



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

**Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Výskyt bakterií a kvasinek v hemokulturách v Oblastní nemocnici
Kladno**

**Occurrence of bacteria and yeast in the blood cultures in the Regional
Hospital Kladno**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Mgr. Jana Stříbrná, Ph.D.

Jana Jelínková

Kladno 2017

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Akademický rok: 2016/2017

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Jana Jelínková**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Výskyt bakterií a kvasinek v hemokulturách v Oblastní nemocnici Kladno**
Téma anglicky: Occurrence of bacteria and yeast in the blood cultures in the Regional Hospital Kladno

Zásady pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude sledování výskytu bakterií a kvasinek v hemokulturách v Oblastní Nemocnici Kladno za období 1.6.2016 - 31.8.2016 a jejich statistické vyhodnocení.

V teoretické části se studentka bude věnovat příčinám vzniku infekcí krevního řečiště vedoucí k bakteriémií a sepsi. Popíše metodiku správného odběru hemokultur, diagnostiku patogenů v hemokulturách pomocí automatizovaného systému Bactec a laboratorní diagnostiku nalezených patogenů - mikroskopicky, kultivačně, identifikaci bakterií a stanovení citlivosti. Popíše závažnost nálezů jednotlivých patogenů, jejich interpretaci a epidemiologickou návaznost.

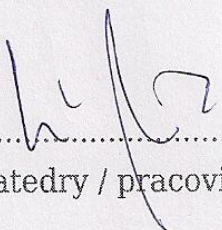
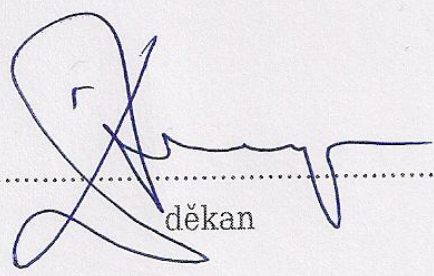
V praktické části zpracuje pozitivní hemokultury mikroskopicky a kultivačně. Pomocí identifikačních postupů provede diagnostiku jednotlivých patogenů. Statisticky vyhodnotí výskyt nejčastějších patogenů v Oblastní Nemocnici Kladno s literaturou.

Seznam odborné literatury:

- [1] VOTAVA, Miroslav, Lékařská mikrobiologie obecná, Brno: Neptun, 2001, ISBN 80-902896-2-2
- [2] BENEŠ, Jiří, Infekční lékařství, Praha: Galén, c2009, ISBN 978-80-7262-644-1
- [3] JINDRÁK, Vlastimil, Dana HEDLOVÁ a Pavla URBÁŠKOVÁ, Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici, Praha: Mladá fronta . Aeskulap, 2014, ISBN 978-80-204-2815-8

Zadání platné do: 11.09.2018

Vedoucí: Mgr. Jana Stříbrná, Ph.D.


.....
vedoucí katedry / pracoviště
.....
děkan

V Kladně dne 31.10.2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Výskyt bakterií a kvasinek v hemokulturách v Oblastní nemocnici Kladno vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 17.05.2017

.....
Jana Jelínková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat paní Mgr. Janě Stříbrné, Ph.D. za veškerý čas, který mi věnovala. Moc si vážím spolupráce s paní magistrou a moc děkuji za její trpělivost, cenné rady a kritiku s konstruktivními připomínkami.

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na sledování výskytu bakterií a kvasinek v hemokulturách v Oblastní nemocnici Kladno za období 1.6.2016 - 31.8.2016.

V teoretické části práce se věnuji příčinám vzniku infekcí krevního řečiště vedoucí k bakteriémii a sepsi. Charakterizuji jednotlivé pojmy bakteriémie, sepse a těžká sepse. Popisuji jednotlivé patogeny vyskytující se v krevním řečišti a jejich patogenitu vůči organismu člověka.

Popisuji metodiku správného odběru, příjem a zpracování hemokultur v laboratoři. Charakterizuji diagnostiku patogenů v hemokulturách pomocí automatizovaného systému Bactec a přibližuji princip systému a celý odběrový systém. Samozřejmě nesmím zapomenout na laboratorní diagnostiku nalezených patogenů – mikroskopicky, kultivačně, identifikaci bakterií a stanovení citlivosti.

V praktické části jsem se seznámila se zpracováním pozitivní hemokultury mikroskopicky a kultivačně. Pomocí identifikačních postupů jsem provedla diagnostiku jednotlivých patogenů. Ze sledovaných údajů, za dané období jsem statisticky vyhodnotila nejčastější výskyt patogenů v Oblastní nemocnici Kladno. Výsledky jsem porovnávala s údaji publikovanými v odborné literatuře.

Klíčová slova

Infekce krevního řečiště; Bakteriémie; Sepse; Hemokultura; Bakterie; Kultivace; Identifikace mikroorganismu.

Abstract

My bachelor thesis is focused on the monitoring of bacteria and yeast in the regional hospital Kladno for the period 1st June 2016 - 31 st August 2016. In the theoretical part of the work I cause of the bloodstream leading to bacteria and sepsis. I characterize individual concepts of bacteria, sepsis and severe sepsis. I describe pathogens occurring in the bloodstream and their pathogenity towards the human body.

I describe the methodology of proper sampling, reception and processing of hemocultures in the laboratory . I characterize pathogens in diagnosis by means of an automated system and the whole sampling system. I may not forget laboratory diagnostics of pathogens – with the microscope, reclamation, bacteria identification and sensitivity testing. In the practical part I met processing of positive blood cultures. With the help of identificating procedures by individual pathogens of the data for period I evaluated statistically the most frequent incidence of pathogens in the regional hospital Kladno. The results were compared with data published in the literature.

Keywords

Bloodstream infections; Bacteriemia; Sepsis; Hemoculture; Bacteria; Cultivation; Identification of the microorganism.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav	11
2.1	Infekce krevního řečiště.....	11
2.1.1	Bakteriémie.....	12
2.1.2	Sepse.....	13
2.2	Vznik sepse	14
2.2.1	Průnik bakterií do organismu	14
2.3	Původci infekcí krevního řečiště	15
2.3.1	Gram-pozitivní aerobní a fakultativně anaerobní koky	15
2.3.2	Gram-pozitivní nesporelující aerobní tyčinky	19
2.3.3	Gram-pozitivní sporelující aerobní tyčinky	20
2.3.4	Gram-pozitivní nesporelující anaerobní tyčinky	20
2.3.5	Gram-negativní nefermentující bakterie.....	21
2.3.6	Gram-negativní fakultativně anaerobní tyčinky	22
2.3.7	Kvasinky	25
2.4	Laboratorní diagnostika	26
2.4.1	Mikrobiologie.....	26
2.4.2	Klinická biochemie	27
2.4.3	Hematologie.....	28
3	Cíl práce.....	29
4	Metodika	30
4.1	Hemokultivace	30
4.2	Odběr materiálu.....	31

4.2.1	Postup při odběru.....	31
4.3	Zpracování vzorku v laboratoři	33
4.3.1	Příjem materiálu do laboratoře	33
4.3.2	Zpracování hemokultur	34
4.3.3	Biochemická identifikace mikroorganismu.....	39
4.3.4	Antigenní analýza	42
4.3.5	Stanovení citlivosti k antibiotikům.....	43
5	Výsledky.....	45
6	Diskuze.....	53
7	Závěr.....	55
8	Seznam použitých zkratk.....	56
9	Seznam použité literatury.....	57
10	Seznam použitých obrázků	61
11	Seznam použitých tabulek.....	62

1 ÚVOD

Infekce krevního řečiště (IKŘ) je závažný problém, se kterým se setkává většina lékařů. IKŘ představuje složitý proces, ve kterém se kromě mikroorganismu uplatňují i složky imunitního systému a systémové odpovědi organismu. Výsledkem infekce je velice závažný patologický stav, jehož diagnostika a následná léčba vyžaduje úsilí a prostředky. Zvládnutí stavu pacienta rozhoduje o jeho přežití. (1)

Sepse a především její těžké formy se staly středem pozornosti ve vyspělých zemích. Sepsa představuje vedoucí příčinu mortality u nekoronárních onemocnění. Kromě medicínských hledisek představují sepsa i závažný problém ekonomický.

Při klinické diagnostice sepsa se zásadní význam přikládá laboratorní diagnostice, zejména mikrobiologické. (1)

Kultivační vyšetření hemokultur je základní laboratorní diagnostikou bakteriémie, která je typická pro systémové infekce, endokarditidu a další infekce probíhající pod obrazem horečky neznámého původu. V našich podmínkách bakteriémie většinou souvisí s diagnózou urosepsa, dále s diagnózou infekcí spojených s protetickým materiálem (klouby, štepy) a s katérovou sepsí. Vitální důležitost mají sepsa spojené s pneumoniemi (*Streptococcus pneumoniae*) nebo s meningitidou (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*). Rychlá diagnostika u těchto infekcí je podkladem pro cílenou antibiotickou léčbu a zásadně snižuje úmrtnost pacientů. (2)

Hemokultivační vyšetření slouží k průkazu bakterií v krevním řečišti pacienta a vyšetření se provádí např. pomocí automatizovaného kultivačního systému Bactec. Pozitivní hemokultivační lahvička se vyjme z přístroje, provede se mikroskopické vyšetření obsahu lahvičky, na jehož základě se vybere sada kultivačních pūd a sestava antibiotik pro stanovení citlivostí. Po následném vyočkování se izolovaný kmen identifikuje a vyšetří se jeho citlivost na antibiotika.

(2)

Cílem práce je seznámit se s metodikou zpracování hemokultur pomocí systému Bactec 9050, se zpracováním pozitivní hemokultury mikroskopicky i kultivačně a také s identifikací mikroorganismů včetně stanovení citlivosti k antibiotikům. Vyhodnotit počet pozitivních hemokultur v Oblastní nemocnici Kladno v daném období. Vyhodnotit nálezy jednotlivých infekčních agens v hemokulturách v daném období. Porovnat výskyt infekčních agens v hemokulturách v Oblastní nemocnici Kladno s informacemi v odborné literatuře.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Infekce krevního řečiště

Infekce krevního řečiště (IKŘ) jsou popisovány jako šíření původce infekce v krvi pacienta, provázeny systémovými příznaky. Ne každá IKŘ se projeví jako sepse. Pokud je infekce vyvolána málo virulentním patogenem, průběh infekce může být nenápadný a klinický obraz může zavádět k jiným diagnózám. (3)

Infekce krevního řečiště se dělí podle lokalizace zdroje:

- 1) **Primární infekce krevního řečiště:** zdroj infekce je nalezen přímo v centrálním krevním oběhu. Mezi primární infekce krevního řečiště patří:

Katétrová infekce krevního řečiště vzniká ve spojitosti osídlení cévního katétru mikroby, které formují na povrchu tělesa biofilm. Ten je nalezen intraluminálně nebo extraluminálně, záleží na způsobu kontaminace vstupu. V některých případech může kolonizace katétru vyústit v místní nebo celkovou infekci, kdy se mikroby dostávají do krevního řečiště. (3)

Infekční endokarditida vzniká v souvislosti s infekcí nitroblány srdeční a srdeční chlopně. Výskyt a úmrtnost na toto onemocnění sice v posledních letech klesá, má ale stále vážnou prognózu a vysokou mortalitu. Klinická a etiologická variabilita je značná, úspěšná diagnostika a léčba proto vyžaduje komplexní mezioborový přístup.

