



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

Infekce močových cest způsobené *Pseudomonas aeruginosa* na Urologické klinice ve VFN v Praze

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ  
/ ZDRAVOTNÍ LABORANT**

**Autor:** Kristýna Horáčková

**Vedoucí práce:** prim. MUDr. Václava Adámková

České Budějovice 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Infekce močových cest způsobené *Pseudomonas aeruginosa* na Urologické klinice ve VFN v Praze“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na 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 bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....  
*podpis*

### **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat prim. MUDr. Václavě Adámkové a MUDr. Janu Závorovi za pomoc a cenné rady při zpracování této bakalářské práce, které mi pomohly.

# Infekce močových cest způsobené *Pseudomonas aeruginosa* na Urologické klinice ve VFN v Praze

## Abstrakt

Práce se zabývá infekcemi močových cest bakteriálního původu způsobených patogenem *Pseudomonas aeruginosa*, která se podílí spíše výjimečně na komunitních infekcích močových cest, ale má významnější podíl na nozokomiálních infekcích.

Metodiku tvoří pracovní postupy v bakteriologické laboratoři včetně zpracování biologického materiálu a stanovení citlivosti k antibiotikům za pomoci dvou metod; diskového difuzního testu a mikrodiluční metody (pro stanovení MIC kolistinu).

Studie je zaměřena na výskyt *Pseudomonas aeruginosa* u mužů a žen za období tří let (2017–2019) na Urologické klinice ve Všeobecné fakultní nemocnici (dále jen „VFN“). V roce 2017 bylo 126 pacientů, v roce 2018 bylo 129 a v posledním roce bylo 171 pacientů s nálezem *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorku moči. Dále práce uvádí procentuální zastoupení *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích moči. V roce 2017 připadalo 64 % záchytu *Pseudomonas aeruginosa* na moč odebranou z katétrů a 40 % na moč spontánní. V následujících dvou zkoumaných letech byl záchyt *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích moči stejný, (ve vzorcích z katétrů 60 %, ve vzorcích spontánní moči 40 %). Součástí studie je dále retrospektivní shrnutí rezistence *Pseudomonas aeruginosa* k jednotlivým antibiotikům.

Poslední kapitoly shrnují a hodnotí naplnění cíle vypracované práce včetně diskuze k dané problematice.

## Klíčová slova

Nozokomiální infekce; *Pseudomonas aeruginosa*; rezistence; močové cesty; VFN; biofilm; antibiotika

# **Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* at the Department of Urology of General University Hospital in Prague**

## **Abstract**

The work deals with urinary tract infections of bacterial origin caused by the pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, which is rather exceptionally involved in community-acquired urinary tract infections, but has a more significant share in nosocomial infections.

The methodology consists of working procedures in a bacteriological laboratory, including the processing of biological material and the determination of susceptibility to antibiotics using two methods; Disc Diffusion Assay and Microdilution method (for the MIC of colistin).

The study focuses on the prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in men and women over a period of three years (2017–2019) at the Department of Urology at the General University Hospital (hereinafter "VFN"). In 2017 there were 126 patients, in 2018 there were 129 and in the last year there were 171 patients with *Pseudomonas aeruginosa* in the urine sample. The work also shows the percentage of *Pseudomonas aeruginosa* in the urine samples. In 2017 60 % of *Pseudomonas aeruginosa* was found in samples of urine collected from catheters, 40 % was found in samples of spontaneous urine. In the following two years which were examined, the occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in the urine samples was the same (60 % in the urine samples from catheters, 40 % in the samples of spontaneous urine). The study also includes a retrospective summary of the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to individual antibiotics.

The last chapters summarize and evaluate the fulfillment of the goal of the work, including a discussion on the issue.

## **Key words**

Nosocomial infection; *Pseudomonas aeruginosa*; resistance; urinary tract; General University Hospital; antibiotics

## Obsah

Úvod .....	8
<b>1. Anatomická stavba močového systému.....</b>	<b>10</b>
1.1 Ledviny.....	10
1.1.1 Stavba.....	10
1.1.2 Funkce.....	11
1.2 Ledvinná pánvička a kalichy .....	11
1.3 Močovod.....	11
1.4 Močový měchýř.....	12
1.5 Ženská močová trubice.....	12
1.6 Mužská močová trubice.....	12
<b>2. Močové infekce způsobené bakterií <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>14</b>
2.1 Rizikové faktory .....	16
2.2 Protektivní faktory.....	16
2.3 Nozokomiální nákaza.....	17
<b>3. Morfologie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>19</b>
3.1 Bakteriální stavba.....	19
3.2 Biofilm.....	21
3.3 Diagnostika <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	22
3.3.1 Barvení podle Grama.....	22
3.3.2 Kultivace .....	23
3.4 Citlivost k antimikrobiálním látkám.....	24
3.4.1 Stanovení citlivost <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na antibiotika.....	25
3.4.2 Diskový difúzní test .....	25
3.4.3 Stanovení MIC pomocí mikrodiluční metody (bujonová mikrodiluční metoda) .....	25
3.4.4 Stanovení MIC pomocí E –testu.....	26
<b>4. Praktická část.....</b>	<b>27</b>
4.1 Metodika výzkumu.....	27
4.2 Preanalytická fáze.....	27
4.2.1 Odběr biologického vzorku moče.....	28
4.3 Analytická fáze.....	29
4.3.1 Příjem vzorku do laboratoře.....	29

4.3.2	<i>Kultivace vzorku.....</i>	29
4.3.3	<i>OXIstrip.....</i>	31
4.3.4	<i>MALDI-TOF MS; Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.....</i>	31
4.3.5	<i>Stanovení citlivosti diskovou difúzní metodou.....</i>	31
4.3.6	<i>MIC kolistinu stanovené pomocí mikrodiluční metody.....</i>	32
4.4	Postanalytická fáze.....	34
<b>5.</b>	<b>Vyhodnocení .....</b>	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>Statistický přehled výskytu <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na Urologické klinice Všeobecné fakultní nemocnice v Praze od roku 2017 do roku 2019 .....</b>	<b>39</b>
<b>7.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>43</b>
<b>8.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>46</b>
<b>9.</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>47</b>
<b>10.</b>	<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>50</b>
<b>11.</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>51</b>

## Úvod

Jednou z problematik u infekcí močových cest jsou nozokomiální nákazy vznikající během hospitalizace ve zdravotních zařízeních. Jedním z patogenů, který se podílí na těchto infekcích je *Pseudomonas aeruginosa*.

K rizikovým faktorům pro vznik infekce se řadí nezajištění aseptické techniky při zavádění permanentního močového katetru (dále jen „PMK“), nedostatečné vzdělávání zdravotnického personálu v metodice zavádění PMK, nedodržování základních preventivních hygienických opatření.

*Pseudomonas aeruginosa* patří mezi saprofytické bakterie – není tedy závislá na přítomnosti hostitele a je dobře adaptována na podmínky ve volné přírodě, kde je pro ni často omezené množství živin potřebných pro její růst, o které zároveň musí soutěžit s dalšími mikroby v prostředí. Z tohoto důvodu si také vyvinula schopnost produkovat různé substance, které potlačí okolní bakterie, s čímž souvisí i její přirozená rezistence k řadě antibiotik.

Pro zdravého člověka obvykle tato bakterie nepředstavuje riziko, ale v nemocničním prostředí, kde jsou často hospitalizováni imunokompromitovaní pacienti, představuje značné nebezpečí. Může způsobovat infekce prakticky jakékoliv orgánu či systému těla, ať se jedná o infekce močových cest, nebo mnohem závažnější – infekce popálenin, osteomyelitidy (Beneš, 2009).

V diagnostice bakteriální infekce močových cest je zásadní mikrobiologické vyšetření moči, kdy se používá zejména kultivace. V případě pozitivní kultivace, kdy je *Pseudomonas aeruginosa* v signifikantní kvantitě, se následně stanovuje citlivost na antibiotika – k dispozici je speciální sada antibiotik, která mají tzv. protipseudomonádový účinek. Výsledky citlivosti jsou klíčové pro cílenou léčbu infekce a zabránění její recidivě.

Cílem mé práce je popsat problematiku infekcí močových cest způsobených tímto zkoumaným patogenem. Dále podrobně popíšu morfologii *Pseudomonas aeruginosa*, její



charakteristické jevy při kultivačním vyšetření a při vyšetření citlivosti a budu se zabývat grafickým zmapováním na Urologické klinice ve VFN v Praze.

Toto téma jsem si vybrala z důvodu profese, kterou vykonávám v laboratoři Klinické mikrobiologie a antibiotického centra ve VFN v Praze.

# 1. Anatomická stavba močového systému

## 1.1 Ledviny

Ledviny jsou párový orgán usazený retroperitoneálně podél bederní páteře, mají červenohnědou barvu a hladký povrch. Konzistence ledvin je tuhá. Ledviny mají fazolovitý tvar; dosahují délky 10–12 cm a šířky 5–6 cm. Její hmotnost je 120–170 gramů (Čihák, 2002).

### 1.1.1 Stavba

Na ledvině rozlišujeme přední plochu (facies anterior), zadní plochu (facies posterior), horní pól (extremitas superior), dolní pól (extremitas inferior), zevní okraj (margo lateralis), vnitřní okraj (margo medialis) a hilus ledviny (hilum renale), kde vstupují a vystupují cévy a odvodné cesty močové. Poslední součástí ledvin je sinus renalis. Sinus renalis obsahuje ledvinové kalichy, které ústí do ledvinové pánvičky (Čihák, 2002).

Ledvina je tubulosní žláza složená z ledvinových tubulů, nefronů. Nefron se skládá z ledvinového (Malpighiho) tělíska, dále z glomerulu (klubka vlásečnic). Glomerulus tvoří arteriola glomerularis afferens (místo vstupu) a arteriola glomerularis efferens (místo výstupu). Glomerulus je obalen Bowmanovým pouzdem. Pouzdro tvoří vnější a vnitřní list. Vnější list obklopuje ledvinové tělísko a vnitřní list kryje vlásečnice glomerulu. Mezi oběma listy je uložený ledvinový kanálek (tubulus renalis), který filtruje primární moč (Čihák, 2002).

Ledvinový kanálek obsahuje uzavřené segmenty; proximální tubulus, zde se rozlišuje pars contorta a pars recta. Poté pokračuje jako Henleova klička, která má sestupné raménko, které ve dřeni směřuje k papile a vrací se zpátky cestou ve tvaru U jako vzestupné raménko směrem do kůry. Konec kličky navazuje na poslední část nefronu, distální tubulus (Čihák, 2002).

Na povrchu ledvin je slabé vazivové pouzdro (capsula fibrosa). Při pohledu na průřez ledvinou makroskopicky rozeznáme kůru ledvin (cortex renalis) a dřev ledviny (medulla renalis). Kůra ledvin je světlá, jemnozrná. Dřev ledvin je tmavá s paprskovitým

vzhledem. Utváří konkrétní jednotky, jako jsou například ledvinové pyramidy (pyramides renales), podobné kuželkám. Ledvinové papily (papillae renales), které tvoří zaoblené hroty ledvinových pyramid. Povrch ledvinových papil je perforován štěrbinami. Součástí ledvinových pyramid jsou lalůčky (lobi renales), zodpovědné za jejich vývoj (Čihák, 2002).

### **1.1.2 Funkce**

Nepostradatelnou úlohou ledvin je vylučování moči, která obsahuje odpadní látky jako konečné produkty metabolismu. Je vylučována močovina, konečný produkt metabolismu aminokyselin, kyselina močová (výchozí látka metabolismu nukleových kyselin), kreatinin, koncový produkt katabolismu kreatinu a další (Kittnar et al., 2011).

Ledviny udržují stálou koncentraci minerálů a osmolalitu v tělesných tekutinách. Dále regulují acidobazickou rovnováhu a produkují důležité hormony zejména erythropoetin (růstový hormon červené krevní řady) (Kittnar et al., 2011).

## **1.2 Ledvinná pánvička a kalichy**

Ledvinové kalichy obklopují papily ledvinové. Kalichy mají tvar pohárků, které volně přecházejí do tkáně ledvin podél papil. Kalichy jsou uloženy v oblasti tuku. Rozeznávají se dva druhy kalichů; *calices renales minores*, které obklopují papily v počtu 7–14. Spojením dvou malých kalichů dojde ke vzniku velkých *calices renales majores*, které konvergují do ledvinové pánvičky. Ledvinová pánvička je rozšířena, trojúhelníkového tvaru, uložena v hilu ledviny kolem rozvinutých tepen. Stavba pánvičky je shodná se stavbou kalichů (Čihák, 2002).

## **1.3 Močovod**

Jedná se o trubici o délce 25–30 cm s průměrem 4–7 mm. Odvádí moč z ledvinové pánvičky do další části močového traktu; do močového měchýře. Začátek močovodu vychází z ledvinové pánvičky a sestupuje retroperitoneálně směrem dolů přes malou pánev. Končí na spodině močového měchýře. Močovod je rozdělen na tři úseky; pars

abdominalis, oblast břicha, pars pelvica, oblast pánev a poslední částí je pars intramuralis. Močovod je složen ze sliznice přechodného epitelu a hladké svaloviny. Povrch močovodu je pokrytý řídkým kolagenním vazivem (Čihák, 2002).

#### **1.4 Močový měchýř**

Močový měchýř je dutý orgán, který slouží jako rezervoár moče. Nachází se v oblasti malé pánve za kostěným podkladem pánve (tzv. symfýzou). Močový měchýř tvoří sliznice, pod níž se nachází podslizniční vazivo spojené s hladkou svalovou vrstvou stěny. Povrch močového měchýře je pokryt serosní vrstvou peritonea. Močový měchýř je roztažitelný orgán. Mění tvar během postupného naplňování. Prázdný močový měchýř je nepravidelného tvaru. Při naplnění se mění na ovoidní tvar. Kapacita močového měchýře je odlišná u mužů a žen. Močový měchýř dokáže pojmout 500–700 ml moči. Při naplnění okolo 300 ml se močový měchýř vyklenuje nad horní okraj symfýzy (Čihák, 2002).

