek 1: Hemokultivační lahvičky systému BACTEC
(foto autorka).