- 2) **Sekundární infekce krevního řečiště:** zdroj infekce je nalezen v jiném orgánovém systému mimo krevní oběh pacienta (např. dýchací ústrojí, zažívací trakt). (3)

2.1.1 Bakteriémie

Bakteriémie je stav, kdy jsou v krvi přítomny živé bakterie. Bakteriémie může být přechodná, intermitentní nebo kontinuální.

- **Přechodná bakteriémie** trvá několik minut, je spojena s lékařskými a chirurgickými zákroky např. extrakcí zubu, katetrizací močových cest. Bakteriémie se může vyskytnout také u fokální infekce, jako je například pneumonie. (2)
- **Intermitentní bakteriémie** je přechodná opakující se bakteriémie a je spojena s nedrénovanými intraabdominálními abscesy. U intermitentní bakteriémie mohou být hemokultury negativní. (2)
- **Kontinuální bakteriémie** je závažná infekce, která překonává obranu hostitele. Je charakteristická pro intravaskulární infekce, například infekční endokarditidu. U imunokompromitovaných pacientů může pocházet také ze zdrojů mimo krevní řečiště. (2)

2.1.2 Seps

Seps je systémový infekční proces, který je celkovou odpovědí na mikroorganismus na místní nebo systémové napadení organismu. Hlavním příznakem seps je horečka, leukocytóza, leukopenie, tachykardie a tachypnoe, které jsou součástí syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS). (4)

SIRS může mít infekční nebo neinfekční příčinu. Faktory vzniku infekce jsou zejména bakterie, plísně, vzácně viry. Příčinou SIRS může být také chirurgický zákrok, aseptický zánět slinivky břišní. Je-li příčinou SIRS infekce nebo je infekční příčina velmi pravděpodobná, hovoříme o sepsi. (4)

Vznik seps je spojován s průnikem mikroorganismu do krevního řečiště. Takto to ale nemusí platit vždy- například při průniku velkého množství bakterií do střevního traktu do portálního řečiště. Bakterie v portálním řečišti jsou vychytávány a zničeny Kupferovými buňkami, kdy dochází k jejich aktivaci a buňky produkují velké množství prozánětlivých mediátorů, proto se rozvine seps. Pro vznik seps jsou náchylnější lidé s oslabenou imunitou, lidé po chirurgických zákrocích, alkoholici, narkomani, lidé po předchozí léčbě antibiotiky. (4)

- **Těžká seps**

Jedná se o sepsi s orgánovou dysfunkcí a známky hypoperfuze. (5)

Je spojená s poruchou průtoku krve organismem. Kritéria pro těžkou sepsi jsou:

- 1) Změny v chování až poruchy vědomí
- 2) Dochází ke snížení prokrvení orgánu
- 3) Nízký krevní tlak- systolický tlak je <90 mmHg nebo je snížený o <40mmHg od původní hodnoty (6)

- **Septický šok**

Na vzniku septického šoku má podíl rozvoj hypovolemie, porucha distribuce cirkulujícího objemu a vznik myokardiální dysfunkce. (7)

K systémové zánětlivé reakci organismu vede přítomnost infekčního agens. K poruše mikrocirkulace vede kaskáda metabolických, humorálních, hemodynamických, hemokoagulačních a imunologických změn. Dochází ke zvýšené produkci prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů, aktivátorů některých zánětlivých buněk a trombocytů. Dochází k lokální nadprodukcí oxidu dusnatého, což má za následek rozvoj poruchy mikrocirkulace. Vznikající tkáňová hypoperfuze vede k rozvoji laktázové acidózy, to může vést až k selhání energetického metabolismu buněk. Výsledek těchto poruch vede k multiorgánové dysfunkci. (7)

2.2 Vznik sepse

2.2.1 Průnik bakterií do organismu

Infekční nemoc je složitý proces, který začíná průnikem mikroorganismu přes bariery jako je kůže nebo sliznice. Pokud má mikroorganismus vhodné podmínky, může dojít k pomnožení. (4)

Podle závažnosti poškození a délce trvání lokálního zánětu dochází k různé intenzitě systémové reakce. Pokud dojde k proniknutí mikroorganismu v masivním množství, může nastat systémová reakce bez lokální reakce. Nejvýznamnějším systémovým projevem zánětu je horečka. Horečka je způsobená stimulací hypotalamového centra termoregulací prostaglandinu E2. Jeho syntéza je detekována prozánětlivými cytokiny TNF, IL-1, IL-6, které se dostávají do oběhu. Cytokin TNF se váže na receptory buněk a způsobuje vasodilataci, zvýšenou permeabilitu cév a to je důsledek ztráty plazmatické tekutiny. Snížení plazmatické tekutiny může vést k šokovému stavu s nedokrevností orgánů. Veškeré výše vypsání problémy vedou k selhání a smrti postiženého. (8)

2.3 Původci infekcí krevního řečiště

2.3.1 Gram-pozitivní aerobní a fakultativně anaerobní koky

- Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou gram-pozitivní, nesporeující, nepohyblivé a neopouzdřené sférické koky. Nachází se jednotlivě, ve dvojicích nebo v nepravidelných shlucích. (9)

Převážně jsou fakultativně anaerobní a mají pozitivní katalázu a negativní oxidázu. Dovedou růst i v přítomnosti 10% NaCl. (10)

Stafylokoky se dělí na dvě základní skupiny podle jejich schopnosti koagulovat plazmu, na stafylokoky koaguláza pozitivní (*S. aureus*) a koaguláza negativní (např. *S. epidermidis* a *S. saprophyticus*). (10)

Staphylococcus aureus jsou mikroskopicky kulaté gram-pozitivní koky. Zlatý Stafylokok se nazývá podle nazlátlé barvy kolonií. Stafylokoky dobře rostou na běžných půdách. Jejich kolonie jsou vždy pigmentové a mají smetanovou až krémovou barvu, často nazlátlou. Kolem kolonií bývá β -hemolýza. Nachází se na kůži, sliznicích, ale i ve střevě, třetina zdravých lidí jsou bezpříznakoví nosiči. Bránou vstupu je většinou kůže. (10)

S. aureus vyvolává onemocnění trojího druhu: hnisavé infekce (nejčastější), infekce s toxickými příznaky a otravy z potravy. Typickým znakem stafylokokové infekce je absces. Při hnisavých infekcích ran se stafylokok může dostat do oblastí mizních uzlin, kde vzniká lymphadenitis a odsud se dostává do krevního řečiště. V dýchacím traktu mohou být příčinou sinusitid a smrtelných pneumonií. (10)

Staphylococcus epidermidis se u člověka vyskytuje na kůži i sliznicích. Kolonie jsou vždy pigmentované do porcelánově bílé barvy. Kolonie tvoří sliz s vazkou konzistencí a ulpívají k povrchu krevního agaru. (10)

Staphylococcus epidermidis je typický oportunní patogen, který napadá oslabené pacienty. Důležitým faktorem pro vznik infekce je přítomnost cizího tělesa v organismu. Stafylokokové buňky přilnou na povrch umělých náhrad a vyvolají infekci. Bakterie pocházející z povrchu kůže a sliznic mohou zaplavovat organismus a způsobovat sepse, endokarditidy, meningitidy nebo infekce močových cest. (9)

Staphylococcus epidermidis patří k nejčastějším mikrobům izolovaných z hemokultur. Je ale potřeba vyloučit náhodnou kontaminaci vyšetřovaného materiálu kmenem, který se běžně vyskytuje na kůži a sliznicích. (9)

- **Rod *Streptococcus***

Streptokoky jsou gram-pozitivní, kataláza-negativní koky uspořádané do dvojic nebo do řetízků. Rod zahrnuje jak patogeny, tak i příslušníky normální mikroflóry sliznic. (10)

Streptokoky se klasifikují na základě hemolýzy krevního agaru.

- a) **α -hemolytické streptokoky:** viridace, bakteriální peroxid oxiduje krvinky na zelený methemoglobin
- b) **β - hemolytické streptokoky:** úplná nebo neúplná hemolýza, způsobená streptolysinem
- c) **γ - hemolytické streptokoky:** nehemolytické, nemění vzhled agaru (11)

Další významná klasifikace streptokoků je podle typu a přítomnosti stěnového polysacharidového antigenu, podle kterého se dělí do skupin A- Z. (12)

Důležité β -hemolytické streptokoky patří hlavně do antigenních skupin A (*Streptococcus pyogenes*), B (*Streptococcus agalactiae*), C, D a G. (10)

Streptococcus agalactiae patří mezi beta-hemolytické streptokoky skupiny B. Na krevním agaru vyrůstá ve větších mazlavých koloniích, které jsou obklopené úzkou zónou neohraničené neúplné β -hemolýzy. V sousedství zlatého stafylokoka, který tvoří β -lyzin, je zóna neúplné β -hemolýzy výrazně zesílena, tzv. CAMP-test. (13)

Streptokok osídluje střevo a vagínu, vyskytuje se u třetiny těhotných žen. *Streptococcus agalactiae* je původce pneumonie, neonatální a novorozenecké meningitidy a sepse. Při porodu se může *Streptococcus agalactiae* přenést na novorozence a asi 2% onemocní. Nejčastější faktory, které ovlivňují vznik infekce u novorozenců, jsou vrozené vady nebo nedozrálost plodu. (14)

Streptococcus pyogenes patří mezi beta-hemolytické streptokoky skupiny A. *S. pyogenes* je kultivačně poměrně náročný, potřebuje půdy obohacené sérem nebo krví. Na krevním agaru jsou kolonie drobné, spíše suché a bývají obklopené zónou úplné β -hemolýzy. Opouzdřené kmeny rostou ve větších mukózních koloniích. (10)

Přenáší se kapénkovou infekcí převážně v dětských kolektivech. *Streptococcus pyogenes* nejčastěji vyvolává angínu, pokud ji vyvolal kmen produkující spálový toxin, objevuje se typická vyrážka a onemocnění se nazývá spála. Další závažná onemocnění jsou infekce kůže a hnisání ran, které mohou vést až k sepsi. (10)

Streptococcus pyogenes má významné faktory virulence např. protein M, který je povrchový antigen a chrání streptokoka před fagocytózou. Z extracelulárních faktorů virulence můžeme zmínit streptoliziny O i S, které ničí leukocyty. Dalšími významnými faktory jsou streptokinasa a hyaluronidasa, které umožňují průnik streptokoka do tkání. A také výše již zmíněný spálový toxin neboli erytrogenní toxin (10)

Streptococcus pneumoniae jsou mikroskopicky gram-pozitivní koky uspořádané do dvojic. Dvojice bývají obklopeny polysacharidovým pouzdrém, které je hlavním faktorem virulence, existuje v desítkách antigenních typů. Na dostatečně vlhkých a obohacených půdách *Streptococcus pneumoniae* vyrůstá v hlenovitých bezbarvých koloniích nepravidelného tvaru, tzv. M-fáze. Pokud tvoří méně pouzdrného polysacharidu, roste v lesklých koloniích podobajících se mističkám (S-fáze). Pokud pouzdro netvoří žádný pouzdrný polysacharid, rostou v drsné R-fázi a jsou k nerozeznání od jiných streptokoků. Kolem kolonií se vyskytuje zóna α -hemolýzy. (10)