#### **1.5 Ženská močová trubice**

Tato trubice je dlouhá 3–4 cm. Postupuje z močového měchýře za symfysou, před vaginou, k zevnímu vyústění mezi malými stydkými pysky. Začátek urethry v měchýři se nazývá ostium urethrae internum. Zevní ústní urethry se označuje termínem ostium urethrae externum (Čihák, 2002).

Rozlišují se tři úseky močové trubice. Pars intramuralis, ve stěně močového měchýře. Pars pelvica, mezi močovým měchýřem a perineální membránou. Pars perinealis, pod pars pelvica směřující k ostium externum (Čihák, 2002).

#### **1.6 Mužská močová trubice**

Mužská močová trubice slouží především k vylučování moče, je také zásadní pohlavní cestou v procesu rozmnožování. Má délku 20–22 cm. Začíná v močovém měchýři, ostium urethrae internum. Končí jako ostium urethrae externum, zevní vyústění mužské močové trubice do vrcholu penisu (Čihák, 2002).

Urethru lze rozdělit na následující úseky:

Pars intramuralis dosahuje délky 0,5 cm. Prochází stěnou močového měchýře. Pars prostatica v délce 3–4 cm prochází prostatou. Pars membranacea je dlouhá 2 cm, nejužší úsek mužské močové trubice. Poslední úsek pars spongiosa dosahující délky 15 cm (Čihák, 2002).

## 2. Močové infekce způsobené bakterií *Pseudomonas aeruginosa*

Mikrobi způsobující infekce močových cest (dále jen „IMC“) se také nazývají uropatogenní. Patogeny můžeme dělit na primární a sekundární. Primární patogeny způsobují nekomplikované infekce u jinak zdravých jedinců s normálním močovým ústrojím – patří sem především *Escherichia coli*, dále potom *Staphylococcus saprophyticus* a enterokoky (Jindrák et al., 2014).

Sekundární patogeny jsou původci komplikovaných IMC. Spadají sem opět enterobakterie, kdy ve vyšším zastoupení je například *Klebsiella* a *Proteus*, vzácněji poté například *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* a *Pseudomonas aeruginosa* (Jindrák et al., 2014).

Kvasinky, které bývají obvykle jen kontaminací lokální flórou, mohou u katetrizovaných pacientů a pacientů s diabetem způsobit také infekci (Jindrák et al., 2014).

IMC můžeme klasifikovat podle různých kritérií. Rozlišujeme infekce nekomplikované a komplikované. Nekomplikovanou infekcí je cystitida, která postihuje dospělé ženy mladého a středního věku. Komplikované infekce zahrnují především pyelonefritidu a týkají se těhotných žen, dětí a mužů. Dále můžeme infekci hodnotit jako komplikovanou při obstrukci močových cest nebo přítomnosti cizích těles (PMK) (Jindrák et al., 2014).

Mezi závažné komplikace pyelonefritidy patří akutní selhání ledvin či bakteriémie (sepsy). Při recidivujících infekcích dále hrozí renální insuficience, která musí být v pozdní fázi řešena dialýzou či transplantací (Jindrák et al., 2014).

Dále lze IMC dělit podle místa poškození. Infekcí může být zasažena dolní etáž močových cest – cystitida, která nemá systémové příznaky. Druhou variantou je infekce horní etáže močových cest – pyelonefritida (zánět ledvin), která má obvykle systémové příznaky (horečka, třesavka) a může ji doprovázet bakteriémie (Jindrák et al., 2014).

Podle formy se rozlišují infekce na akutní, recidivující a chronické. Akutní infekce obvykle vzniká náhle a odeznívá bez komplikací. Při opakujících se epizodách hodnotíme

infekci jako recidivující – jedná se buď o relaps či reinfekci (viz níže). Při opakujících se akutních epizodách může infekce přejít do chronicity, což má negativní vliv na funkci ledvin a může postupně vznikat renální insuficience (Jindrák et al., 2014).

Jednou z nejčastějších příčin nozokomiálních IMC je zavedení PMK. S délkou zavedení katetru roste riziko infekce (nad 10 dní), protože postupně dochází ke kolonizaci cévky bakteriemi. Na vzniku IMC se podílejí bakterie, které osídlují močové cesty – bakterie lokální flóry z gastrointestinálního traktu. Bakterie pronikají ascendentně močovou tubicí do močového měchýře a osídlují močový měchýř nebo mohou přímo z močovodu infikovat ledviny (Beneš, 2009).

Zdroj infekce bývá nejčastěji ascendentní, kdy bakterie jsou součástí flóry gastrointestinálního traktu. Vzácněji může dojít k infekci hematogenním způsobem, například při infekci krevního řečiště. Poslední možností je šíření infekce *per continuitatem*, tedy z ložiska blízkého močovému traktu. (Beneš, 2009).

Mikroorganismy pronikají u žen přes uretrální ústí. Poté ascendentně proniknou do močového měchýře, eventuálně dále do pelvis renalis a parenchymu ledviny (Beneš, 2009).

U mužského pohlaví, kdy infekce bývají vždy komplikované je nejčastějším příčinou infekce zvětšení předstojné žlázy (hypertrofie prostaty). Projeví se neschopností vyprázdnit močový měchýř na základě vzniklé obstrukce. Další příčinou obstrukce močových cest mohou být například tumory, či močové kameny (Beneš, 2009).

Hlavním rizikovým faktorem při vzniku nozokomiálních infekcí močových cest je zavádění PMK. Ten by měl být zaveden za aseptických podmínek, a to pouze v situacích, kdy je to opravdu nezbytně nutné. Za několik dní po zavedení dochází ke kolonizaci cévky bakteriemi (tvoří biofilm), kdy vzniká asymptomatická bakteriurie, která ale sama o sobě není indikací k léčbě antibiotiky (výjimkou jsou těhotné ženy a pacienti před chirurgickým výkonem). Léčíme pacienta (příznaky), ne pouze laboratorní nález. Důležité je také pravidelné vyměňování PMK. (Piechota, 2016).

## **2.1 Rizikové faktory**

Faktory, které mají podíl na vzniku IMC můžeme rozdělit do tří skupin. Do první skupiny patří stavy, které usnadňují průnik bakterií do močových cest. Jedná se především o infekce u žen, které mají močovou trubici mnohem kratší než muži a průnik bakterií je tedy snazší. U dětí může jít o nevhodné návyky utíráním zadečku po defekaci zezadu dopředu. U dospělých žen může nedostatek estrogenů způsobit úbytek lactobacilů (součástí flóry pochvy a uretrálního ústí), kteří jsou důležitým protektivním faktorem před vznikem IMC díky tomu, že svým metabolismem vytvářejí kyselé prostředí a tím brání průniku patogenních bakterií (Beneš, 2009).

Druhou skupinou jsou situace, kdy je usnadněno ascendentní šíření bakterií. Příkladem lze zmínit pacienty s diabetem, kteří mají často glykosurii (přítomnost glukózy v moči). Glukóza je důležitým zdrojem energie pro bakterie, které se poté mohou množit. (Beneš, 2009).

Do třetí skupiny spadají stavy, kdy dochází k perzistenci bakteriální infekce kvůli tvorbě biofilmu. Jde například o urolitiázu, kdy dochází k obstrukci močových cest. Dále se jedná o vrozené malformace močových cest, či neurogenní poruchy (například atonie měchýře) (Beneš, 2009).

## **2.2 Protektivní faktory**

Prevenčí infekcí je přirozené osídlení zevního genitálu spolu žijícími mikroorganismy, například se jedná o koaguláza negativní stafylokoky, enterokoky, laktobacily, které se podílejí na obraně před škodlivými mikroby. Další profylaxí je úplné vyprázdnění močového měchýře (Teplan et al., 2004).

Projevy IMC jsou různé podle místa zasažení. Infekce močového měchýře (cystitis) se projevují nejčastěji jako obtížné a časté močení, nucení na močení, bolestmi za sponou, subfebriliemi (Jindrák et al., 2014).



Zánět ledvin (pyelonefritida) má závažnější průběh s příznaky jako jsou horečka, schvácenost, obtížné močení, bolesti v bedrech. Může docházet i k bakteriémii a septickému průběhu (Jindrák et al., 2014).

Dále mezi protektivní faktory patří neporušená sliznice močových cest a antirefluxový mechanismus (Jindrák et al., 2014).

### **2.3 Nozokomiální nákaza**

Jedná se o infekce, které vznikají u pacientů hospitalizovaných v nemocničních zařízeních či v souvislosti s ambulantními lékařskými výkony. Nejčastěji se jedná o respirační infekce, IMC, či infekce krevního řečiště. Původcem těchto nákaz jsou většinou mikroby s vyšší rezistencí na antibiotika oproti komunitním kmenům. Například se jedná o bakterie z čeledi Enterobacterales, které produkují enzymy zvané betalaktamázy typu ESBL (extended spectrum beta-lactamase), či AmpC (Ampicillin C). Pomocí těchto enzymů inaktivují bakterie většinu dostupných beta-laktamů a v léčbě je poté nutné použít rezervní antibiotika – například karbapenemy (Jindrák et al., 2014).

Nozokomiální nákazy můžeme rozdělit na infekce exogenní (agens je do organismu zavlečen zvenčí) a endogenní (mikroby, které jsou součástí běžné flóry jiného systému). Například u IMC je zdroj patogenu často ve flóře gastrointestinálního traktu. Nejčastější příčinou těchto infekcí je katetrizace či invazivní výkony v močových cestách, například cystoskopie. Má-li pacient PMK déle než 30 dní, je pravděpodobnost infekce téměř 100 % (Jindrák et al., 2014).

Nozokomiální infekce se může šířit v různých nemocničních zařízeních včetně domů s pečovatelskou službou, prostřednictvím kontaminovaných nástrojů, ložního prádla nebo za pomoci aerosolu. Vliv na další šíření infekce má i zdravotnický personál (Xia et al., 2016).

Literatura uvádí, že až 60 % nozokomiálních infekcí ve zdravotnictví je způsobeno přenosem z nedostatečně vydezinfikovaných rukou. Aby se zabránilo šíření nozokomiálních nákaz, musí být důsledně dodrženy hygienická preventivní opatření. Hygiena rukou se má provádět před zahájením a po ukončení pracovní služby, před a po

kontaktem s pacientem, před jídlem, před zahájením jakýchkoliv výkonů, které vyžadují sterilní prostředí. Dále není vhodné nošení šperků (náramky, řetízky, prsteny). (Kapounová, 2007).

Podle epidemiologické studie, kterou provedla WHO v roce 2016 v padesáti pěti nemocnicích čtrnácti zemí ze čtyř regionů jako je Evropa (7,7 %), východní Středomoří (11,8 %), jihovýchodní Asie (10,0 %), a západní Pacifik (9 %), bylo zjištěno, že 8,7 % hospitalizovaných pacientů mělo nozokomiální nákazu. Ukázalo se, že na celém světě trpí nemocniční infekcí přes 1,4 milionu lidí. Bylo potvrzeno, že nozokomiální infekce mají velký podíl na úmrtí hospitalizovaných pacientů (Xia et. al., 2016).

Kvůli zvýšené rezistenci bakterií, jsou lékaři často nuceni indikovat rezervní antibiotika – širokospektré peniciliny (piperacilin/tazobaktam), cefalosporiny vyšších generací (cefepim), karbapenemy (meropenem u ESBL a Ampc kmenů enterobakterií). Dále se častěji používají kombinace dvou a více antibiotik, čímž je zajištěno rozšíření spektra účinnosti léčby a synergetický efekt antibiotik (Štefan, 2019). Rezistence k antibiotikům se rychle šíří po celém světě a vyvolává vážnou hrozbu pro celosvětové zdraví obyvatel (Xia et. al., 2016).

Jedním z nejčastějších mechanismů rezistence u gramnegativních bakterií jsou produkce enzymů, které hydrolyzují molekulu ATB (ESBL a AmpC u enterobakterií, metalo-beta-laktamázy u *Pseudomonas aeruginosa*) a snížení propustnosti vnější buněčné stěny pomocí změny exprese membránových porinů (Xia et. al., 2016).

Mezi nozokomiální patogeny se řadí i *Pseudomonas aeruginosa*, která je častým původcem vzniku močových infekcí spojených s poskytovanou zdravotní péčí. (Paz-Zarza, et al., 2019). Zdravý člověk je obecně vůči *Pseudomonas aeruginosa* velmi odolný; infekce tímto mikroblem se v komunitě proto vyskytují vzácně a jedná se především o infekce nozokomiální. Nejčastěji postihují buď pacienty se sníženou imunitou (chemoterapie), nebo při destrukci přirozených bariér (defekty kůže či sliznice) (Jindrák et al., 2014).

### 3. Morfologie *Pseudomonas aeruginosa*

Rod *Pseudomonas* se řadí mezi nefermentující, nesporulující, ohnuté gramnegativní tyčky. K růstu vyžadují přítomnost kyslíku, jsou striktně aerobní. V přírodě se nejčastěji nachází ve vodě, v půdě či rostlinách. (Butaité, 2018). *Pseudomonas aeruginosa* je původcem nozokomiálních infekcí (Aleksic, et al., 2019).

#### 3.1 Bakteriální stavba

Bakteriální buňka *Pseudomonas aeruginosa* je tvořena cytoplasmou ohraničenou cytoplasmatickou membránou. Na ní přiléhá odolná, tenká a zároveň složitá buněčná stěna složená z vrstvy peptidoglykanu. Uvnitř buňky se nachází obrovský nukleoid. V nukleoidu je uzavřena dvoušroubovice DNA. Nukleoid nemá membránu, není oddělen od cytoplazmy (Bednář et.al., 1996).

V nepravém jádře nejsou přítomné histony. V jádře je umístěná genetická informace buňky, která stanoví kroky pro stavbu a funkci buňky za pomoci jednotlivých kódujících genů DNA. Celkový součet genů odpovídá 3 500 úsekům DNA (Bednář et.al., 1996).

Genetická informace bakterií je haploidní s konkrétním genem pouze v jediné alele. Přepis genetické informace je zahájen transkripcí strukturního genu. Dochází ke vzniku mRNA. Vzniklá molekula mRNA se využívá rovnou k translaci, neboť bakteriální DNA není separována od membrány cytoplazmy. Ribozomy jeden za druhým nasedají na vytvořenou molekulu mRNA a současně se podílejí na tvorbě proteinů. Místo dvoušroubovice DNA se na tvorbě jádra mohou podílet plazmidy, které mají DNA uspořádanou do kruhu. Plazmidy se podílí na rezistenci k antibiotikům. Na základě enzymu, který produkují, dochází k rozkladu či chemické deformaci účinku antibiotik (Bednář et.al., 1996).

Cytoplasma se nachází v celém prostoru. Neobsahuje vakuoly. Sestává se ze třech komponentů: ribozomy, chromozom, zrn zásobních látek. Vzhled odpovídá gelu. Zásadní část pro životaschopnou buňku je přítomnost bílkovin, které mají své enzymatické pochody (Bednář et.al., 1996).

Součástí cytoplazmy jsou volně uložené ribozomy, které ihned přiléhají na vzniklou molekulu mRNA. Podílejí se na syntéze bílkovin. K překlada genetické informace dochází za účasti tRNA do proteinu. Samostatná činnost ribozomu se nazývá proteosyntéza. Pro bakterie jsou ribozomy označeny 70 S. Podle abecedního písmena velké S se posuzuje reakce ribozomu na antibiotika. Dále slouží ke spojení menší a velké podjednotky ribozomu. Malá podjednotka má 30 S a velké 50 S, spojením dojde ke vzniku ribozomálního komplexu 70 S (Bednář et.al., 1996).

Cytoplasma je ohraničena cytoplazmatickou membránou, která se podílí na pohybu bakterie. Skládá se ze 70 % z proteinů, 30 % lipidů, kde převažují fosfolipidy (není zde přítomen cholesterol). Nad membránou cytoplazmy se nachází pevná bakteriální stěna. Dodává tvar a zabraňuje poškození buňky (Bednář et.al., 1996).

*Pseudomonas aeruginosa* má tenčí a složitou stěnu. Tvořena dvojitou vrstvou peptidoglykanu, která je složena z cukrů hexózy N-acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kyseliny a aminokyselin. Prostor nacházející se mezi dvěma vrstvami se nazývá periplazmatický prostor. V periplazmatickém prostoru se nachází enzymy ze skupiny hydroláz. Dále beta-laktamáza. Tyto enzymy dokážou štěpit peniciliny a vyvolávají rezistenci bakterie na použitá antibiotika. Povrch buněčné stěny tvoří vrstva slizu, glykokalyx (Georing et al., 2019).

Většina bakterií má na buněčné stěně bičíky umožňující jejich pohyb. Rozložení bakteriálních bičíků může být jednotlivé, polární, nebo ve shluku tzv. lofotrichální uložení, nebo mohou být bičíky přítomné po obvodu celé bakteriální buňky. *Pseudomonas aeruginosa* má polární uložení bičíku. Základním stavebním kamenem bičíku je protein flagelin (Garcia, 2018). Kromě bičíků se vyskytují pevné fimbrie sloužící nejen ke komunikaci s okolními bakteriemi, ale také podporující adhezi na povrchu epitelů, zejména v urogenitálním, střevním, respiračním systému. Kromě adhezivní funkce slouží jako ochranný aparát před fagocytózou hostitelské buňky (Georing et al., 2019).

Na základě tělových antigenů *Pseudomonas aeruginosa* rozeznáváme 17 sérovarů. Další antigeny jsou antigeny bičíků a fimbrií, které ochraňují buňku před napadením

fagocytózy a umožňují přilnavost. Ulehčují kolonizovat. Kromě tělních antigenů jsou významné celulární a extracelulární prvky sloužící jako virulentní faktory (King, 2009). Na buňku je navázaný endotoxin lipopolysacharid (dále jen „LPS“), který je stavbou shodný jako u Gram negativních tyček, rozdíl je pouze v toxicitě. Oproti LPS enterobakterií, které jsou málo toxické (Julák, 2015).

Pro vznik onemocnění mikrobem je nezbytný extracelulární polysacharid alginát. Vyskytuje se v růstové mukózní fázi, obklopuje a chrání *Pseudomonas aeruginosa* před zevním působením (Ghadam, et al. 2017). Výsledkem extracelulárních produktů mikrobů je enzym proteáza. Tento enzym rozštěpí proteiny za pomoci proteolytické aktivity. Tímto mechanismem může poškodit stěny kapilár a zapříčinit tak vznik hemoragií a nekróz (Julák, 2015).

Enzym se také podílí na neschopnosti správného fungování komplementu a utlumení opsonizace a fagocytózy. Vedle proteáz produkují mikroby dva druhy hemolyzinů. Enzym fosfolipáza C a termostabilní glykolipid s cytotoxickým působením. Charakteristickým prvkem *Pseudomonas aeruginosa* je že pomocí plazmidů přijímá od jiných bakterií geny kódující mnohočetnou rezistenci. (Julák, 2015). Tato bakterie stojí za zvýšeným nárůstem rezistence v nemocničních zařízeních, lze hovořit o tzv. polyrezistenci (Votava, 2003).

### **3.2 Biofilm**

Biofilm lze definovat jako uskupení společně žijících mikroorganismů, které jsou připevněny k podkladu nebo k sousedním buňkám. Biofilm je uložen v extracelulárním matrixu, který produkuje polysacharidy lepidelného vzhledu, vytváří matici hlenového charakteru. Udržuje také mikrobiální buňky pospolu – v mikrokoloniích v podobě kanálků (Schindler, 2010).

Biofilm se v zásadě podílí na vzniku infekcí. (Aparna, et al., 2008). Chemická a fyzikální povaha struktury biofilmu vede k nadměrné rezistenci k antimikrobiálním látkám (Mah, et al., 2001).

K tvorbě biofilmu nejčastěji dochází v přítomnosti cizího tělesa – protetické chlopně srdce, ortopedické endoprotézy, PMK. Bakterie adherují na povrch cizího tělesa a začnou se množit. Dochází ke vzniku strukturovaného společenství bakterií, které mezi sebou komunikují a postupně se kolonie obalují slizovým obalem. Tímto mechanismem se bakterie brání a zásadně snižují účinek antibiotik (Beneš, 2009).

### **3.3 Diagnostika *Pseudomonas aeruginosa***

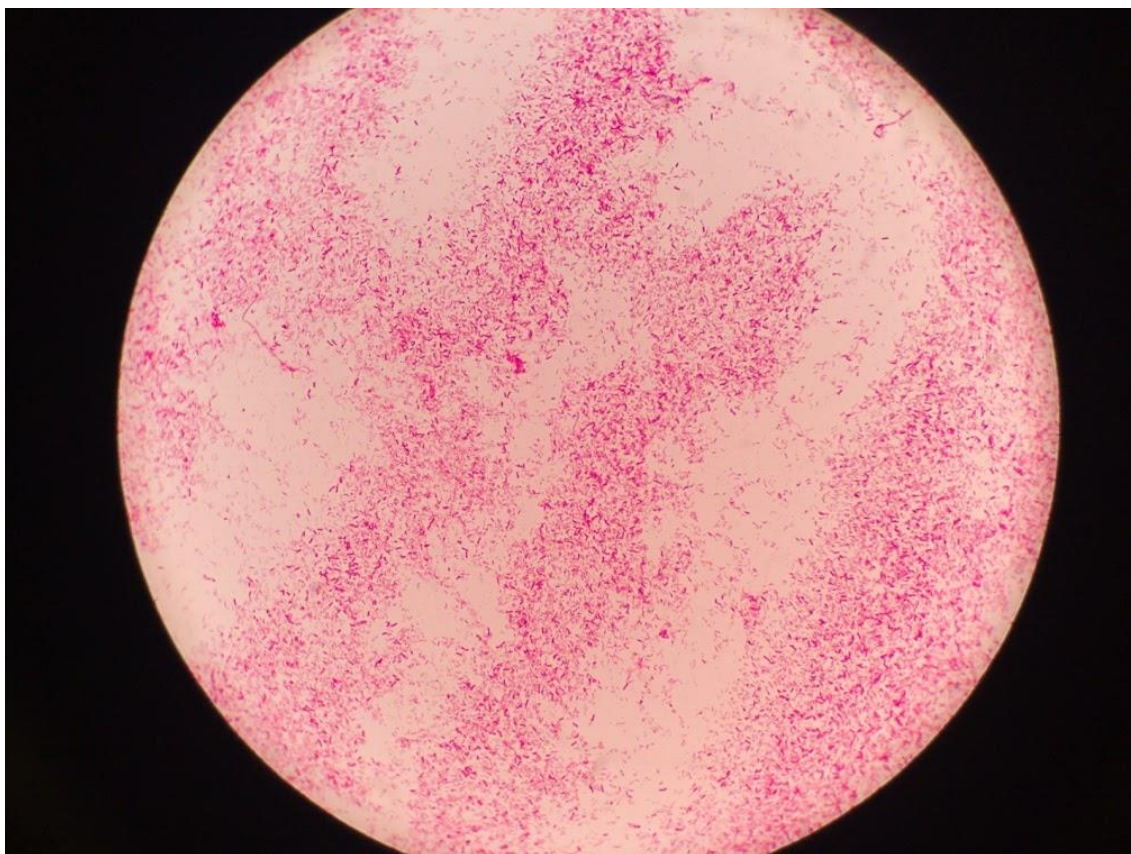
*Pseudomonas aeruginosa* lze diagnostikovat přímým průkazem – mikroskopií (barvení dle Grama) a kultivací. Barvením není možné provést identifikaci od ostatních Gram negativních bakterií, viz obrázek č.1.

#### **3.3.1 Barvení podle Grama**

Pracovní postup pro rozlišení Gram pozitivních od Gram negativních mikrobů je následující: (Bednař, 1996).

- 1) Provedeme tenký nátěr kolonií na podložní sklo z kultury nebo z klinického materiálu
- 2) Nátěr necháme zaschnout a následně ofixujeme buď krátkým protažením nad plamenem (3x) či namočením do metanolu na 3–5 min. Ofixovaný preparát obarvíme krystalovou violetí (necháme působit 20 sekund). Dojde ke vzniku tmavomodrého nebo modrofialového zbarvení buněčné stěny.
- 3) Přilejeme Lugolův roztok, který v místě obarvených struktur vytvoří jodový komplex (necháme působit 20 sekund).
- 4) Následně preparát odbarvujeme acetonem, dokud odtéká fialová barva. Účinkem alkoholu jsou bakterie schopné zadržet komplex krystalové violeti s roztokem jodu. Oproti jiným bakteriím se působením alkoholu snadno odbarví.
- 5) Výsledkem je, že grampozitivní bakterie odpovídají tmavomodrému zbarvení. Gramnegativní bakterie podléhají poslednímu kroku v barvení podle Grama.
- 6) Posledním krokem je dobarvení neředěným fuschinem na 5 sekund. Vznikne červené zbarvení. Základní rozlišení v barvení podle Grama závisí na rozdílné stavbě bakteriální buněčné stěny.

Obrázek č.1.: Obarvený preparát *Pseudomonas aeruginosa*



(Zdroj vlastní)

### 3.3.2 *Kultivace*

*Pseudomonas aeruginosa* není náročná na živiny a lze ji snadno vykultivovat. K růstu vyžaduje přítomnosti kyslíku. Na krevním agaru jsou kolonie větší s nerovnoměrným okrajem, často mají beta – hemolýzu. Jsou typické svým kovovým leskem. K růstu potřebuje organické základy živného média (agaru), kde velmi dobře roste. Živný agar obsahuje acetát sloužící jako původce uhlíku a amonné soli jako původce dusíku (Julák, 2015).

Při růstu na agaru se *Pseudomonas aeruginosa* vyznačuje tvorbou pigmentů. Modrozelený pigment pyocyanin (Lau, 2004), který oxiduje samovolně na

alfa- oxyfenazin a pigment žlutý fluorescein. Kolonie spíš voní po rostlině jasmínu a jejímu květu (Julák, 2015).

Tvůrcem zápachu jsou metabolity 2-aminoacetofenon a trimethylamin. Kromě zápachu mají některé kmeny charakteristický mukózní vzhled. Tyto bakterie vykazují různé růstové fáze. Označují se jako R – rough, drsné kolonie, S – smooth, hladké kolonie, pro poslední označení M je typický hlenovitý až mukózní vzhled (Julák, 2015).

### **3.4 Citlivost k antimikrobiálním látkám**

*Pseudomonas aeruginosa* patří mezi druhy obvykle přirozeně rezistentní na běžně používaná antibiotika (dále jen „ATB“) (Pang, 2019). Z tohoto důvodu je nutné použít protipseudomonádová ATB, na které ale může vzniknout získaná rezistence, a to i během terapie. Získaná rezistence tedy může zapříčinit neúspěšnost léčby (Votava, 2005). Proto je třeba uplatnit dvojí kombinaci antibiotik s přídatným působením, tzn. beta-laktamy s aminoglykosidy, s fluorochinolony, aminoglykosidy s flurochinolony (Teplan et al., 2004).