Dospělí i děti mohou mít pneumokoka v nosohltanu jako součást běžné flóry. Při virové infekci, kdy dochází k poškození řasinkového epitelu, může dojít k vdechnutí pneumokoka a to může způsobit zápal plic. Kromě zápalu plic může způsobit hnisavé meningitidy, zánět středního ucha nebo sepse. (10)

Viridující streptokoky se řadí mezi α -hemolytické druhy. Ústní streptokoky jsou oportunními patogeny, které vyvolávají onemocnění jen u oslabených jedinců. (13)

Při onemocnění dásní pronikají do krevního řečiště, u zdravých jedinců jsou vychytány z krve. Pokud došlo ale k předchozímu poškození srdeční chlopně např. revmatickou horečkou, streptokok se usadí na srdečních chlopních a začne vytvářet zvláštní typ biofilmu, tzv. vegetace. Každým tepem se mikrobiální buňky uvolňují z biofilmu a krví jsou roznášeny po celém těle. Vzniká onemocnění, kterému se říká subakutní bakteriální endokarditida nebo také loudavá sepse. Hlavním původce tohoto onemocnění je *Streptococcus mitis*. (13)

- **Rod *Enterococcus***

Enterokoky jsou gram-pozitivní oválné až protáhlé koky. Enterokoky jsou kultivačně nenáročné, na krevním agaru rostou v šedivých koloniích s častou zónou viridace. Některé enterokoky tvoří žlutý pigment. (13)

Bývají součástí normální mikroflóry střeva. Enterokoky vyvolávají infekce močových cest, nejvíce u katetrizovaných pacientů. Mohou vyvolat infekce ran. Stále častěji vidíme enterokokové infekce krevního řečiště. U osob se sníženou obranyschopností mohou vyvolat nozokomiální nákazu. U člověka se vyskytují dva druhy vyvolávající infekce *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*. (10)

2.3.2 Gram-pozitivní nesporulující aerobní tyčinky

- **Rod *Corynebacterium***

Corynebacterium jsou nesporulující gram-pozitivní tyčinky. Kolonie na krevním agaru rostou v drobných koloniích a podobají se koaguláza negativním stafylokokům. Například *Corynebacterium diphtheriae* je potřeba očkovat i na selektivně-diagnostickou půdu s teluričitanem, kde roste v tmavých koloniích. (10)

Difterická korynebakteria mohou způsobit infekci zvanou záškrt, původcem tohoto onemocnění je *Corynebacterium diphtheriae*. Ostatní korynebakterie jsou součástí běžné flóry, i přesto mohou způsobovat infekce ran nebo katérovou sepsi. Obávaným druhem je *Corynebacterium jeikeium*, jedná se o nozokomiální patogen, který zřídka osídluje kůži zdravých lidí, nejvíce se vyskytuje na kůži lidí s oslabenou imunitou, kde může důsledkem toho způsobit katérovou sepsi. (13)

2.3.3 Gram-pozitivní sporulující aerobní tyčinky

- **Rod *Bacillus***

Rod *Bacillus* se hojně vyskytuje v přírodě, jedná se o gram-pozitivní aerobní až fakultativně anaerobní tyčinky. Znakem tohoto rodu je tvorba endospor. Sporulace probíhá jen za přítomnosti kyslíku. *B. anthracis* vytváří na krevním agaru ploché šedobílé kolonie s rozbrázděným povrchem. Z okrajů kolonií vystupují dlouhá vlákna, která se podobají medúzám. *B. anthracis* nemá kolem kolonií β -hemolýzu. *B. cereus* je kultivačně nenáročná bakterie, která vytváří velké plstnaté kolonie na krevním agaru se zónou úplné hemolýzy. (10)

Za obligátně patogenní je považován *B. anthracis*, který je původce antraxu. Jinak jsou zástupci tohoto kmene považovány za nízcce patogenní, onemocnění vyvolávají jen u osob se sníženou obranyschopností. *B. cereus* vyvolává oční infekce, infekce ran, sepse a endokarditidy. *Bacillus* často kontaminuje klinický materiál a je složité správně zhodnotit klinický význam jejich přítomnosti. (13)

2.3.4 Gram-pozitivní nesporelující anaerobní tyčinky

Nesporelující anaerobní tyčinky patří většinou k normální flóře lidského těla. Řada z nich se podílí na infekcích endogenního původu. Anaerobní bakterie produkují řadu produktů, které jsou zodpovědné za zápach hnisu u anaerobních infekcí. (10)

- **Rod *Propionibacterium***

Propionibacterium jsou nesporelující gram-pozitivní tyčinky kyjovitého tvaru. Zástupce rodu *Propionibacterium acnes* je součástí běžné kožní flóry, produkuje lipasy a proto převážně v pubertě, kdy se v pleti tvoří větší množství mazu, mohou vyvolat různé formy akné. *Propionibacterium acnes* bývá kromě akné spojován rovněž s endokarditidami a sepsemi. (10)

2.3.5 Gram-negativní nefermentující bakterie

- **Rod *Pseudomonas***

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou gram-negativní aerobní bakterie. Pohybují se pomocí bičíku. Nejčastější pseudomonádou je *P.aeruginosa*. (15)

Pseudomonády rostou dobře na krevním agaru a Endově půdě. Typické jsou tvorbou pigmentu a taky pachem kolonií. Pigment můžeme dobře pozorovat při kultivaci na MH-agaru, který neruší svou barvou. Pigmenty se u pseudomonád pohybují od žluté barvy, přes modrou až po hnědou, např. *Pseudomonas aeruginosa* roste v žlutozelených koloniích. Pseudomonády mají výraznou zónu β -hemolýzy. (10)

Pseudomonas aeruginosa je původcem systémových a lokálních infekcí. Infekce může být původem endogenní ze stolice nebo exogenní z prostředí nebo od pacientů v nemocnici. Je podmíněně patogenní, původce nemocničních nákaz, ale může způsobit i primární infekce. Vyvolává kožní infekce, bércové vředy, infekce respiračního traktu. (15)

- **Rod *Stenotrophomonas***

Stenotrofomonády jsou významnými původci nozokomiálních onemocnění. V nemocničním prostředí často přežívají na předmětech denní potřeby, nebo pomůckách. Často se šíří mezi pacienty. Onemocnění se projeví u lidí s oslabenou imunitou. Krátkodobě mohou napadnout i zdravé jedince, avšak infekce nevyžaduje léčbu, protože sama odezní. Nejvýznamnější zástupce je *Stenotrophomonas maltophilia*.

Rostou dobře na běžných kultivačních půdách, např. krevním agaru, Endově půdě. (10)

2.3.6 Gram-negativní fakultativně anaerobní tyčinky

- **Rod *Salmonella***

Salmonella se považuje za primární střevní patogen člověka a zvířat. Když mají vhodné podmínky, mohou ve vodě přežívat i léta. Jedná se o gram-negativní tyčinky. (9)

Ke kultivaci se používá selektivní pomnožovací tekutá půda (selenitový bujon) a pevné půdy XLD a MAL, na kterých salmonely tvoří bledé kolonie s černým středem - produkce sirovodíku. (10)

Salmonely dělíme na antropopatógení a zoopatógení:

Antropopatógení salmonely způsobují generalizované septické onemocnění - břišní tyfus a paratyfy. Do této skupiny patří *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Paratyphi B a *Salmonella* Paratyphi C, které způsobují velmi závažné onemocnění. Po inkubační době, která se pohybuje mezi 10-14 dny, se objevují vysoké až septické teploty. Tyfové salmonely se ukrývají ve žlučníku a žlučových cestách, tím vzniká dlouhodobé nosičství. (10)

Zoopatógení salmonely způsobují průjmová onemocnění. Člověk se nakazí konzumací nakažených a nedostatečně upravených výrobků z vajec. Inkubační doba je 12 hodin až 5 dní. Pro rozvoj infekce je potřeba velké množství salmonel. U malých dětí a starších osob hrozí salmonelová sepsa, která může být i smrtelná. (10)

- **Rod *Enterobacter***

Enterobacter je pohyblivá opouzdřená gram-negativní tyčinka, vyskytuje se v půdě, v zažívacím traktu, může vyvolat infekci močových cest. Má nízkou patogenitu oproti *Klebsiella*. Mezi nejvýznamnější druhy patří *Enterobacter cloacae* a *Enterobacter aerogenes*. (9)

- **Rod *Klebsiella***

Tyto bakterie jsou nepohyblivé gram-negativní tyčinky, které jsou výrazně opouzdřené polysacharidovým pouzdrém. Nacházejí se v zažívacím traktu, v dýchacích cestách. Klebsiely jsou podmíněně patogenní, často se uplatňují u nozokomiálních infekcí, hlavně na novorozeneckém oddělení a jednotce intenzivní péče. (9)

Roste na běžných půdách, tvoří pouzdra, což znamená přítomnost mukózních kolonií. (10)

Mezi dva nejběžnější druhy patří *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca*.

Klebsiella pneumoniae je druhý nejčastější původce infekce močových cest. Dále vyvolává pneumonie zaintubovaných pacientů a sepse. (10)

- **Rod *Escherichia***

Nejvýznamnější bakterií rodu je *Escherichia coli*. *E.coli* se kultivuje na široké škále půd. Na Endově agaru rostou kolonie v purpurové barvě a celkově pozadí prozradí štěpení laktózy. (10)

E.coli je podmíněně patogenní mikrob, který může způsobovat chorobné stavy. Ve střevě se nachází běžně a onemocnění může způsobit, jen pokud daný kmen má faktor virulence. Mimo střevo je *E.coli* vždy patogenní. (13)

Patogeny ve střevě

Kmen EPEC (enteropatogenní): kmeny vyvolávají průjmová onemocnění u novorozenců a malých dětí. U větších dětí a dospělých vyvolávají onemocnění zcela ojediněle. Schopnost vyvolat onemocnění je vázáno na určité sérotypy, které osídlují tenké střevo. Při vzniku onemocnění se neuplatňují toxiny, ale přilnavost bakterií na epitelové buňky tenkého střeva a následným rozpadem mikrokloků. (12)

Kmen ETEC (enterotoxigenní): kmen osídluje tenké střevo pomocí fimbrií, které jsou druhově specifické. Vyvolává cestovatelské průjmy. Na vzniku onemocnění se podílí dva typy enterotoxinů: ST (tepelně stabilní) a LT (tepelně labilní). Genetická informace tvorby toxinu je vázána na plazmidech. (12)

Kmen EIEC (enteroinvazivní): kmeny pronikají do tlustého střeva, kde se rozmnožují a způsobují průjmová onemocnění s příměsí krve. (12)

Kmen STEC (shiga-like toxigenní): onemocnění způsobené těmito kmeny jsou nejzávažnější, jejich patogenita není vázaná jen na střevo, často dochází ke vzniku hemolyticko-uremického syndromu. (10)

Patogeny mimo střevo

Kmen UPEC (uropatogenní): kmeny mají specifické faktory virulence, způsobují infekce močových cest.