Získaná rezistence bývá zapříčiněna především schopností sbírat různé mechanismy rezistence od jiných bakterií. Jedná se například o tyto mechanismy – snížený vstup ATB do buňky, produkci četných beta-laktamáz (enzymy) či eflux ATB. Neblahým výsledkem je vznik multirezistentních kmenů. Volba ATB by proto měla vycházet z vyšetření citlivosti daného kmene (cílená léčba) (Štefan, 2019). Prevencí získané rezistence je nepřiklánět se k empirické léčbě ještě před vyšetřením kmene citlivosti na ATB (Votava, 2005).

*Pseudomonas aeruginosa* jako oportunní patogen (Schniederberend, 2019), postihuje hlavně oslabené jedince. Protipseudomonádová ATB jsou: piperacilin (s tazobaktamem), ceftazidim, cefepim, cefoperazon, karbapenemy (kromě ertapenemu), aminoglykosidy, ciprofloxacin, kolistin (Votava, 2005).



### **3.4.1 Stanovení citlivost *Pseudomonas aeruginosa* na antibiotika**

Ke stanovení citlivosti je nutné mít k dispozici vykultivovaný kmen *Pseudomonas aeruginosa* například na krevním agaru v čisté kultuře. Ke spolehlivému stanovení citlivosti je nutné dodržování předem stanovených postupů včetně zachování sterilních podmínek v laboratoři.

Základní metodou pro vyšetření citlivosti je Diskový difuzní test. K vyšetření MIC se poté používají E-test a mikrodiluční metoda.

### **3.4.2 Diskový difúzní test**

Diskový difúzní test je nejpoužívanější kvalitativní laboratorní metodou pro stanovení citlivosti k ATB v mikrobiologii. Test sestává ze savého papírového disku o průměru 6,5 mm, který je napuštěný antimikrobiální látkou. Vyšetřovaný kmen vytvoří okolo antibiotického disku inhibiční zónu. Zóny se měří v milimetrech (mm). Průměr zóny inhibice je úměrný citlivosti testovaného kmene (Votava, 2005).

Půdou pro stanovení citlivosti je Mueller – Hinton agar, který zaručuje homogenní růst bakteriálního kmene (Votava, 1999). Složení agaru je standardizované, obsahuje Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, thiamidin a thyamin. Dalším nezbytným prvkem k dosažení kvalitní citlivosti je výška agaru v Petriho misce. Výška odpovídá standardům; tedy 4 mm (Votava, 2005).

Jednotlivé bakterie mají pro každé ATB stanovený breakpoint neboli hranici, podle které se určuje, zda je daný kmen citlivý či rezistentní. Pokud je průměr inhibiční zóny (v mm) menší než breakpoint, je bakterie k ATB rezistentní; pokud je větší je citlivá (EUCAST.org).

### **3.4.3 Stanovení MIC pomocí mikrodiluční metody (bujonová mikrodiluční metoda)**

MIC je minimální koncentrace ATB, která inhibuje viditelný růst bakterií. Hodnotu MIC lze určit pomocí mikrodiluční metody, nebo E-testu. Mikrodiluční metoda se u *Pseudomonas aeruginosa* používá především u ATB kolistinu, protože u diskové difuzní metody není stanoven breakpoint. K dispozici jsou mikrotitrační destičky,

skládají se z určitého počtu jamek, které obsahují příslušné ATB ve stoupající koncentraci. Uvádí se v jednotkách mg/l (Votava, 2005).

*Pseudomonas aeruginosa* má kmeny citlivé na kolistin s  $MIC \leq 2$  mg/l a rezistentní s  $MIC > 2$  mg/l, viz příloha č.14 (EUCAST.org).

#### 3.4.4 Stanovení MIC pomocí E –testu

Jednoduchou metodou pro stanovení MIC je E – test. Zde se používá proužek nasycený příslušným ATB ve stoupající koncentraci s číselnou stupnicí. Tenký proužek se pokládá na naočkovanou misku podobně jako u disky ATB u diskového difuzního testu. Výsledkem je vejčitý tvar inhibiční zóny. V místě, kde se dotýká okraj inhibiční zóny hodnotové stupnice je hodnota MIC, viz obrázek č.2 (Votava, 2005).

Obrázek č.2.: E – test Ceftolozan/tazobactam *Pseudomonas aeruginosa*



(Zdroj vlastní)

## **4. Praktická část**

### **4.1 Metodika výzkumu**

Základem výzkumu je důkladný sběr dat o výskytu *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích moči u pacientů ve VFN v Praze na Urologické klinice za období od začátku roku 2017 do konce roku 2019. Kompletní statistický přehled jsem zpracovala z dostupných dat laboratorního systému JanigaLabs v bakteriologické laboratoři. Veškeré získané materiály využiji k vytvoření statistického průzkumu během uplynulých tří let. Kromě celkového výskytu potvrzeného patogenu je také důležitý antibiogram na příslušná ATB. Poskytnuté údaje o rezistenci k ATB jsou graficky znázorněny vůči ostatním ATB ve zkoumaném období včetně porovnání antimikrobiální rezistence z dat European Centre for Disease Prevention and Control.

Mikrobiologické vyšetření spočívá v záchytu bakterií v biologických vzorcích, v průběhu celého mikrobiologického vyšetření musí být dodrženy akreditované standardní operační postupy stanovující pravidla pro odběr vzorku a kultivaci moči. Pro kultivaci je důležité správně provedený odběr moči do sterilních zkumavek. Dále musí být dodržen správný postup transportu vzorku do laboratoře při chladničkové teplotě (2–8 °C) v době dodání vzorku ke zpracování (nejpozději do 2 hodin po odběru).

Biologický vzorek je označen laboratorním číslem, pod kterým vstupuje do analytické fáze a zároveň i vystupuje na definitivním výsledkovém listu laboratoře. Aby bylo dosaženo kvalitního výsledku je nutné dodržet veškeré instrukce před samostatným stanovením (preanalytická fáze), v průběhu stanovení (analytická fáze), a po stanovení (postanalytický fáze).

### **4.2 Preanalytická fáze**

Fáze, která je nezbytně nutná pro získání validního výsledku během celého laboratorního vyšetření.

Preanalytickou fází ovlivňuje zejména zdravotnický personál včetně lékařů, kteří dávají pokyn k laboratornímu vyšetření. Kromě zdravotnického personálu má na danou fázi

významný vliv poučení pacienta o technice odběru moči. Není-li pacient řádně poučen, například o tom, že je před odběrem nutné řádné očištění genitálu může dojít při odběru moči ke kontaminaci vzorku lokální flórou a výsledek kultivace potom není validní (Benáková, 2006).

Vyjma pacientů je třeba řádně poučit zdravotnický personál. Personál by měl znát techniku odběru, použití vhodné odběrové zkumavky pro konkrétní typ laboratorního vyšetření. V případě nedodržení stanoveného postupu personálem není možné kvalitní zpracování vzorku a výstup z laboratoře poté není adekvátní. Vzorek pacienta je nutné vrátit zpět na oddělení s požadavkem na nový, správně odebraný vzorek (materiál) (Benáková, 2006).

Problémem v preanalytické fázi často bývají nesprávně označené zkumavky s biologickým materiálem, kdy není možné provést identifikaci pacienta. Záměna pacientů následně znemožňuje postup do další laboratorní fáze, vzorek se neprodleně vrací na oddělení, kde byl odebrán. Následuje zápisu do laboratorní karty neshod s uvedeným typem neshody a její nápravy po konzultaci s oddělením (Benáková, 2006).

Preanalyticou fázi dále členíme na mimolaboratorní a laboratorní, rovněž se rozlišují zdroje ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mimolaboratorní preanalytická fáze obsahuje přípravu pacienta, odběr biologického vzorku a adekvátní transport vzorku do laboratoře. Laboratorní preanalytická fáze zahrnuje identifikaci vzorku, centrifugaci, skladování a přípravu vzorku před vlastním vyšetřením (Benáková, 2006).

#### **4.2.1 Odběr biologického vzorku moče**

Standardním postupem je odběr středního proudu první ranní moči. Před odběrem je nutné řádně očistit genitál, aby nedošlo ke kontaminaci lokální flórou (především gastrointestinální) což vede k tomu, že výsledek není validní (Benáková, 2006).

Moč se odebírá do sterilní zkumavky o objemu 10 ml. Poté se moč doručuje ihned do laboratoře, pokud není možný okamžitý transport, je vhodné uchovat moč při chladničkové teplotě 2–8 °C, a to maximálně po dobu 16 hodin, než dojde k dopravení

do laboratoře. Obvyklá doba transportu vzorku do laboratoře jsou 2 hodiny po odběru (Benáková, 2006).

Odběr vzorku závisí na druhu a způsobu získání sterilní moče. Lze rozlišit samovolně vyloučenou moč pacienta – spontánní, moč z permanentního močového katétru, získanou za důkladných aseptických podmínek a dále moč získanou tzv. suprapubickou punkcí – punkční jehlou přes břišní stěnu (Benáková, 2006).

Poslední varianta odběru je získání moče katetrizací pomocí jednorázové sterilní cévky, která se zavádí do močové trubice rovnou k močovému měchýři (Vytejková et. al., 2013).

### **4.3 Analytická fáze**

V této fázi je nutné používat ochranné pomůcky jako jsou ochranné rukavice, oděv, plášť a adekvátní obuv do laboratoře.

#### **4.3.1 Příjem vzorku do laboratoře**

Příjem vzorku probíhá v příjmové laboratoři, kde dochází k řádné kontrole štítku pacienta se štítkem uvedeným na žádance. Následuje kontrola, zda je vzorek odebrán do správné zkumavky. V případě nevalidního vzorku (vylití biologického materiálu) a neshod na žádance se informuje dané oddělení a vzorek je vrácen zpět s požadavkem na provedení nového odběru s novou žádankou pacienta.

V případě správné žádanky pacienta včetně správného odběru biologického materiálu dostává vzorek se žádankou jedinečné laboratorní číslo. Pod laboratorním číslem vystupuje vzorek pacienta během vyšetření až do výstupu výsledku v papírové formě z laboratoře.

#### **4.3.2 Kultivace vzorku**

Po důkladném promícháním vzorku moče následuje vyočkování na pevnou kultivační půdu s krevním agarem a chromogenní půdou Uriselect (tzv. víceúčelová močová

destička) od výrobce Viamar International, s.r.o. Inokulace se provádí semikvantitativní ředící metodou, viz příloha č.1.

Kultivační močová destička je rozdělena na šest čtvercových částí, které jsou naplněné kultivačními půdami: tři jamky tvoří Uriselect a tři jamky krevní agar. Kultivace se provádí za pomoci dvou kalibrovaných bakteriologických kliček o objemu 10  $\mu$ l a 1  $\mu$ l a 1 ml fyziologického roztoku, který je využíván pro ředění vzorku, viz příloha č.2.

Po důkladném promíchání vzorku moče se ponoří kolmo bakteriologická jednorázová klička o objemu 10  $\mu$ l a naočkuje se na Uriselect do první jamky a vedle na krevní agar způsobem základního kříže a od středu do stran očkujeme po celé ploše agaru. V prvních jamkách je neředěný vzorek moče. Poté stejnou kličkou 10  $\mu$ l naředíme vzorek moče do 1 ml sterilního fyziologického roztoku, obojí se promíchá a naočkuje 10  $\mu$ l kličkou do druhé jamky močové destičky. Nakonec se poslední čistou 1  $\mu$ l kličkou přenesou naředěná moč a naočkuje se do poslední jamky močové destičky. Nyní dojde na přikrytí víčkem a uložení vzorku do termostatu na 18–24 hodin při teplotním rozmezí od 35 °C do 37,5°C.

Následující den vyhodnotí pověřený lékař nárůst jednotlivých bakteriálních kolonií v jednotkách CFU/ml (colony forming units). Při nálezů signifikantní bakteriurie indikuje lékař stanovení citlivosti pomocí diskové difuzní metody na příslušná antibiotika.

Pokud je ve vyloučené spontánní moči nález bakterií v kvantitě menší než 10<sup>4</sup> CFU/ml, jedná se s největší pravděpodobností o kontaminaci. V případě vycévkované moči značí jakýkoliv nález signifikantní bakteriurie. Při nálezů 10<sup>5</sup> CFU/ml je pravděpodobnost IMC vysoká, viz příloha č.3. V takovém případě lékař podá pokyn ke stanovení citlivosti na antibiotika, eventuálně provedení dourčení bakteriálního kmene za pomoci biochemických vlastností nebo k přímé identifikaci mikroba hmotnostní spektrometrií MALDI – TOF.

K identifikaci *Pseudomonas aeruginosa* se používá diagnostický test pro okamžitý průkaz cytochromoxidázové aktivity.

### **4.3.3 OXIstrip**

Jde o diagnostickou soupravu vyvinutou výrobcem TestLine Clinical Diagnostics s.r.o., viz příloha č. 4. Slouží k rychlému průkazu cytochromoxidázové aktivity *Pseudomonas aeruginosa*. Aby mohla bakterie produkovat energii, potřebuje k tomu cytochrom c oxidázu, enzymatický komplex zabudovaný v membráně bakterií, který je součástí dýchacího řetězce (Arai, 2011).

Mikrobiologický test slouží k průkazu přítomnosti cytochromoxidázové aktivity. Principem je reakce N, N-dimethyl-1,4-fenylendiaminu a  $\alpha$ -naftolu s enzymem cytochromoxidázy za vzniku viditelného indofenolové modři. K průkazu se používá testovací proužek s papírovou zónou na konci, který je napuštěný roztokem N, N- dimethyl-1,4-fenylendiaminu a  $\alpha$ -naftolu.

Při pracovním postupu je důležité dodržení techniky stěru papírovou zónou diagnostického proužku z několika bakteriálních kolonií na Petriho misce. V daném případě dojde k rychlé reakci a výsledek hodnotíme po uplynutí jedné minuty.

Vyhodnocení testu je jednoduché, okem viditelné. Negativní reakce se neprojeví žádnou barevnou změnou na papírové zóně. Pozitivní reakce se projeví v místě nanesení kolonií tmavě modrým zbarvením, viz příloha č.5.

### **4.3.4 MALDI-TOF MS; Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry**

MALDI-TOF MS je definována jako rychlá, výkonná identifikace mikrobů pomocí ionizace laserem za přítomnosti matrice, spojené s detekcí doby letu. (Dingle et al., 2013), viz příloha č.6.

### **4.3.5 Stanovení citlivosti diskovou difúzní metodou**

Disková difúzní metoda je kvalitativní metoda, za jejíž pomoci se stanoví citlivost *Pseudomonas aeruginosa* na testovaná ATB.

Před samotným stanovením je důležité označení Petriho misek laboratorním číslem, na kterých bude zadaná požadovaná citlivost antibiotických disků, určení kolonií, ze kterých bude daná metoda stanovena. Pro převážnou část bakteriálních kmenů a k určení citlivosti k antimikrobiálním látkám se používá Mueller – Hintonův agar, viz příloha č.7. Pro růstově náročnější bakterie (pneumokoky, hemofily, streptokoky) je nutné použití Mueller – Hintonův agaru obohacený krví.

Na začátku je podstatná příprava inokula. Laborant provede náběr sterilní kličkou z jednotlivých čistých bakteriálních kolonií z pevné půdy, viz příloha č.8. Stáří určovaných izolátů by nemělo přesáhnout 24 hodin. Kličkou se přenesou zkoumaný kmen do sterilní zkumavky s 2 ml fyziologického roztoku. Následuje protřepání zkumavky na třepačce a změření hustoty vytvořeného zákalu pomocí přístroje (denzimetru) na požadovanou hodnotu 0,5 McFarlanda, viz příloha č.9.

Jako další krok následuje provedení inokulace sterilním vatovým tampónem, který se ponoří do zkumavky se suspenzí odpovídajícího zákalu. Valivým pohybem se rozetře na celou plochu Mueller – Hintonového agaru (Nassar, 2019), viz příloha č.10. Klíčové je nanesení ATB disků nejpozději do 15 minut po naočkování suspenze na misku. V této fázi se naráží ATB (maximálně 6 disků) prostřednictvím aplikátorů, tzv. raznic, viz příloha č.11. Po naražení disků antibiotikum difunduje do okolí. Průměr Petriho misek by měl být 90 mm, a to z toho důvodu, aby středy disků byly 2,5 cm od sebe. Plotny s naraženými ATB se uloží do termostatu na dobu 18–24 hodin (u pomalu rostoucích bakterií 48 a více hodin) při teplotě 37 °C. Odečet příslušných zón vyhodnocuje lékař následující den.

#### **4.3.6 MIC kolistinu stanovené pomocí mikrodiluční metody**

Jedná se o mikrodiluční metodu, která se provádí, pokud lékař identifikuje kmen *Pseudomonas aeruginosa*, který je rezistentní na stanovovaná antibiotika. V rámci dourčení citlivosti k rozšířené sadě ATB se stanovuje i MIC kolistinu. Principem testu je stoupající koncentrace ATB v jamkách pomocí Mueller Hinton II bujonu s bakteriální suspenzí. Po 16–20hodinové inkubaci v termostatu jsou výsledky vyhodnoceny.



K její realizaci je nutné mít dostatek laboratorních pomůcek k tomu určených jako jsou: sterilní fyziologický roztok, Mueller – Hintonův bujon II adjustovaný na kationty, sterilní zkumavky, sterilní vaničky o 60 ml, rámeček na stripy, pipety na 100  $\mu$ l a pipetu na 20–60  $\mu$ l, denzimetr a ostatní laboratorní vybavení mikrobiologické laboratoře (kličky, kahan, třepačky), viz příloha č.12.

K zahájení pracovního postupu je důležitý bakteriální zákal vytvořený ve zkumavce sterilního fyziologického roztoku o hustotě přesně 0,5 McFarlanda. Hustota se ověřuje denzitometrem. Z bakteriální suspenze ve fyziologickém roztoku se přenes 60  $\mu$ l do skleněné zkumavky o objemu 13 ml suspenzního media MIC. Bakteriální suspenze ve zkumavce se řádně promíchá (celkem 10x).

Z vyrobených destiček od společnosti MIKROLATEST se stripy se vyjme pouze jedna. Strip má 8 jamek (A-H) o různých koncentracích antimikrobiální látky, viz příloha 13. Jamka H slouží jako kontrola růstu bakteriálního kmene. Jamky od G obsahují kolistin podle koncentrační řady na destičce v mg/l, od nejnižší koncentrace 0,25 mg/l do největšího ředění 16 mg/l. Koncentrační řada kolistinu odpovídá hodnotám 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 mg/l.

Strip se náležitě označí laboratorním číslem a vloží se do volného rámečku. Poté se vyplní suspenzním médiem s inokulem po 100  $\mu$ l do každé jamky stripu. Inokulovaný strip se vloží do PE sáčku, jehož okraje se zahnou pod rámeček, tak aby nedošlo k vysušení inokula. Destička je uložena do termostatu na požadovanou dobu inkubace.

Před vyhodnocením lékař vyjme destičku z PE sáčku a odečte nárůst v jamkách.

Jádrem vyhodnocení je, že v jamce s kontrolou růstu (jamka v řadě H) musí odečítající pracovník vidět nárůst. Jestliže nárůst není, nelze test vyhodnotit. Důvodem znehodnoceného testu může být nesprávná manipulace s pipetou, neodpovídající zákal bakteriální suspenze, nevhodné zacházení se stripem v termostatu.

Interpretace výsledků závisí na tzv. klinických breakpointech pro antimikrobiální látky.

Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), který definuje citlivosti a rezistence bakterií.

Hraniční hodnota, která určí, zda jsou bakterie citlivé, nebo rezistentní se nazývá breakpoint.

Při vyhodnocování výsledků stanovujeme hodnotu MIC, která je buď vyšší či nižší než breakpoint pro danou bakterii. Pokud je bakterie citlivá (C, S; susceptible), bude dané antibiotikum v léčbě účinné. Pokud je rezistentní (R; resistant), je třeba využít jiné antibiotikum, aby byla léčba úspěšná (EUCAST.org.).

#### 4.4 Postanalytická fáze

Po analytické fázi následuje vyhodnocení vzorku pacienta lékařem. Po uplynutí doby inkubace odečítající lékař vyhodnotí průměry zón inhibice testovaného kmene za použití kalibrovaného měřítka v mm.

Během odečítání asistuje lékaři příslušný laborant, který zapisuje do laboratorního protokolu v programu JanigaLabs průměry zón k uvedeným ATB. Vyhodnocení diskového difuzního testu je následující: jeli průměr inhibičních zón stejný nebo větší než breakpoint referenčních kmenů, je zkoumaný kmen k ATB citlivý, viz obrázek č.3. V případě, že je průměr zóny menší než breakpoint, je testovaný kmen k ATB rezistentní, viz obrázek č.4 (Kupidlovská, 2017).

Vyhodnocení MIC E – testem. Po uplynutí inkubační doby se hodnotí elipsa inhibovaného růstu kolem speciálního proužku, který je napuštěný zvyšující se koncentrací ATB. V místě, kde elipsa protíná číselnou řadu zvyšující se koncentrace ATB se odečítá MIC. Výsledná hodnota MIC se porovnává s danou hraniční koncentrací pro citlivé kmeny. Kmeny, které mají hodnotu MIC stejnou nebo nižší, než je hraniční koncentrace jsou citlivé. V případě vyšší MIC, než je hraniční hodnota jsou kmeny rezistentní (Kupidlovská, 2017).

Při vyhodnocení MIC u mikrodiluční metody se hodnotí zákal. Za MIC se usuzuje nejnižší koncentrace ATB, která zabráni okem viditelný růst *Pseudomonas aeruginosa*. Na mikrotitrační destičce hodnotíme první jamku, která je čirá (bez viditelného zákalu). Následně se podíváme do tabulky, jaká koncentrace ATB je v této jamce. Například u kolistinu je breakpoint 2 mg/l, pokud tedy první čirá jamka obsahuje

koncentraci ATB nad 2 mg/l je kmen rezistentní; pokud obsahuje koncentraci pod 2mg/l, je citlivý (zdroj tabulka, viz příloha č. 15).

V základní řadě pro vyšetření citlivosti *Pseudomonas aeruginosa* jsou ATB: ceftazidim, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, meropenem, piperacilin/tazobaktam, kolistin. Získaná rezistence se často projeví nejprve u meropenemu. Pokud je citlivost meropenemu intermediální, dourčujeme stanovení MIC E-testem. Disk kolistinu v první řadě slouží pouze jako screening. V případě rezistentního kmenu, kdy jsou zóny většiny ATB menší, než je breakpoint, dourčujeme MIC kolistinu pomocí mikrodiluční metody. Navíc se vyšetřuje doplňková sada antibiotik, do které spadají například ceftazidim/avibaktam a ceftolozan/tazobaktam. Toto jsou rezervní ATB – tedy pouze pro léčbu infekcí způsobených multirezistentními kmeny (Jindrák, 2014).

## 5. Vyhodnocení

Celkový příjem vzorků moči za období let (2017–2019) z urologické kliniky VFN v Praze činil v roce 2017; 10 436 vzorků, v roce 2018; 10 998 vzorků, v roce 2019; 10 822 vzorků.

Ve VFN v Praze na Urologické klinice bylo za období let 2017–2019 vykultivováno v souhrnu 426 pozitivních izolátů *Pseudomonas aeruginosa* v moči. Potvrzených kmenů *Pseudomonas aeruginosa* v moči v roce 2017 bylo 126, v roce 2018; 129 a v posledním roce 2019 bylo 171 vzorků (Graf č.1). Z uvedené statistiky vyplývá, že nález *Pseudomonas aeruginosa* v moči převažuje u mužů, protože *Pseudomonas aeruginosa* je nozokomiální patogen a často se šíří v nemocnicích. Vzhledem k tomu, že jde o patogenu, je třeba zvýšit dezinfekci rukou personálu a nemocničního prostředí. Také je důležité nenechávat PMK pacientům příliš dlouho, musí se pravidelně vyměňovat.

Ohrožené IMC jsou i ženy. Ženská močové trubice je krátká a zároveň vyústíuje v blízkosti pochvy a konečníku, kde je vyšší pravděpodobnost osídlení bakteriemi lokální flóry. U mužů se IMC vyskytují vzácněji a jsou vždy komplikované tzn. na podkladě různých patologií v oblastní močového traktu (vrozené malformace, hypertrofie prostaty).

Celkem potvrzených izolátů *Pseudomonas aeruginosa* v moči v roce 2017 bylo 126 od 7 733 pacientů (1,63 %). V roce 2018 bylo 129 izolátů *Pseudomonas aeruginosa* od 9 260 pacientů (1,39 %). V posledním roce 2019 bylo 171 izolátů od 9 314 pacientů (1,84 %).

Celkový počet pozitivních nálezů *Pseudomonas aeruginosa* v prvních dvou letech je téměř totožný. V posledním roce došlo k mírnému zvýšení počtu zachycených pozitivních izolátů *Pseudomonas aeruginosa* v moči.

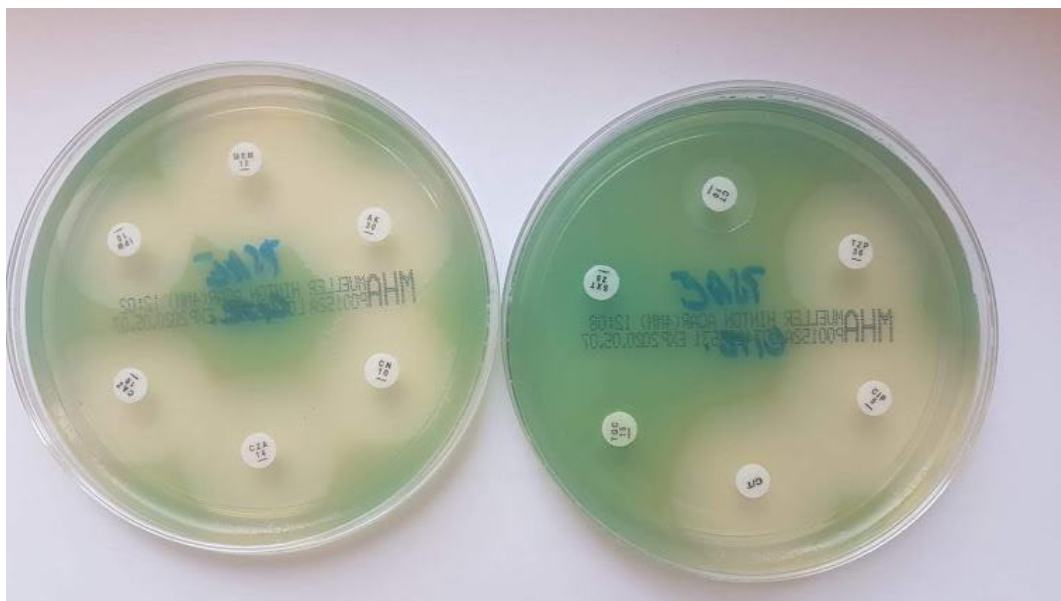
Celkem bakteriologická laboratoř zpracovala z urologické kliniky za uplynulé tři roky 32 256 vzorků moči.