Ostatní kmeny *E.coli* způsobují různá onemocnění, například infekce dýchacích cest nebo sepse. Nejsou jednoznačně pojmenovány a definovány jako předchozí kmeny. (13)

- **Rod *Serratia***

Bakterie rodu *Serratia* jsou gram-negativní tyčinky. Nacházejí se častěji ve vnějším prostředí než ve střevě, vzdorují dezinfekci a jsou významnými nozokomiálními patogeny. Nejčastějším druhem je *Serratia marcescens*. (13)

Serratia marcescens je nenáročná na kultivaci, na kultivačních půdách pro enterobakterie roste v červených pigmentových koloniích. Od jiných enterobakterií se odlišuje produkcí extracelulární DN-ázy, lipázy. (12)

- **Rod *Proteus***

Proteus je izolován ze stolice jak zdravých lidí, tak ze stolice nemocných. Vyskytují se dva druhy, které jsou si biochemicky podobné a odlišují se testem tvorby indolu. Indol tvoří *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* indol netvoří. (16)

Proteus se kultivuje na běžných půdách. Některé druhy *Protea* se pomocí bičíkům plazí po povrchu agaru. Plazení není rovnoměrné, pokud vychází z jednoho místa, vidíme tzv. koncentrické kruhy. Jedná se o tzv. fenomén příbojové vlny. Během jednoho dne dokáže přeplazit celou Petriho misku. (10)

2.3.7 Kvasinky

Jsou to jednobuněčné mikromycety, gram-pozitivní buňky. Kvasinky se pohlavně množí pučením a kvasí cukry za tvorby etanolu a oxidu uhličitého. Ke kultivaci kvasinek používáme obvykle Sabouraudův agar nebo chromogenní půdy. Na chromogenních půdách rostou kvasinky v různých zbarveních. Kvasinky dobře rostou i na krevním agaru. (10)

Kvasinky jsou oportunně patogenní pro člověka. Patogenita závisí na celkovém stavu organismu člověka a na jeho imunitním systému. Významné faktory, které se podílejí na rozvoji kvasinkové infekce, jsou porucha glukózové tolerance nebo nepřiměřené podávání antibiotik. Dále na vznik kvasinkové infekce může mít vliv špatná strava (převaha cukru). (13)

- **Rod *Candida***

Jsou to původci povrchových i systémových mykóz. Jsou nejčastějšími původci mykotických onemocnění u člověka. Nejznámějším druhem je *Candida albicans*, která je původcem více jak poloviny případů etiologických infekcí. Další známé druhy jsou např. *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*. (10)

Candida albicans je častým původcem vaginálních mykóz. Při přemnožení kvasinek se na sliznici úst a jazyka se tvoří bílé povlaky nazývané moučnivka. Toto onemocnění se objevuje např. u novorozenců, kteří nemají vytvořenou normální mikroflóru. Při výraznějším oslabení imunity dochází k poškození jícnu. Velice časté jsou kandidózy urogenitálního traktu (vaginální kandidóza a cystitida). Kožní infekce vznikají na místech s kožními záhyby a s vlhkým prostředím, kvasinkovou infekcí mohou být postiženy i nehty. Systémové kandidózy jsou poměrně vzácné, ale mají vysokou úmrtnost, dochází k nim převážně u osob s oslabenou imunitou. Vysokou úmrtnost mají také kvasinkové infekce krevního řečiště. (10)

2.4 Laboratorní diagnostika

Včasná diagnostika sepse je důležitá pro úspěšnou léčbu. Každá hodina prodlení v diagnostice sepse znamená vyšší mortalitu pacientů. Nejde jen o diagnostiku sepse, ale je potřeba identifikovat infekční agens a jeho citlivost k antibiotikům. (17)

2.4.1 Mikrobiologie

V mikrobiologii se používá hemokultivační vyšetření pomocí automatizovaného systému, který slouží k průkazu infekčních agens v krevním řečišti. Při pozitivitě hemokultury je nutná další identifikace druhu mikroba. Rychlá diagnostika je podkladem pro cílenou antibiotickou léčbu. (2)

Odběr hemokultury se indikuje u závažných infekcí, kde se předpokládá přítomnost původce v krvi. Obvykle se odebírají 2-3 hemokultury. Při intermitující febrilii na začátku vzestupu teploty, u kontinuální febrilie několikrát za sebou, např. v půlhodinových intervalech. (6)

Odběr hemokultury musí být proveden před nasazením antibiotické terapie. Pokud jsou antibiotika již podávána, měl by být odběr hemokultury proveden těsně před podáním další pravidelné dávky antibiotik. (4)

2.4.2 Klinická biochemie

- **C-reaktivní protein a Prokalcitonin**

C- reaktivní protein (CRP) je protein akutní fáze, který je produkován játry s maximem produkce 24-48 hodin po zánětlivém podnětu. (17)

CRP je dnes nejčastěji používané vyšetření pro diagnostiku zánětlivých reakcí organismu. Je levný a většinou široce dostupný ve všech laboratořích. (5)

CRP se nedá považovat za specifický parametr pro detekci zánětlivé reakce, jeho hladina stoupá i u neinfekčních stavů. Pomocí koncentrace CRP se dá rozeznat bakteriální nebo virový zánět. (17)

Prokalcitonin (PCT) je více specifický marker sepse než CRP. Za normálních okolností je PCT produkován C buňkami štítné žlázy. U pacientů se sepsí se PCT produkuje mimo štítnou žlázu. Vysoké koncentrace PCT jsou v souvislosti s přítomností infekce krevního řečiště. Po podání správných antibiotik hodnota PCT klesá. Vyšetření PCT je používáno v běžné praxi jako ukazatel sepse. Nevýhodou této metody je vysoká cena a náročnost laboratorního vyšetření. (5)

- **Cytokiny**

Cytokiny jsou dalším markerem akutní fáze zánětlivé odpovědi. Mezi nejčastěji stanovované cytokiny patří: interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) a interleukin-10 (IL-10). IL-6 a IL-10 jsou prozánětlivé cytokiny, IL-8 je hlavním chemokinem. U pacientů s vysokou koncentrací IL-6 a IL-8 byla zjištěna vyšší úmrtnost na sepsi. Stanovení cytokinů vyjadřuje více intenzitu zánětlivého onemocnění než samotnou přítomnost infekce. Z hlediska diagnózy sepse je senzitivnější a specifitější stanovení CRP a PCT. (17)

2.4.3 Hematologie

V průběhu sepse dochází k aktivaci koagulace. Pokles hladiny inhibitoru koagulace se projevuje již v prvním stádiu sepse. Vyšetřuje se hladina antitrombinu III a taky pokles proteinu C, který se ale už běžně nevyšetřuje. Čím nižší je hladina proteinu C, tím pravděpodobnější je výskyt septického šoku. Aktivací koagulace dochází u sepse naopak takřka k neměnné pozitivitě D dimerů, které jsou zvýšené u těžké sepse. Jediný antitrombin lze použít ke sledování závažnosti akutního stavu, při příznivém průběhu těžké sepse se jeho snížené hodnoty zvyšují. (5)

3 CÍL PRÁCE

- 1) Seznámit se s metodikou zpracování hemokultur pomocí systému Bactec 9050, se zpracováním pozitivní hemokultury mikroskopicky i kultivačně a také s identifikací mikroorganismů včetně stanovení citlivosti k antibiotikům.
- 2) Vyhodnotit počet pozitivních hemokultur v Oblastní nemocnici Kladno v daném období.
- 3) Vyhodnotit nálezy jednotlivých infekčních agens v hemokulturách v daném období.
- 4) Porovnat výskyt infekčních agens v hemokulturách v Oblastní nemocnici Kladno s informacemi v odborné literatuře.

4 METODIKA

4.1 Hemokultivace

Hemokultivace slouží k detekci infekčních agens v krevním řečišti. V dnešní době se používají převážně automatizované systémy kultivace. Automatické systémy mají vysokou citlivost na přítomnost patogenů v hemokultuře a kontinuální měření podstatným způsobem zkracuje dobu nutnou k detekci positivity. (1)

- **Princip systému Bactec 9050**

Principem metody je spektrofotometrická detekce CO₂ vznikajícího metabolismem množících se bakterií pomocí senzoru, který se nachází na dně lahvičky. Senzor je oddělen od kultivační půdy membránou, která je propustná pouze pro CO₂, který během mikrobiálního metabolismu proniká do senzoru. Snižuje se pH, které ovlivňuje schopnost fluorescence. Každou změnu pH v lahvičkách přístroj okamžitě hlásí zvukovým a světelným signálem. (1)



Obrázek 1 Hemokultivační systém Bactec 9050

4.2 Odběr materiálu

4.2.1 Postup při odběru

Odběr se provádí za sterilních podmínek, aby nedocházelo ke kontaminacím. K dezinfekci kůže se používá 70% alkohol, následná druhá dezinfekce jodovým preparátem, který se nechá zaschnout na kůži. Alkoholem se dezinfikuje i gumička na lahvičkách. Po dezinfekci se provede kontrola sterility kůže pomocí sterilního tampónu, který se doručí i s hemokulturou do laboratoře. (18)

Odebírají se dvě lahvičky, jedna pro anaerobní a druhá pro aerobní mikroorganismy. Před odběrem je potřeba lahvičku řádně označit štítkem, na kterém je uvedeno oddělení, jméno a rodné číslo pacienta. Při lepení štítků je důležité, aby nebyl přelepen čárový kód, který je důležitý pro hemokultivační systém. U dospělých se odebírá 8-10 ml krve do aerobní a anaerobní lahvičky a dětem se odebírá 4-5 ml jen do jedné lahvičky. Odběr se provádí opakovaně 2-3 krát s časovým odstupem 15-30 minut. Při více odběrech je vhodné označit pořadí odběru, stejně tak u stěru z kůže. (18)

Za nevhodný vzorek se považuje hemokultura, u které nebyly dodrženy podmínky odběru, špatná dezinfekce kůže před odběrem, špatné načasování odběru, nedostatečný objem krve. Vzorek byl špatně uchován nebo nebyl dodržen správný transport do laboratoře. (19)

- **Lahvičky pro odběr**

Ve všech lahvičkách je vytvořený podtlak pro snadnější inokulaci krve do lahvičky. Lahvičky mají čárový kód pro potřeby dokumentace. Všechny lahvičky se skladují při teplotě 2-20 °C bez přístupu světla. (1)



Obrázek 2 Lahvičky Bactec (20)

V Oblastní nemocnici Kladno se nejčastěji používají lahvičky:

Bactec Plus Anaerobic/F a Bactec Plus Aerobic/F

Lahvičky se používají u dospělých pacientů pro anaerobní a aerobní kultivaci.



Obrázek 3 Bactec Plus Anaerobic/F (21)



Obrázek 4 Bactec Plus Aerobic/F (21)

Bactec Peds plus/F

Lahvička se používá na odběr u dětských pacientů.