Na základě koláčových grafů (Graf č. 2, 3, 4) lze usoudit, že nejpočetnější záchyt *Pseudomonas aeruginosa* je v moči z katétrů. Problémem dlouhodobě zavedeného PMK je, že dochází ke vzniku biofilmu, například s podílem *Pseudomonas aeruginosa*. Tento

mikrob osídluje především umělá cizí tělesa (PMK, tracheostomické kanyly). Je poté důležité zhodnotit, zda se jedná pouze o kolonizaci či jde o opravdu o infekci, kterou je třeba zaléčit.

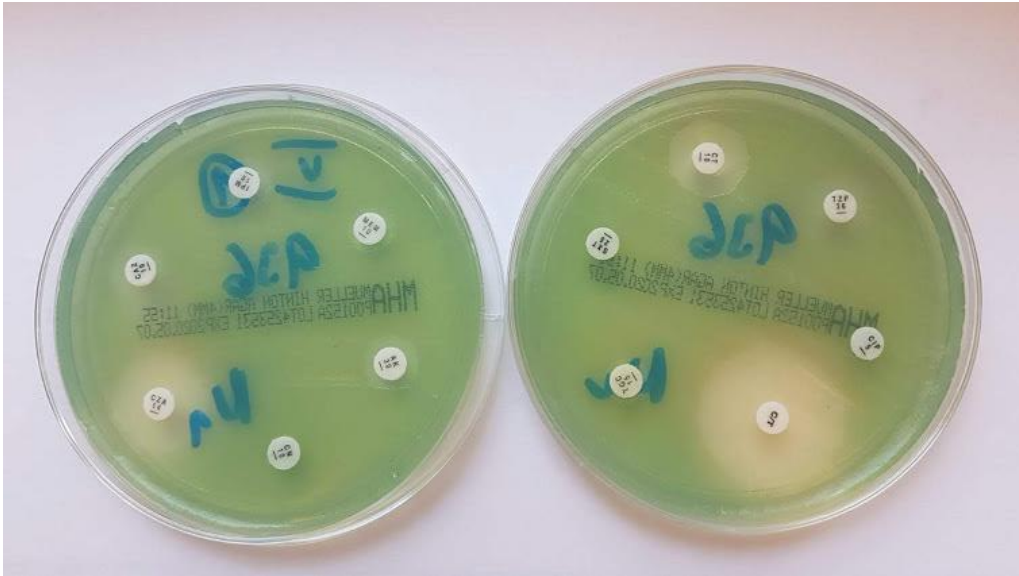
Z hlediska preventivních opatření je důležité, aby PMK měli pouze pacienti, kteří ho opravdu potřebují (jedná se o pacienty s obstrukcí močových cest, po chirurgickém výkonu během operace a krátce po ní). Dále by měl být kladen důraz na správnou techniku zavádění močových katetrů, správnou techniku péče o močové katetry včetně včasné výměny katetru.

Obrázek č.3.: Citlivý kmen *Pseudomonas aeruginosa*.



(Zdroj vlastní)

Obrázek č.4.: Rezistentní kmen *Pseudomonas aeruginosa*



(Zdroj vlastní)

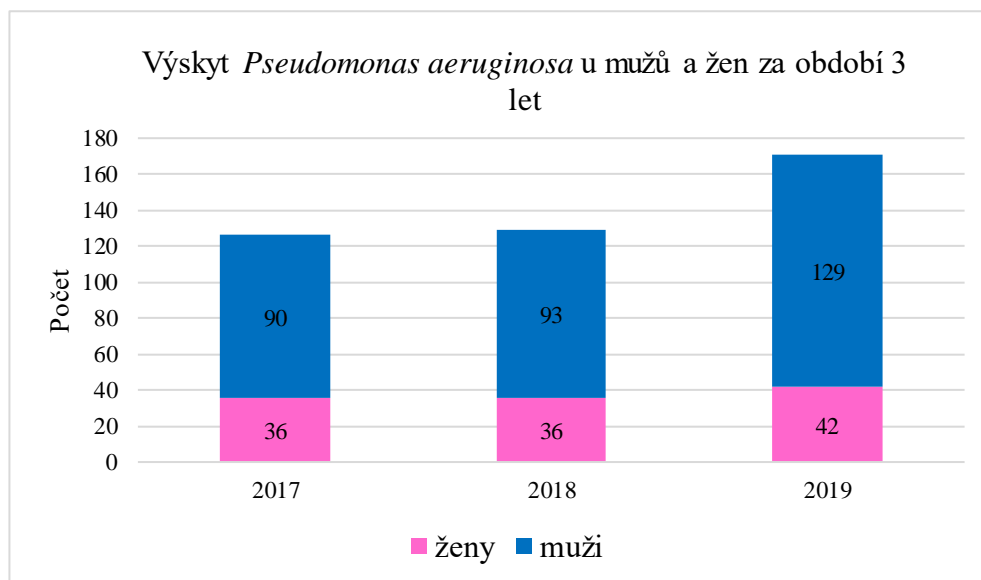
Obrázek č.5.: Vyhodnocení MIC kolistinu odpovídá hodnotě 1, *Pseudomonas aeruginosa* je citlivá ke kolistinu.



(Zdroj vlastní)

## 6. Statistický přehled výskytu *Pseudomonas aeruginosa* na Urologické klinice Všeobecné fakultní nemocnice v Praze od roku 2017 do roku 2019

Graf č.1.: Výskyt *Pseudomonas aeruginosa* u mužů a žen za období 3 let



(vlastní výzkum, JanigaLabs)

Graf č. 2.: Nález *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorku moči za období 2017



(vlastní výzkum, JanigaLabs)

Graf č. 3.: Nález *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorku moči za období 2018



(vlastní výzkum, JanigaLabs)

Graf č.4.: Nález *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorku moči za období 2019.



(vlastní výzkum, JanigaLabs)



Tabulka č.1.:

Nález *Pseudomonas aeruginosa* u mužů a žen na odděleních Urologické kliniky ve VFN v Praze v roce 2017.

	URO - LO	URO - AMB	URO - JIP dospělí	URO - JIP děti
ženy	6	29	1	0
muži	17	72	1	0

URO – LO: Urologická klinika – lůžkové oddělení; URO – AMB: Urologická klinika – ambulance; URO – JIP dospělí: Urologická klinika – jednotka intenzivní péče – dospělí; URO – JIP děti: Urologická klinika – jednotka intenzivní péče – děti

Tabulka č.2.:

Nález *Pseudomonas aeruginosa* u mužů a žen na odděleních Urologické kliniky ve VFN v Praze v roce 2018.

	URO - LO	URO - AMB	URO - JIP dospělí	URO - JIP děti	URO - ONKO
ženy	6	28	1	0	1
muži	20	71	0	2	0

URO – LO: Urologická klinika – lůžkové oddělení; URO – AMB: Urologická klinika – ambulance; URO – JIP dospělí: Urologická klinika – jednotka intenzivní péče – dospělí; URO – JIP děti: Urologická klinika – jednotka intenzivní péče – děti

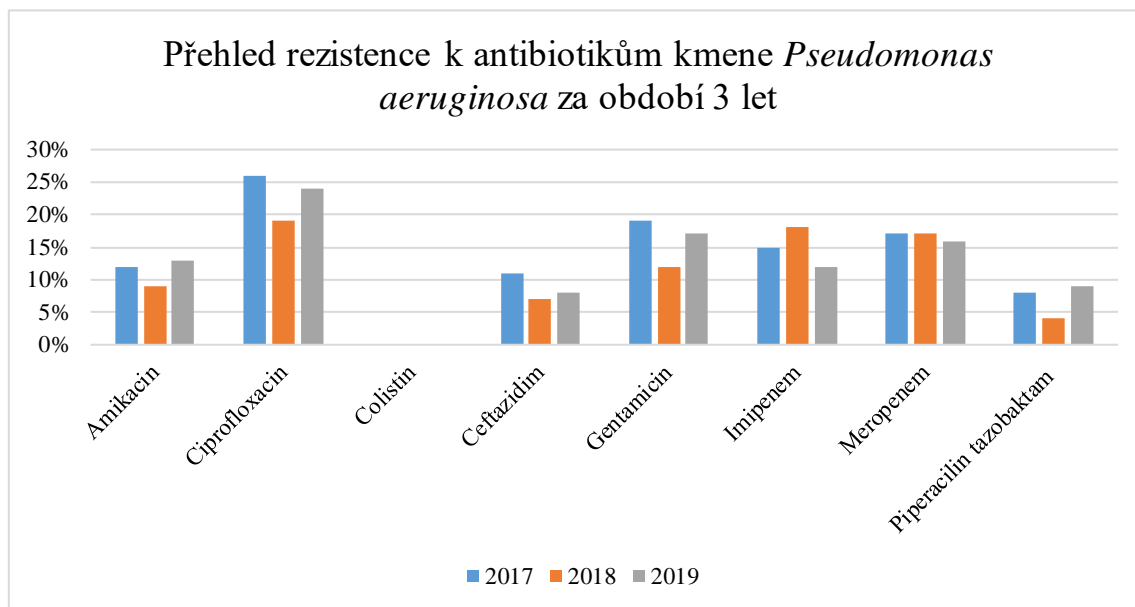
Tabulka č.3.:

Nález *Pseudomonas aeruginosa* u mužů a žen na odděleních Urologické kliniky ve VFN v Praze v roce 2019.

	URO - LO	URO - AMB	URO - JIP dospělí	URO - JIP děti	URO - ONKO
ženy	4	30	1	1	6
muži	19	92	2	0	16

URO – LO: Urologická klinika – lůžkové oddělení; URO – AMB: Urologická klinika – ambulance; URO – JIP dospělí: Urologická klinika – jednotka intenzivní péče – dospělí; URO – JIP děti: Urologická klinika – jednotka intenzivní péče – děti

Graf č. 5.: Přehled rezistence k antibiotikům kmene *Pseudomonas aeruginosa* za období 3 let



## 7. Diskuze

Prevalence kmenů *Pseudomonas aeruginosa* zachycených ve vzorcích moči na Urologické klinice ve VFN v Praze je nízká vzhledem k počtu přijatých vzorků moči, kterých bylo za období tří let (2017–2019) 32 256. Celkový počet identifikovaných kmenů *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích moči za období roku 2017 je 126. Mírný vzestup následoval v období roku 2018, a to na souhrnných 129. Poslední rok mého statistického vyhodnocení počet identifikovaných kmenů *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích moči vzrostl na 171.

Z výše uvedeného antibiogramu, který jsem vytvořila za předešlé tři roky (2017–2019) je antimikrobiální rezistence k *Pseudomonas aeruginosa* následující. V roce 2017 byla rezistence na antibiotika: amikacin (12 %), ciprofloxacin (26 %), kolistin (0 %), ceftazidim (11 %), gentamicin (19 %), imipenem (15 %), meropenem (17 %), piperacilin/tazobaktam (8 %). O rok později (2018) rezistence odpovídala procentům: amikacin (9 %), ciprofloxacin (19 %), kolistin (0 %), ceftazidim (7 %), gentamicin (12 %), imipenem (18 %), meropenem (17 %), piperacilin/tazobaktam (4 %). V posledním zkoumaném roce (2019) byla rezistence na *Pseudomonas aeruginosa* nepatrně odlišná: amikacin (13 %), ciprofloxacin (24 %), kolistin (0 %), ceftazidim (8 %), gentamicin (17 %), imipenem (12 %), meropenem (16 %), piperacilin/tazobaktam (9 %).

Antimikrobiální rezistenci tedy považuji za nízkou, až na malé výjimky. Citlivé kmeny převládají nad rezistentními, což je pozitivním faktorem při následné léčbě, kdy může lékař vybírat z širšího spektra ATB a není nucen použít tzv. rezervní antibiotika.

Obecně se uvádí, že antimikrobiální rezistence neustále vzrůstá na celém světě. Například studie provedená v Rumunsku na urologickém oddělení ukázala, že rezistence k ATB rostla rychlým tempem. Studie se zaměřila na období od ledna 2015 – října 2015. U pacientů, kteří měli pozitivní nález ve vzorku moči byla následně stanovena citlivost na ATB. Celkový počet hospitalizovaných pacientů od ledna – října 2015 činil 1 745, z toho bylo pozitivních vzorků moči 180, ze kterých byla ATB rezistence potvrzena u 125 pacientů. Z počtu 180 pacientů bylo 104 žen a 76 mužů. ATB rezistence byla u 56 žen a 69 mužů. *Pseudomonas aeruginosa* byla potvrzena pouze u dvou pacientů. Největší

zastoupení měla *Escherichia coli* jako nejčastější patogen IMC. Rezistence ATB u dvou pacientů s *Pseudomonas aeruginosa* byla 100 %. Dále bych dodala, že u dvou potvrzených případů nálezu *Pseudomonas aeruginosa* v moči se jednalo o dva muže s PMK. (Rădulescu, 2015). Studie poukazuje na to, že pacienti z urologických klinik jsou vystaveny velkému rozvoji antimikrobiální rezistence v souvislosti se zaváděním katétrů.

V porovnání s mojí studií je rozdíl v záchytu *Pseudomonas aeruginosa* u mužů a žen. V mém výzkumu převládají muži (312) nad ženami (114).

Studie z Nizozemska provedla sledování citlivosti na ATB na *Pseudomonas aeruginosa* na urologické klinice na JIP, za období let (1998–2010) bylo odebráno 1 927 izolátů *Pseudomonas aeruginosa* od 1 393 urologických pacientů. Účelem této studie bylo vyhodnotit trendy v antimikrobiální rezistenci na *Pseudomonas aeruginosa* v průběhu uvedených let. Studie zaznamenala významný vzestup trendů rezistence kmenů *Pseudomonas aeruginosa* na JIP. Piperacilin/tazobaktam (z 1,2 % na 12,1 %), ceftazidim (z 1,2 % na 7,8 %), imipenem (z 6 % na 19,1 %), meropenem (z 8,3 % na 17 %), ciprofloxacin (z 13,1 % na 31,3 %) (Croughs, 2012).