Obrázek 5 Bactec Peds plus/F (21)

4.3 Zpracování vzorku v laboratoři

4.3.1 Příjem materiálu do laboratoře

Laboratoř vzorek nepřijme, pokud nejsou splněny požadavky na odběr, transport, skladování, anebo pokud se při příjmu vzorku zjistí, že došlo k porušení odběrové soupravy a tím možné kontaminaci vzorku. V takových případech laboratoř žádá o opětovné odebrání a zaslání vzorku. (19)

Pracovník laboratoře provádí kontrolu údajů na žádance a na odběrové lahvičce. Musí také zkontrolovat správnost zadání požadovaného vyšetření. Kontrolované údaje potvrdí pracovník podpisem na žádanku. Každá hemokultivační lahvička je označena pořadovým číslem, které je shodné s číslem na žádance. Pod tímto číslem laborant následně zapíše údaje do laboratorního informačního systému (LIS). Při příjmu se musí zkontrolovat neporušenost vzorku. Hemokultivační lahvička je dopravena na určené pracoviště v laboratoři, kde je následně zpracována laborantem. (19)

4.3.2 Zpracování hemokultur

V laboratoři se hemokultura opět zkontroluje s žádankou. Správně označená a zkontrolovaná hemokultura s čárovým kódem se vloží do přístroje Bactec, kde se kultivuje po dobu 7 dnů. Mykotické a lytické lahvičky se kultivují po dobu 14 dnů.

Stěr před hemokulturou se vyočkuje na krevní agar a inkubuje v termostatu 24 hodin při 37°C. (22)

Pozitivitu hemokultury přístroj automaticky signalizuje světelným signálem a současně zvukovým signálem. (22)

Pokud hemokultura v přístroji nesignalizuje, lahvička se považuje za negativní a kultivace se ukončí po 7 dnech, u lytických a mykotických hemokultur po 14 dnech. (22)

- **Hlášení pozitivní hemokultury**

Na příslušné oddělení se musí nahlásit signalizace hemokultury. Laborant zavolá na oddělení a nahlásí pozitivitu. Hlášení na oddělení musí zapsat do LIS, ale i na zadní stranu žádanky (kdy bylo hlášení provedeno, kdo hlásil a komu byl výsledek nahlášen a následně podepsáno laborantem). (22)

Epidemiologicky významné izoláty z hemokultury (např. methicilin-rezistentní *S. aureus*-MRSA, multirezistentní kmeny nebo kmeny s produkcí metalobetalaktamáz) se hlásí na Oddělení hygieny a epidemiologie Oblastní nemocnice Kladno. Místní Krajské hygienické stanici se hlásí kultivační nález *Streptococcus pneumoniae* v hemokultuře, MRSA nebo izoláty s produkcí metalobetalaktamáz. (19)

- **Zpracování pozitivní hemokultury**

Pozitivní hemokultura se vyjme z přístroje, provede se dezinfekce gumové zátky a sterilní infekční jehlou se odebere vzorek krve a zhotoví se nátěr na podložní sklo. Nechá se zaschnout a fixuje se nad plamenem. Nátěr se obarví dle Grama a zhodnotí se pod mikroskopem. Podle mikroskopického nálezu (gram-pozitivní, gram-negativní tyčinky nebo koky, případně kvasinkovité mikromycety) vysokoškolský pracovník určí vhodné kultivační půdy a typ kvalitativní diskové citlivosti přímo z hemokultury. (22)

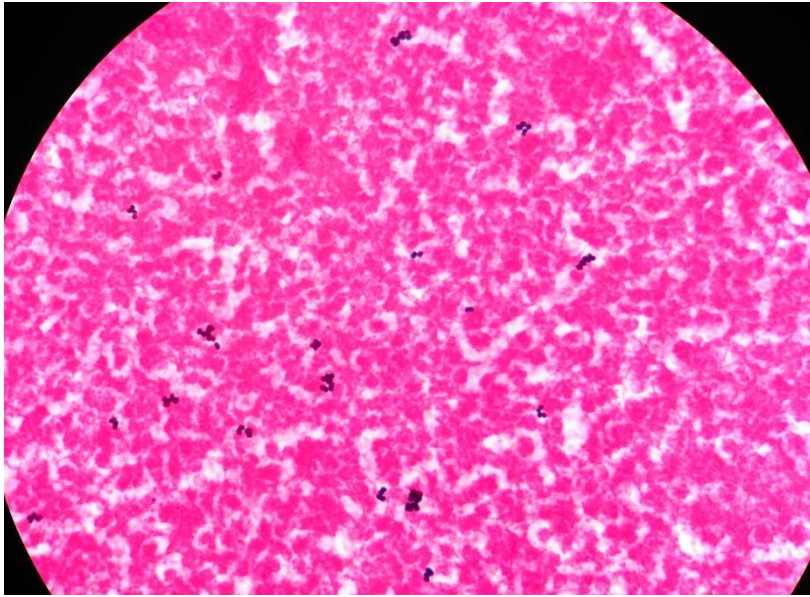
Pevné půdy kultivované aerobně se odečítají za 24 hodin, anaerobní za 48 hodin. Následně se provedou testy k bližší identifikaci druhu mikroorganismu a kvalitativní a kvantitativní citlivost z čisté kultury. (23)

- **Barvení dle Grama**

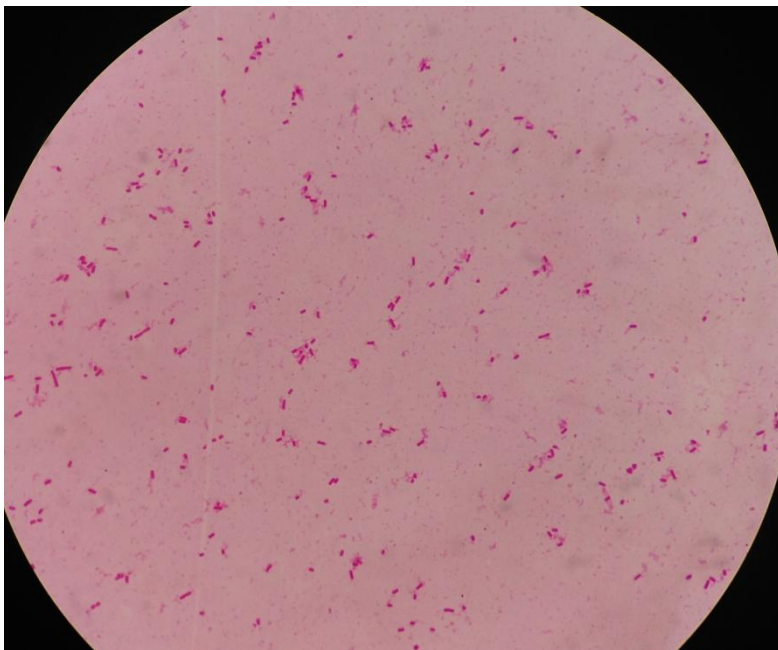
Barvení je považováno za diagnostickou metodu, která pomáhá doručovat bakterie. Slouží k rychlé předběžné diagnostice mikroorganismu. Princip barvení je založen na barvení krystalovou violetí a moření lugolovým roztokem a následným odbarvením pomocí rozpouštědel. (24)

U bakterií, u kterých se v buněčné stěně vyskytuje kyselina teichoová, se vytvoří pevný barevný komplex, který se neodbarví ani pomocí rozpouštědel. Takto obarvené bakterie mají pod mikroskopem fialové až modrofialové zabarvení a nazývají se **gram pozitivní (G+)**. (24)

U bakterií, u kterých se v buněčné stěně nevyskytuje kyselina teichoová, se vytvořený barevný komplex rozpustí za pomoci rozpouštědel a musí se následně dobarvit safraninem. Pod mikroskopem jsou bakterie zbarveny do růžova a nazývají se **gram negativní (G-)**. (24)



Obrázek 6 G+ koky



Obrázek 7 G- tyčinky

- **Kultivace**

Základem správné kultivace je práce s čistými kulturami. Dobrá kultivace je podmíněna správným odběrem a šetrným transportem do laboratoře. (4)

Na kultivačních půdách se provádí kultivace aerobních a anaerobních bakterií a kultivace kvasinek a plísní. (25)

Aerobní kultivace: probíhá v termostatu při teplotě 37 °C. Kultivační půdy se odečítají za 24 hodin, v případě potřeby lze kultivaci prodloužit. Po rodovém případně druhovém určení mikroorganismu se stanoví jeho citlivost k antibiotikům. (25)

Anaerobní kultivace se odečítá za 48 hodin, může se prodloužit až na 5-7 dní. Ke kultivaci anaerobních bakterií se používá termostat s anaerobní atmosférou, základem je N₂ s příměsí CO₂ z tlakových nádob. Součástí je vzduchotěsně uzavřený pracovní prostor. Anaerobní termostat se používá i v Oblastní nemocnici Kladno. V menších laboratořích se používají tzv. anaerostaty, které se vkládají do běžného termostatu. (10)

Kultivační půdy

Krevní agar je nejběžnější půda používaná v klinické mikrobiologii. Agar se připravuje přidáním 5-10% sterilní ovčí krve k agarovému základu. Pro náročnější kultivaci mikroorganismů se agarový základ může dále obohacovat. Krevní agar se řadí mezi základní kultivační půdy. Jeho výhodou je, že umožňuje sledovat hemolytické vlastnosti vykultivovaných kmenů. Hemolýza je schopnost mikroorganismu rostoucího na krevním agaru narušovat erythrocyty. (10)

Rozeznáváme úplnou a neúplnou hemolýzu:

Úplná hemolýza se projeví odbarvením a projasněním krevního agaru kolem kolonie. Základem úplné hemolýzy je úplný rozpad erytrocytů včetně rozložení hemoglobinu. U *Streptococcus pyogenes* se úplná hemolýza označuje jako β -hemolýza, ale není správné toto označení β -hemolýza používat pro všechny úplné hemolýzy, protože např. u stafylokoka je produkován hemolysin zvaný α -lyzin, který rozkládá erytrocyty. (10)

Při **neúplné hemolýze** se červená barva krevního agaru ztrácí, ale půda v zóně hemolýzy je zakalená, to znamená, že se erytrocyty nerozpadly. Typickým příkladem neúplné hemolýzy je *Streptococcus agalactiae*. (10)

α -hemolýza neboli viridace se označuje změna krevního barviva na zelený verdoglobín. Viridaci mají např. ústní streptokoky. (10)

Čokoládový agar je krevní agar, který je zahřátý na 80°C, aby se rozrušily erytrocyty. Dobře na něm rostou hemofily a meningokoky, také se využívá k diagnostice kapavky. (26)

Endo agar je selektivní půda, na které rostou jen gram-negativní tyčinky, zatímco ostatní bakterie jsou inhibovány fuchsinem. Zároveň je tato půda i diagnostická, protože obsahuje laktózu a mikroorganismy, které štěpí laktózu, na půdě rostou v intenzivně červených koloniích (*E. coli*). Mikroorganismy neštěpící laktózu rostou ve světlých koloniích. (10)

Schaedler agar se používá ke kultivaci anaerobních bakterií. Půda má nízký oxidoredukční potenciál. Schaedler agar obsahuje hemin a cystein. (26)

Mueller-Hinton agar se používá jako půda pro stanovení citlivosti k antibiotikům. Je to třetí nejpoužívanější půda. MH- agar musí mít standardní složení a standardní difúzní vlastnosti. Pro stanovení citlivosti k antibiotikům u růstově náročnějších mikrobů se může MH-agar obohatit přídavkem 7% beraní krve. (26)

Chromogenní půdy pro identifikaci kvasinek jsou půdy, které obsahují substrát, který je štěpen enzymem, jímž disponují konkrétní druhy kvasinek. V laboratoři Oblastní nemocnice Kladno se používá chromogenní půda Colorex Candida, která umožňuje identifikaci čtyř nejčastějších kvasinek. *C. albicans* vytváří zelené kolonie, *C. glabrata* růžové lesklé kolonie, *C. tropicalis* modré kolonie a *C. krusei* světle růžové matné kolonie. Podmínky kultivace kvasinek jsou obvykle nenáročné, většina druhů vyroste za 24 hodin. (10)

Sabouraud agar je nejčastěji používanou kultivační půdou s aneurinem a antibiotiky. Agar se používá nejčastěji pro kultivaci kvasinek a plísní. (10)

4.3.3 Biochemická identifikace mikroorganismu

Tyto metody představují základní identifikaci mikrobů. Principem biochemických reakcí v testu je změna barvy nebo skupenství substrátu způsobená mikrobiálními enzymy, případně se použije vhodný indikátor. Pokud je test negativní, ke změně substrátu nedojde. (10)

Katalázový test: principem je štěpení 3% peroxidu pomocí enzymu katalázy na kyslík a vodu. Na sklíčko se kápne kapka peroxidu, v níž se rozmíchá jedna nebo více bakteriálních kolonií. Pokud je test pozitivní, dochází k vytvoření bublinek.