Pokud spolu porovnáme výsledky z mé studie, lze uvést, že zkoumané období, na které jsem se zaměřila v práci já, je kratší, avšak mám za to, že v mé práci je procentuální antimikrobiální rezistence k *Pseudomonas aeruginosa* srovnatelná a téměř neměnná v čase s minimálním výkyvem.

Studie z jihu Maďarska zaměřená na *Pseudomonas aeruginosa* (IMC) za období let (2008–2017) uvádí, že záchyt *Pseudomonas aeruginosa* v moči u ambulantních pacientů činil 575 a 1045 u hospitalizovaných pacientů. Na základě provedeného diskového difusního testu byla určena antimikrobiální rezistence na karbapenemy (22,16 %), ciprofloxacin (64,34 %), gentamicin (60,17 %), amikacin (27,57 %) (Gajdács, 2020).

Podle mého názoru je vždy nutné při stanovení procentuální antimikrobiální rezistence zohlednit povahu pracoviště, rozsah poskytované péče, i to, zda se jedná o lůžkovou, či ambulantní péči. Pokud je zdravotnické zařízení akreditované, můžeme očekávat nižší stupeň výskytu rezistentních kmenů oproti neakreditovaným zařízením.

Každá studie se liší délkou doby pozorování a místem. Rozdílná jsou i vstupní data a výsledky. Mám za to, že v rámci porovnaných studií si stojíme lépe. Důvodem jistě může být odlišná kvalita zdravotnictví v konkrétním státě, poloha státu včetně klimatických podmínek, střídání používání antibiotik ve zdravotnictví a zemědělství. Dá se předpokládat, že do budoucna se bude antimikrobiální rezistence zvyšovat, pokud se nezmění nadměrné užívání antibiotik pouze na stavy, kdy je to nezbytně nutné.

Z dat ze sledovacího atlasu prevalence rezistentních invazivních kmenů (mikroorganismus dokáže překonat obranné mechanismy hostitele a pomnoží se tak v jeho tkáních) (Beneš, 2009) vyplývá, že antimikrobiální rezistence *Pseudomonas aeruginosa* za rok 2017 v České republice odpovídá následujícím procentům: 23,0 % na piperacilin/tazobaktam, 13,4 % na ceftazidim, 14,4 % na aminoglykosidy a 14,8 % na karbapenemy. V porovnání s okolními státy jsou hodnoty antimikrobiální rezistence vyšší zejména na Slovensku a v Polsku. Vyšší antimikrobiální rezistence na Slovensku je na piperacilin/tazobaktam (42,8 %), dále na ceftazidim (35,6 %), aminoglykosidy (36,0 %) a karbapenemy (47,0 %). Nižší procentuální zastoupení v antimikrobiální rezistenci má Německo, a to pouze na aminoglykosidy, kde je rezistence 4,8 % (ecdc.europa.eu).

O rok později došlo k mírnému zvýšení antimikrobiální rezistence v České republice. Konkrétně u ATB ceftazidim o 7 %, u aminoglykosidů o 4,9 %. Naproti tomu se v Německu antimikrobiální rezistence na aminoglykosidy snížila o 1,2 %. Na karbapenemy však byla rezistence vyšší o 3,2 % (ecdc.europa.eu).

Dostatečná preventivní opatření minimalizují výskyt *Pseudomonas aeruginosa* v nemocnicích. Ve zdravotnických zařízeních je nezbytné usilovat o zachování sterilního prostředí u nově přicházejících pacientů, používat ochranné pomůcky, dezinfikovat zdravotnické pomůcky, které slouží pro vyšetření při cévkování, a výměně močových katétrů.

Součástí prevence nozokomiálních nákaz je mikrobiologický screening u hospitalizovaných pacientů. Principem screeningu je zjistit, jakými bakteriemi jsou pacienti kolonizováni a při nálezů rezistentních kmenů aplikovat u daného pacienta izolační opatření.

## 8. Závěr

Studie výskytu *Pseudomonas aeruginosa* v moči odhalila vyšší procentuální zastoupení *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích moči odebraných z katétrů ve srovnání se vzorky spontánní moči. Důvodem je vznik biofilmu, který produkuje *Pseudomonas aeruginosa* a vyvolává v našem lidském organismu infekce a znemožňuje tak antimikrobiální terapii. U každého pacienta je poté nutné zhodnotit, zda se jedná pouze o kolonizaci PMK a stačí pouze jeho výměna, nebo zda se jedná o IMC, kterou je nutné zaléčit antibiotiky. Výsledky kultivace je proto vždy zapotřebí porovnat s klinickým stavem pacienta.

Z vycházejícího antibiogramu je patrná zvýšená rezistence na ciprofloxacin (26 %, 19 %, 24 %) ve zkoumaném období let (2017–2019). V případě zvýšené antimikrobiální rezistence se musí neprodleně zasáhnout do prevence nozokomiálních infekcí a léčby pacientů formou testování antimikrobiální citlivosti.

V mém výzkumu za slabou stránku považuji, že při celkovém součtu pacientů s *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích moči není dourčeno, zda má pacient diagnostikovanou IMC, zda se jedná o kolonizaci PMK nebo zda jde o asymptomatickou bakteriurii. Tuto část by bylo vhodné více rozpracovat, aby byl objasněn skutečný podíl tohoto oportunního patogenu na nozokomiálních IMC.

Za silnou stránku práce považuji zpracování biologického vzorku moči semikvantitativní metodou a provedení citlivosti k antimikrobiálním látkám.

Nakonec bych ráda uvedla, že jsem se pokusila na velmi omezeném prostoru objasnit zvolené téma se zaměřením na vybrané aspekty patogenu *Pseudomonas aeruginosa*. Dle mého názoru byl cíl práce splněn.

## 9. Literatura

1. ALEKSIC, I., et al., 2019. N-Benzyl Derivatives of Long-Chained 4-Amino-7-chloro-quinolines as Inhibitors of Pyocyanin Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem. Biol.* Vol. 14. Issue 12. 2800-2809. doi: 10.1021/acscchembio.9b00682
2. APARNA, MS., Yadav, S., 2008. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis.* Vol. 12. Issue 6. 526–30. ISSN 1678-4391.
3. ARAI, H., 2011. Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* Vol. 5. Issue 2. 103. doi: 10.3389/fmicb.2011.00103
4. BEDNÁŘ, M., et al., 1996. *Lékařská mikrobiologie bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: MARVIL, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
5. BENÁKOVÁ, H., 2006. *Přeanalytická příručka klinických laboratoří ÚLBLD*. [online] Verze 14. [cit. 2.5.2020]. Dostupné z: <https://www.vfn.cz/wp-content/uploads/2020/04/ULBLD-preanalyticka-prirucka-v14.pdf>
6. BENEŠ, J., 2009. *Infekční lékařství*. Praha: GALÉN, 652 s. ISBN 978-80-7262-644-1
7. BUTAITÉ, E., et al., 2018. Environmental determinants of pyoverdine production, exploitation and competition in natural *Pseudomonas* communities. *Environ Microbiol.* Vol. 20. Issue 10. 3629–3642. doi: 10.1111/1462-2920.14355.
8. CROUGHS. P., et al., 2012. Thirteen years of antibiotic susceptibility surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care units and urology services in the Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Vol 32. 283–288. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1741-4>
9. ČIHÁK, R., 2002. *Anatomie 2*. 2.vyd. Praha: GRADA. 470 s. ISBN 80-247-0143-X.
10. DINGLE, TC., et al., 2013. Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med.* Vol. 33. Issue 3. 589–609. doi: 10.1016/j.cll.2013.03.001.
11. ECDC. *Data from the ECDC Surveillance Atlas – Antimicrobial resistance (2017-2018)*. online [cit. 24.5.2020]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>
12. EUCAST. Clinical breakpoints – breakpoints and guidance. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*, [online] Version 10.0, valid from 2020-01-01. [cit.2020-05-17]. Dostupný na: [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
13. GAJDÁCS. M., 2020. Carbapenem-Resistant but Cephalosporin-Susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in Urinary Tract Infections: Opportunity for Colistin Sparing. *Antibiotics (Basel)*. Vol. 9. Issue 4. 153. doi: 10.3390/antibiotics9040153

14. GARCIA, M., et al., 2018. Pseudomonas aeruginosa flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis. *Virulence*. Vol. 9. Issue 1. 1163–1175 doi: 10.1080/21505594.2018.1480830.
15. GHADAM, P., 2017. One-step purification and characterization of alginate lyase from a clinical Pseudomonas aeruginosa with destructive activity on bacterial biofilm. *Iran J Basic Med Sci*. Vol. 20. Issue 5. 467–473. doi: 10.22038/IJBMS.2017.8668.
16. GOERING, V., R., et al., 2019. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5.vyd. Praha: TRITON, 568 s. ISBN 978-80-7387-928-0.
17. JINDRÁK, V., et al., 2014. *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici*. Praha: MLADÁ FRONTA, as. 712 s. ISBN 978-80-204-2815-8
18. JUHAŇÁK, S., 2012. *Klinicky významné bakterie*. Praha: TRITON, 123 s. ISBN 978-80-7387-588-6.
19. JULÁK, J., 2015. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 2.vyd. Praha: KAROLINUM, 404 s. ISBN 978-80-246-3210-0.
20. KAPOUNOVÁ, G., 2007. *Ošetrovatelství v intenzivní péči*. Praha: GRADA, 368 s. ISBN 978-80-247-1830-9
21. KING, JD., et al., 2009. Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. *Innate Immun*. Vol.15. Issue 5. 261–312. doi: 10.1177/1753425909106436.
22. KITTNAR, O., et al., 2011. *Lékařská fyziologie*. Praha: GRADA. 800 s. ISBN 978-80-247-3068-4.
23. KUPIDLOVSKA, L., 2017. *Stanovení citlivostí bakterií k antibiotikům difúzní diskovou metodou*. SOP-ÚLBLD-KMATB-X1. Vyd. 6. [cit. 25.11.2019].
24. KUPIDLOVSKA, L., 2017. *Stanovení citlivostí bakterií k antibiotikům kvantitativní metodou E – test*. SOP-ÚLBLD-KMATB-X3. Vyd. 6. [cit. 23.05.2020].
25. LAU, GW., et al., 2004. The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection. *Trends Mol Med*. Vol. 10. Issue 12. 599–606. doi: 10.1016/j.molmed.2004.10.002.
26. MAH, TF., O'Toole, GA., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*. Vol. 9 Issue 1, 34–9. ISSN 1878-4380.
27. NASSAR, MSM., 2019. Evaluation of antibiotic susceptibility test results: how guilty a laboratory could be? *J Egypt Public Health Assoc*. Vol. 94. Issue 1. 4. doi: 10.1186/s42506-018-0006-1.
28. PANG, Z., et al., 2019. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. Vol. 37. Issue 1. 177–192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
29. PAZ-ZARZA, VM., et al., 2019. Pseudomonas aeruginosa: Pathogenicity and antimicrobial resistance in urinary tract infection. *Rev Chilena Infectol*. Vol. 32. Issue. 2. 180–189. doi: 10.4067/S0716-10182019000200180.



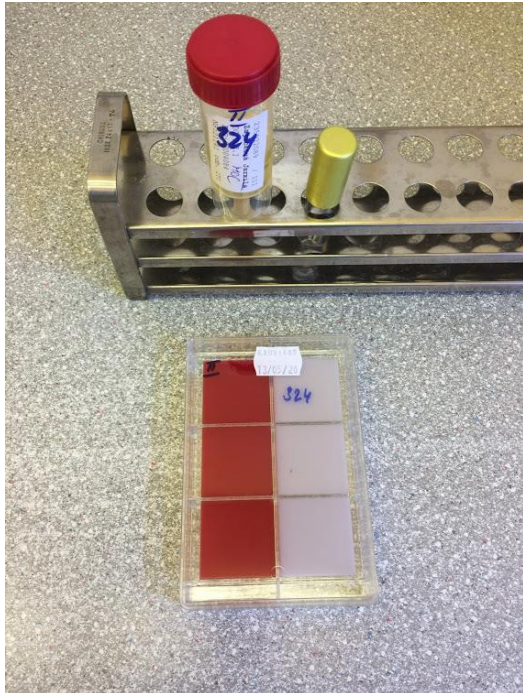
30. PIECHOTA, H., 2016. Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *Aktuelle Urol.* Vol. 47. Issue 3. 220–8. doi: 10.1055/s-0042-101845.
31. RĂDULESCU, A., et al., 2015. Antibiotic resistant urinary tract infections in an urology ward. *RJMM.* Vol. 118. Issue 3. 20-22.
32. SCHINDLER, J., 2010. *Mikrobiologie. Pro studenty zdravotnických oborů.* Praha: GRADA, 223. ISBN 978-80-247-3170-4.
33. SCHNIEDERBEREND, M., et al. 2019. Modulation of flagellar rotation in surface-attached bacteria: A pathway for rapid surface-sensing after flagellar attachment. *PLoS Pathog.* Vol. 15. Issue 11. doi: 10.1371/journal.ppat.1008149.
34. ŠTEFAN, M., 2019. *Antibiotika v klinické praxi.* Praha: GALÉN, 312 s. ISBN: 9788074923975
35. TEPLAN, V., et al., 2004. *Infekce ledvin a močových cest v dospělém a dětské věku.* Praha: GRADA. 252 s. ISBN 80-247-0566-4.
36. VOTAVA, M., 1999. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii.* Brno: HORTUS, 408 s. ISBN 80-238-5058-X.
37. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná. 2.vyd.* Brno: NEPTUN, 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
38. VOTAVA, M., et al., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální.* Brno: NEPTUN, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
39. VYTEJČKOVÁ, et al., 2013. *Ošetrovatelské postupy v péči o nemocné II / Speciální část.* Praha: GRADA, 271 s. ISBN 978-247-3420-0.
40. XIA, J., et. al., 2016. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Biosci Trends.* Vol. 10. Issue 1. 14-21. doi: 10.5582/bst.2016.01020.