Test se používá např. k odlišení kataláza-pozitivních stafylokoků od kataláza-negativních streptokoků a enterokoků. (10)

- **Testy diagnostickými proužky**

Jedná se o rychlé testy, používají se úzké plastové proužky. Na konci proužku je reakční ploška napuštěná substrátem s indikátorem. S proužkem se pracuje tak, že reakční ploška se dotkne testované kolonie a po chvíli se odečte, zda došlo ke změně zbarvení. (10)

Oxidázový test se používá k průkazu cytochromoxidázy. V případě positivity reakční ploška zmodrá. Test se používá např. pro odlišení oxidáza-positivních a oxidáza-negativních gram-negativních nefermentujících tyčinek. (10)

PYR-test se používá k detekci pyrrolidonylpeptidázové aktivity. Zbarvení v případě positivity je červené. Pozitivní PYR-test mají např. enterokoky a *Streptococcus pyogenes*, negativní ostatní streptokoky. (10)

- **Složité zkumavkové testy**

Zkumavkové testy jsou testy, kde se výsledek odečítá jako změna zbarvení ve zkumavce. Testy se nechávají inkubovat přes noc. Jedná se o testy, u kterých lze v jedné zkumavce vyhodnotit více biochemických reakcí. Testy se sice nedají automatizovat, ale představují však úsporu času a proto se tyto testy v laboratoři používají. (10)

Hajnova půda umožňuje zjistit fermentaci glukosy a laktosy, tvorbu sirovodíku a tvorbu plynu z glukosy. Půda je šikmo ztuhlá. Podle toho, zda bakterie štěpí nebo neštěpí glukosu, laktosu a zda tvoří sirovodík nebo se uvolňuje plyn, se půda různě barví. (10)

Půda MIU je půda k průkazu pohybu, tvorby indolu a štěpení ury. Bakterie štěpící ureu se projeví zružováním půdy. Bakterie tvořící indol vytváří červený prsteneček. U pohyblivých bakterií se vytváří zákal v celém objemu agarů. (10)

- **Jiné kombinované testy**

Švejcarova plotna se skládá z tzv. biochemického klínu, který je šikmo nalitý do třetiny dna Petriho misky. Na zbytku misky je Endova půda. Švejcarova plotna se očkuje jednou kličkou tak, že se nejprve hustě naočkuje biochemický klín, pak kolmo na klín opět hustě úzký pás uprostřed Endovy půdy. Boční strany se rozočkují pro získání čistých kolonií. Nakonec se klička ještě několikrát vpíchne do klínu. Nad vpichy se položí sklíčko a na pás na Endově půdě se umístí tableta s mannitolem a sacharosou. (10)

Fermentace glukosy se projeví zežloutnutím klínu, tvorba sirovodíku zčernáním klínu. Modrý klín znamená, že bakterie tvoří ureasu. Štěpení laktosy se projeví zrudnutím Endovy půdy. Štěpení mannitolu nebo sacharosy se projeví tmavě červenou zónou kolem tablet. Tvorba plynu z glukosy se projeví bublinkami pod sklíčkem. (10)

- **Komerční testy v mikrotitračních destičkách**

Tyto testy v destičkách si můžeme představit jako miniaturizovanou pestrou řadu zkumavek. Zkoumaný kmen se rozmíchá ve fyziologickém roztoku, tato směs se převede do kontaktu se sušeným substrátem v důlcích v destičkách. Používají se vždy jednoduché testy s dvěma možnostmi výsledku + nebo -. (10)

Soupravy řady MikroLatest

V českých podmínkách nejběžnější a nejdostupnější test. Jednotlivé testy jsou nazvané podle skupin bakterií, které se identifikují, například ENTEROtest 16 slouží k diagnostice významných druhů střevních enterobakterií, ENCOCCUStest je určen pro diagnostiku enterokoků, testy se dají určovat i kvasinky (CANDIDA Screen). (10)

Souprava obsahuje plastový rám zaplněný jednotlivými destičky s jamkami. Do jamek se kape bakteriální suspenze. Na některé jamky se navíc kape parafínový olej. Většina testů se inkubuje 24 hodin, při teplotě 37 °C. U některých reakcí se před odečtem musí ještě přidat další činidlo. Testy se odečítají okem nebo spektrofotometrem. (10)

Soupravy API Biomerieux

Jsou to biochemické testy na standardizovaných a miniaturizovaných testovacích proužcích, vyznačují se snadnou použitelností a jsou interpretovány pomocí komplexních identifikačních databází. API soupravy jsou uznávány jako referenční metoda pro druhovou identifikaci bakterií a kvasinek. Nejvíce používané jsou sety API 32 E, API 20 A, API 20 Strep. (27)

API 32 E se používá pro identifikaci *Enterobacteriaceae* a další nenáročné gram-negativní tyčinky. API 20 A umožňuje snadné provedení 21 testů pro biochemickou identifikaci anaerobů. API 20 Strep umožňuje skupinovou, ale i druhovou identifikaci streptokoků a enterokoků, které je možné pomocí kombinací 20 biochemických testů identifikovat. (27)

4.3.4 Antigenní analýza

Tato metoda se používá k vnitrodruhové identifikaci mikroorganismu. Metoda je založena na reakci antigen-protilátka. Antigenní analýza se dnes provádí výhradně jen pomocí aglutinace a ta může být klasická nebo na nosičích. Postup je vždy stejný: na podložní sklíčko nebo kartičku z leštěného kartónu se nakape testované sérum a přidá se k tomu jedna kolonie bakterií. Posléze se pozoruje, zda v krátkém čase vznikne aglutinace. Na začátku se používají polyvalentní séra. Polyvalentní séra obsahují více druhů protilátek. Pokud dojde k pozitivitě polyvalentního séra, pokračuje se séry s nižší valencí, až k sérum monovalentním. (10)

4.3.5 Stanovení citlivosti k antibiotikům

Zjišťování citlivosti k antibiotikům je důležité stanovení pro léčbu pacienta. Podávání antibiotik bez průkazu etiologického agens a bez určení jeho citlivosti na antibiotika je převážně bez klinického efektu a mohou ohrožovat život pacienta. Stanovení se dělí na kvalitativní testy a kvantitativní testy. (10)

- **Kvalitativní testy**

Diskový difuzní test je metoda nejrozšířenější. Umožňuje stanovit citlivosti velkého množství bakteriálních kmenů na širokou škálu antibiotik. Na pevné kultivační půdy, kde je naočkovaný bakteriální kmen, se kladou papírové disky, které jsou napuštěny antibiotiky. Jako půda se používá Mueller-Hintonův agar (MH), nebo pro náročné bakterie MH agar s příměsí krve. (10)

Očkování plotny u diskového difuzního testu: Z vyšetřovaného kmene je potřeba připravit suspenzi ve fyziologickém roztoku. Hustota by měla odpovídat stupni 0,5 McFarlandova zákalového standardu, tj. $1-2 \times 10^8$ CFU/ml u *E.coli*. V praxi se suspenze očkuje tampónem ve dvou na sebe kolmých směrech. Disky jsou popsány zkratkou antibiotik a pokládáme je na již naočkovanou půdu ve směru hodinových ručiček. Každý disk téhož antibiotika obsahuje stejné množství antibiotika. Na půdu můžeme dát maximálně 6 disků. Půda se kultivuje v termostatu 18 – 24 hodin při 37°C (10)

Za 18-24 hodin se odečítají velikosti tzv. inhibičních zón. Bakterie, která má větší inhibiční zónu než je referenční hodnota (tzv. breakpoint), je k antibiotiku citlivá. Roste-li bakterie až k disku, nebo má menší inhibiční zónu než je breakpoint, je k danému antibiotiku rezistentní. (10)

V současné době jsou k dispozici dva renomované systémy, stanovující klinické breakpointy antibiotik: CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) a EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Breakpointy EUCAST jsou volně dostupné na jejich webových stránkách. Tabulky breakpointů jsou každoročně aktualizovány. (28)

- **Kvantitativní testy**

Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) je přesnější než disková difuzní metoda. Používá se ke stanovení citlivosti kmenů, které byly izolovány z hemokultury nebo likvoru. Ke stanovení MIC se většinou využívá mikrodiluční metoda. Používají se mikrotitrační destičky naplněné MH-mediem, které obsahují různé koncentrace antibiotik nařazené geometrickou řadou. Z vyšetřovaného kmene se připraví suspenze, která se pomocí inokulátoru naočkuje do jamek. Následující den se odečítá, zda bujón v jamkách zůstal čirý nebo se vytvořil zákal způsobený růstem bakterií. Za MIC se považuje nejnižší koncentrace antibiotik, která byla schopná potlačit růst bakterií. Koncentrace se udává v mg/l. (26)

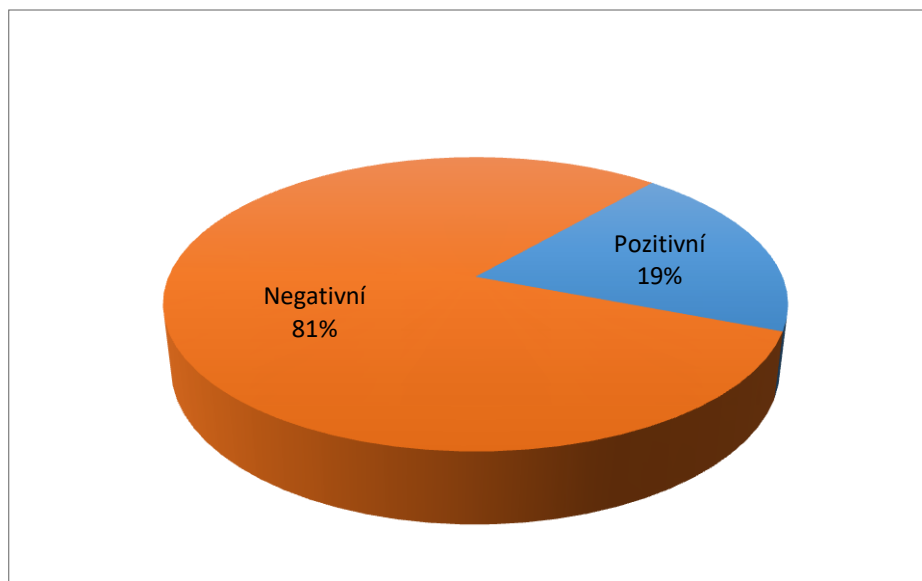
E-test je diagnostický proužek napuštěný stoupající koncentrací antibiotika. Proužek se pokládá na pevnou kultivační půdu s naočkovanou suspenzí bakterie. Inhibiční zóna má vejčitý tvar a tam, kde její okraj protíná proužek, lze odečíst na škále hodnot MIC. (10)

5 VÝSLEDKY

Ve sledovaném období 1.6.2016 - 31.8.2016 bylo v Oblastní nemocni Kladno odebráno 601 hemokultur, z toho bylo 117 hemokultur pozitivních (19%) a 484 negativních (81%). Častěji byly hemokultury odebírány mužům (316 hemokultur) než ženám (253 hemokultur), 32 hemokultur bylo odebráno dětem do 15 let.

Tabulka 1 Počet odebraných hemokultur ve sledovaném období a počet pozitivních a negativních hemokultur.

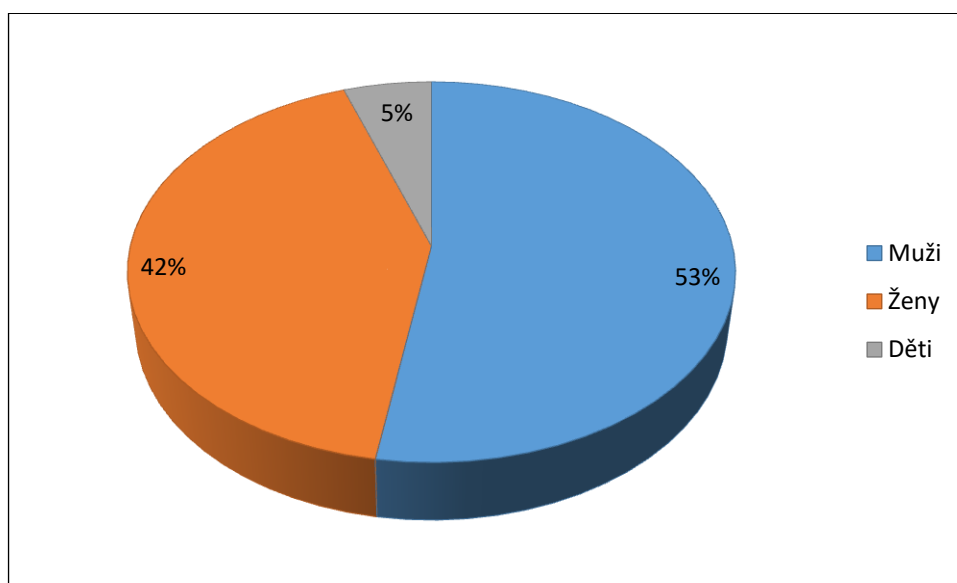
Měsíc	Počet hemokultur		
	Pozitivní (%)	Negativní (%)	Celkem
Červen	48 (21%)	177 (79%)	225
Červenec	34 (20%)	135 (80%)	169
Srpen	35 (17%)	172 (83%)	207
Celkem	117 (19%)	484 (81%)	601



Obrázek 8 Graf znázorňuje zastoupení pozitivních a negativních hemokultur.

Tabulka 2 Počet hemokultur u mužů, žen a dětí.

Měsíc	Počet hemokultur			
	Muži (%)	Ženy (%)	Děti ≤ 15 let (%)	Celkem
Červen	120 (53%)	96 (43%)	9 (4%)	225
Červenec	84 (50%)	70 (41%)	15 (9%)	169
Srpen	112 (54%)	87 (42%)	8 (4%)	207
Celkem	316 (53%)	253 (42%)	32 (5%)	601

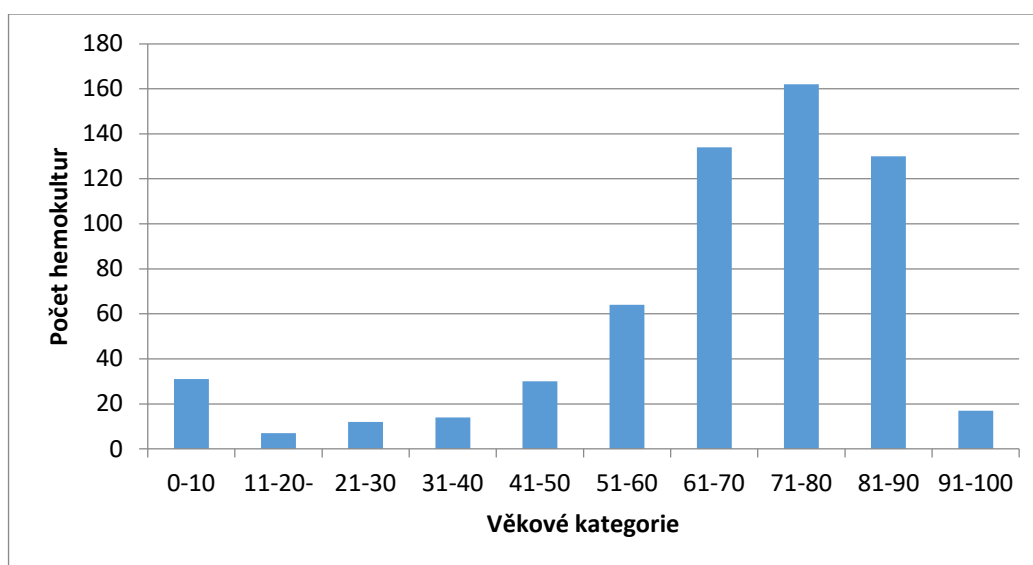


Obrázek 9 Graf ukazuje zastoupení mužů, žen a dětí.

Statistické vyhodnocení skupiny pacientů s odebranými hemokulturami ukázalo, že nejvíce hemokultur bylo odebráno pacientům ve věku 61-90 let.

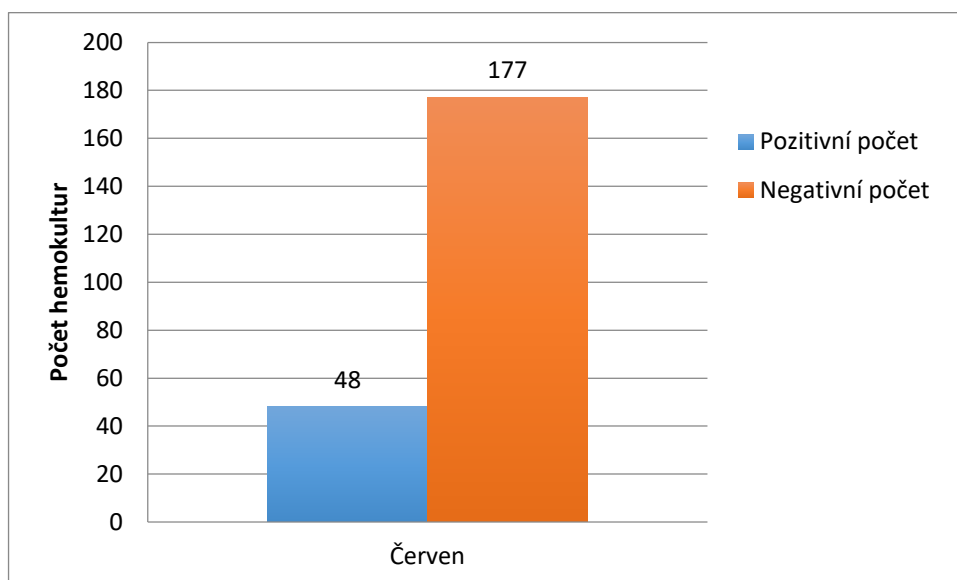
Tabulka 3 Věkové složení souboru pacientů s odebranými hemokulturami

Věkové kategorie	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	Celkem
Muži	19	4	5	7	21	50	89	78	59	5	337
Ženy	12	3	7	7	9	14	45	84	71	12	264
Celkem	31	7	12	14	30	64	134	162	130	17	601



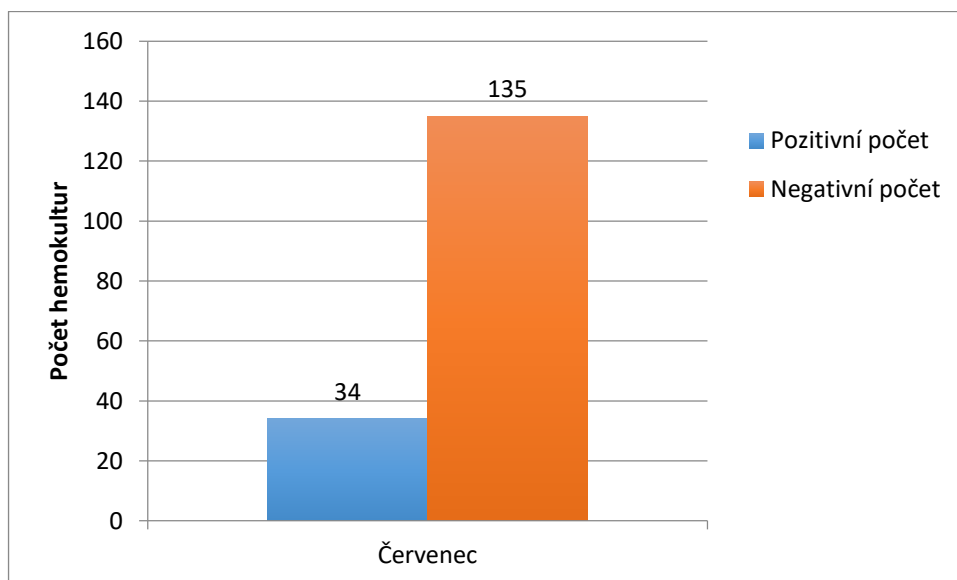
Obrázek 10 Graf zobrazuje věkové složení skupiny pacientů.

Za období **červen** bylo přijato celkem 225 hemokultur. Z toho bylo 48 pozitivních hemokultur (21%), 117x byla hemokultura negativní (79%).