## 10. Seznam zkratek

1 LF UK	1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
AmpC	Ampicilin C
ATB	antibiotika
CFU	colony forming unit
DNA	deoxyribonulkeova kyselina
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ESBL	extended spectrum beta-lactamase
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Suspectibility Testing
IMC	Infekce močových cest
LPS	lipopolysacharid
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
MH	Mueller – Hinton agar
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
PE	polyetylenový sáček
PMK	permanentní močový katétr
tRNA	transferová ribonukleový kyselina
URO – AMB	Urologická klinika – ambulance
URO – JIP	Urologická klinika – jednotka intenzivní péče
URO – LO	Urologická klinika – lůžkové oddělení
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice
WHO	World Health Organization

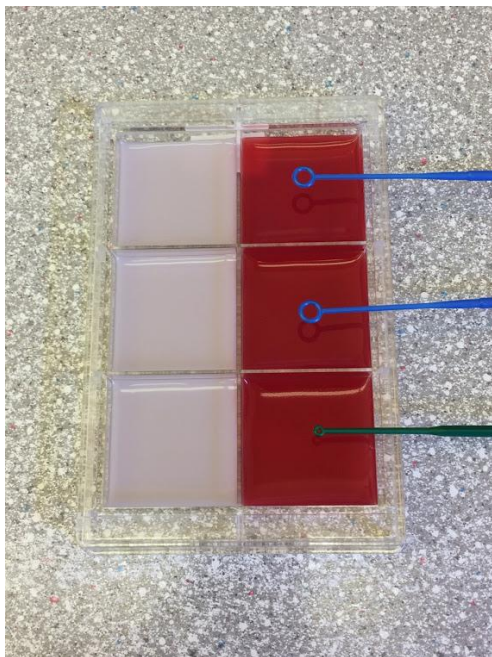
## 11. Přílohy

Příloha č.1.: kultivace na víceúčelovou močovou destičku



(Zdroj vlastní)

Příloha č.2.: Semikvantitativní metoda stanovení



(Zdroj vlastní)

Příloha č.3.: Masivní nález *Pseudomonas aeruginosa*



Příloha č.4.: TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.



(Zdroj vlastní)

Příloha č.5.: Pozitivní oxidáza *Pseudomonas aeruginosa*



(Zdroj vlastní)

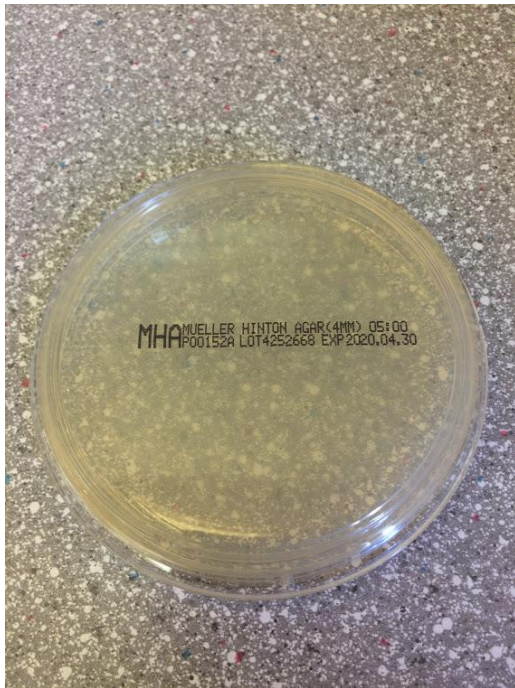
Příloha č.6.: MALDI TOF MS



(Zdroj vlastní)

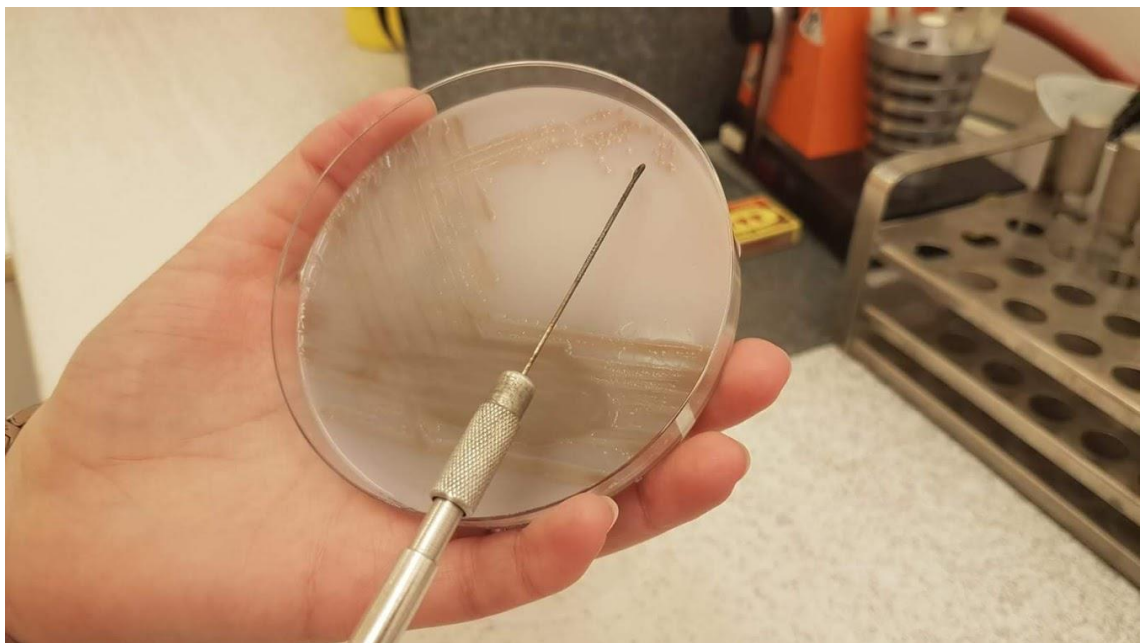


Příloha č.7.: Mueller – Hinton agar



(Zdroj vlastní)

Příloha č.8.: Příprava bakteriální suspenze z čistých kolonií *Pseudomonas aeruginosa*



(Zdroj vlastní)

Příloha č.9.: Naměřená hodnota 0,5 McFarlanda na denzitometru.



(Zdroj vlastní)

Příloha č.10.: Sterilním vatovým tamponem se rozetře valivým pohybem na plochu MH



(Zdroj vlastní)

Příloha č.11.: Nanesení antibiotických disků za pomoci tzv. raznic



(Zdroj vlastní)

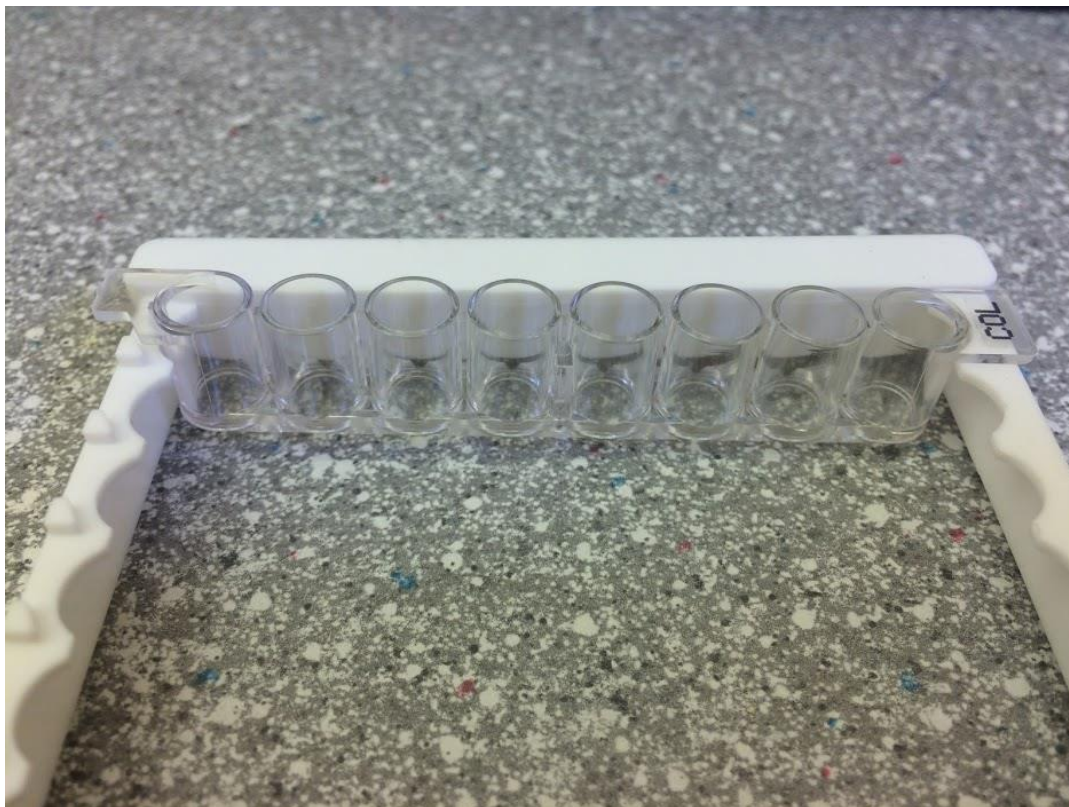
Příloha č.12.: Laboratorní pomůcky pro stanovení MIC



(Zdroj vlastní)



Příloha č.13.: Strip o různých koncentracích antimikrobiální látky



(Zdroj vlastní)

Příloha č.14.: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters

***Pseudomonas* spp.**

Expert Rules and Intrinsic Resistance Tables

EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 10.0, valid from 2020-01-01

Miscellaneous agents	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)			Notes
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU	
Chloramphenicol	-	-	-	-	-	-	-	1. Colistin MIC determination should be performed with broth microdilution. Quality control must be performed with both a susceptible QC strain ( <i>E. coli</i> ATCC 25922 or <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853) and the colistin resistant <i>E. coli</i> NCTC 13846 ( <i>mcr-1</i> positive). 2. Agar dilution is the reference method for fosfomycin. MICs must be determined in the presence of glucose-6-phosphate (25 mg/L in the medium). Follow the manufacturers' instructions for commercial systems. Infections caused by wild-type isolates (ECOFF: MIC 128 mg/L; corresponding zone diameter 12 mm using the disk potency and reading instructions for <i>E. coli</i> ) have been treated with fosfomycin in combination with other agents. A. Use an MIC method (broth microdilution only).
Colistin <sup>1</sup>	2	2	4	-	Note <sup>A</sup>	Note <sup>A</sup>		
Daptomycin	-	-	-	-	-	-		
Fosfomycin iv <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-		
Fosfomycin oral <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-		
Fusidic acid	-	-	-	-	-	-		
Metronidazole	-	-	-	-	-	-		
Nitrofurantoin (uncomplicated UTI only)	-	-	-	-	-	-		
Nitroxoline (uncomplicated UTI only)	-	-	-	-	-	-		
Rifampicin	-	-	-	-	-	-		
Spectinomycin	-	-	-	-	-	-		
Trimethoprim (uncomplicated UTI only)	-	-	-	-	-	-		
Trimethoprim-sulfamethoxazole	-	-	-	-	-	-		

(Zdroj EUCAST.org)

Příloha č.15.: Rozložení kolistinu a jeho koncentrační řada na destičce v mg/l

Tab. 1: Rozložení kolistinu a jeho koncentrační řada na destičce v mg/l

A	COL 16	COL 16	COL 16	COL 16	COL 16	COL 16	COL 16	COL 16	COL 16	COL 16	COL 16	COL 16
B	COL 8	COL 8	COL 8	COL 8	COL 8	COL 8	COL 8	COL 8	COL 8	COL 8	COL 8	COL 8
C	COL 4	COL 4	COL 4	COL 4	COL 4	COL 4	COL 4	COL 4	COL 4	COL 4	COL 4	COL 4
D	COL 2	COL 2	COL 2	COL 2	COL 2	COL 2	COL 2	COL 2	COL 2	COL 2	COL 2	COL 2
E	COL 1	COL 1	COL 1	COL 1	COL 1	COL 1	COL 1	COL 1	COL 1	COL 1	COL 1	COL 1
F	COL 0,5	COL 0,5	COL 0,5	COL 0,5	COL 0,5	COL 0,5	COL 0,5	COL 0,5	COL 0,5	COL 0,5	COL 0,5	COL 0,5
G	COL 0,25	COL 0,25	COL 0,25	COL 0,25	COL 0,25	COL 0,25	COL 0,25	COL 0,25	COL 0,25	COL 0,25	COL 0,25	COL 0,25
H	Kontr. růstu	Kontr. růstu	Kontr. růstu	Kontr. růstu	Kontr. růstu	Kontr. růstu	Kontr. růstu	Kontr. růstu	Kontr. růstu	Kontr. růstu	Kontr. růstu	Kontr. růstu
	Kolistin 1	Kolistin 2	Kolistin 3	Kolistin 4	Kolistin 5	Kolistin 6	Kolistin 7	Kolistin 8	Kolistin 9	Kolistin 10	Kolistin 11	Kolistin 12

(Zdroj příbalový leták MIC Kolistinu od společnosti MIKROLATEST)