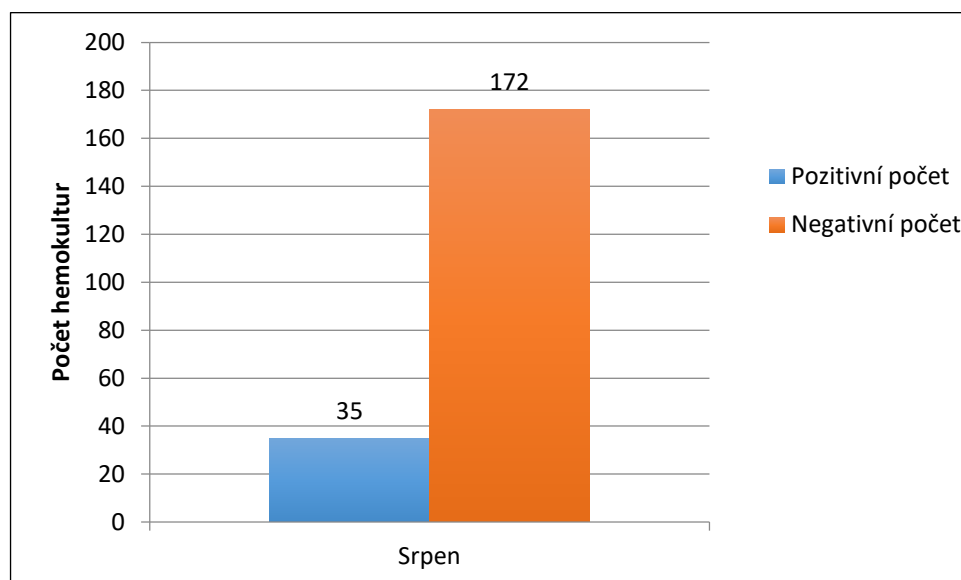
Obrázek 11 Graf znázorňuje počet pozitivních a negativních hemokultur v červnu.

Za měsíc **červenec** bylo do laboratoře posláno nejméně hemokultur z celého sledovaného období. Celkem to bylo 169 hemokultur, z toho 34 bylo pozitivních (20%) a 135 negativních (80%).



Obrázek 12 Graf znázorňuje počet pozitivních a negativních hemokultur v červenci.

V srpnu bylo odebráno celkem 207 hemokultur, z toho bylo 35 pozitivních (17%) a 172 negativních (83%).



Obrázek 13 Graf znázorňuje počet pozitivních a negativních hemokultur v měsíci červnu.

Ve sledovaném období bylo nalezeno celkem 24 různých druhů mikroorganismů, které byly vykultivovány z odebraných hemokultur. Celkem bylo identifikováno 155 mikroorganismů ze 117 pozitivních hemokultur. Nejčastěji byly nalezeny stafylokoky plazmakoaguláza negativní, které byly vykultivovány celkem 63x (40,6%). Dalším častým nálezem byla *Escherichia coli*, která byla identifikována celkem 24x (15,5%), *Klebsiella pneumoniae* byla nalezena celkem 13x (8,4%) a *Staphylococcus aureus* byl identifikován celkem 9x (5,8%).

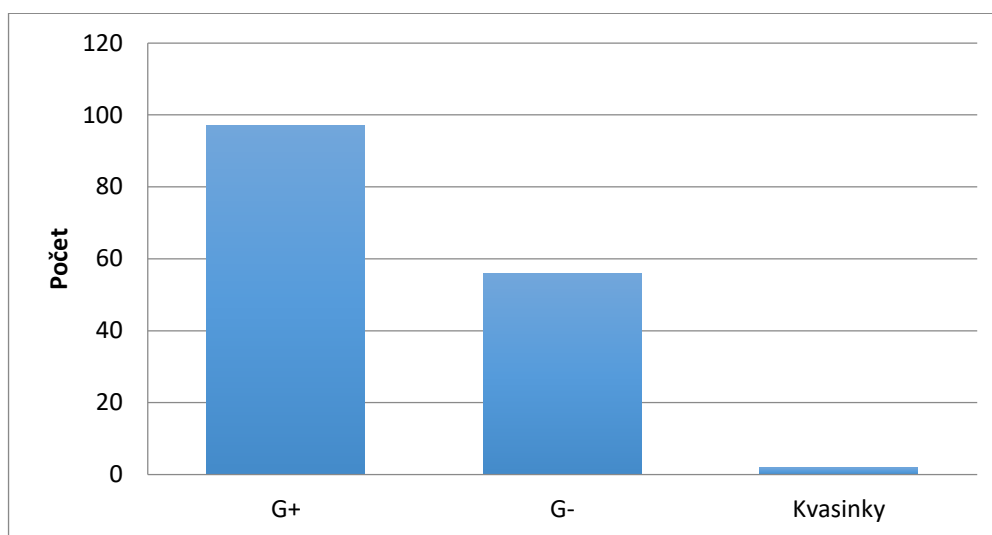
Tabulka 4 Výskyt mikroorganismů v odebraných hemokulturách

Mikroorganismus	Počet celkem	%
Stafylokoky plazmakoaguláza negativní	63	40,6
<i>Escherichia coli</i>	24	15,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	8,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	5,8
<i>Corynebacterium species</i>	5	3,2
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	3,2
<i>Propionibacterium species</i>	4	2,6
<i>Proteus mirabilis</i>	4	2,6
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	1,9
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	1,9
<i>Enterococcus faecium</i>	3	1,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	1,9
<i>Streptococcus mitis</i>	3	1,9
<i>Candida species</i>	2	1,3
<i>Propionibacterium acnes</i>	2	1,3
G-nefermentující tyčinky	1	0,6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0,6
<i>Pseudomonas putida</i>	1	0,6
<i>Salmonella enteritidis</i>	1	0,6
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,6
Sporulující mikroorganismy	1	0,6
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,6
<i>Streptococcus</i> beta-hemolytický skupina B	1	0,6
<i>Streptococcus</i> beta-hemolytický skupina G	1	0,6
celkem	155	100,0

Po rozdělení mikroorganismů podle barvitelnosti dle Grama bylo zjištěno, že gram-pozitivních mikroorganismů bylo 97 (62,6%), gram-negativních 56 (36,1%) a dvakrát byly identifikovány kvasinky (1,3%).

Tabulka 5 Zastoupení gram-pozitivních (G+) a gram-negativních (G-) mikroorganismů v odebraných hemokulturách.

	Celkový počet	%
G+	97	62,6
G-	56	36,1
Kvasinky	2	1,3
Celkem	155	100,0

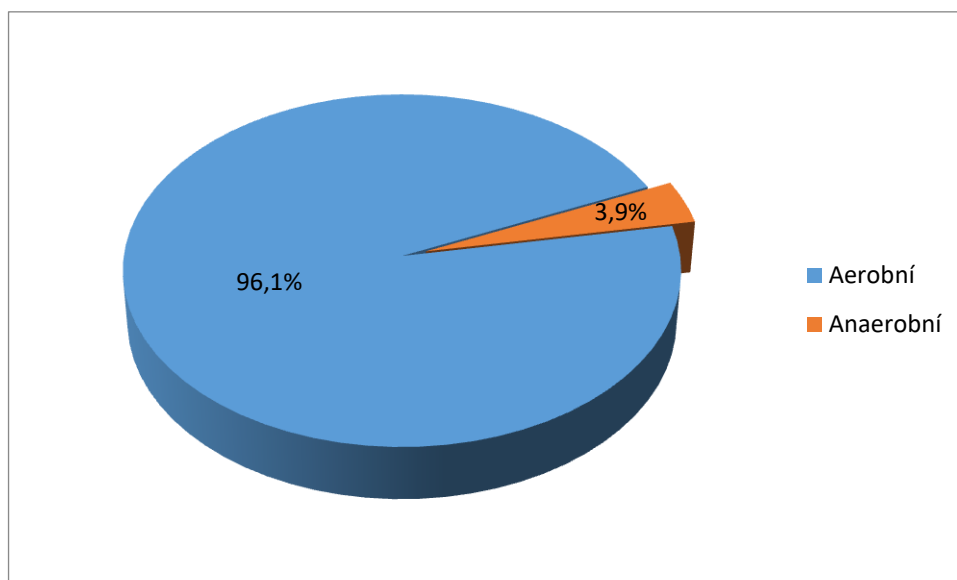


Obrázek 14 Graf popisuje zastoupení gram-pozitivních (G+) a gram-negativních (G-) mikroorganismů v odebraných hemokulturách.

Při další analýze bylo zjištěno, že 149 mikroorganismů bylo aerobních a fakultativně anaerobních (96,1%) a 6 mikroorganismů bylo anaerobních (3,9%)

Tabulka 6 Zastoupení aerobních a anaerobních mikroorganismů

Mikroorganismus	Počet	%
Aerobní	149	96,1
Anaerobní	6	3,9
Celkem	155	100,0



Obrázek 15 Graf zobrazuje zastoupení aerobních a anaerobních mikroorganismů

6 DISKUZE

Ve sledovaném období bylo odebráno celkem 601 hemokultur, 117 z nich bylo pozitivních (19%) a 484 negativních (81%). Pozitivita hemokultur byla obdobná jako např. v práci Votava, 1998, který uvádí pozitivitu hemokultur 14,8% v období 1991-1993 ve Fakultní nemocnici u sv. Anny v Brně (1790 kultivačně pozitivních hemokultur z celkového počtu 12 064 odebraných hemokultur).

Bylo identifikováno celkem 24 různých druhů mikroorganismů. Celkem bylo vykultivováno 155 mikroorganismů ze 117 pozitivních hemokultur. U některých hemokultur signalizovaly obě hemokultivační lahvičky, většinou se potvrdila přítomnost stejného mikroorganismu, u některých hemokultur byla pozitivní pouze jedna lahvička. V devíti případech bylo v jedné hemokultivační lahvičce identifikováno více druhů mikroorganismů.

Nejčastěji byly nalezeny stafylokoky plazmakoaguláza negativní, které byly popsány celkem 63x (40,6%), dalším častým nálezem byla *Escherichia coli* (15,5%), *Klebsiella pneumoniae* (8,4%) a *Staphylococcus aureus* (5,8%).

Když byly mikroorganismy rozděleny podle barvitelnosti dle Grama, bylo zjištěno 97 mikroorganismů gram-pozitivních (62,6%), 56 gram-negativních (36,1%) a ve dvou případech byly identifikovány kvasinky (1,3%). Převládaly mikroorganismy gram-pozitivní. V práci Votava, 1998 popsali v souboru pacientů ve Fakultní nemocnici u sv. Anny v Brně v letech 1991-1993 gram-negativních mikroorganismů 57%, gram-pozitivních 37%, v 5% identifikovali kvasinky. Odlišné výsledky v této studii mohou být způsobeny např. délkou sledovaného období, v této studii pouze tři měsíce, ve studii Votava, 1998 tři roky. Dalším důvodem může také být odlišná skladba pacientů. Neméně podstatným důvodem může také být kontaminace při odběru hemokultury a tedy falešná pozitivita hemokultury. Nález stafylokoků plazmakoaguláza negativních v hemokultuře je

třeba vždy hodnotit velmi opatrně vzhledem k možné kontaminaci z kůže. Je nutné porovnat nálezy ve všech odebraných hemokulturách (včetně citlivostí k antibiotikům) a dát do souvislosti s klinickým stavem pacienta. Jak již zmínil ve své knize Čermák, 2008, dalším důvodem může být změna spektra etiologických agens infekcí krevního řečiště, přibývá infekcí vyvolaných gram-pozitivními mikroorganismy, hlavně koaguláza negativními stafylokoky.

Z gram-negativních mikroorganismů byly nejvíce zastoupeny *Escherichia coli* (15,5%), *Klebsiella pneumoniae* (8,4%), *Enterobacter* sp. (3,8%) a *Pseudomonas aeruginosa* (1,9%). Tyto výsledky jsou v souladu s publikací Votava, 1998, kde zjistili podobný výskyt těchto gram-negativních tyčinek (*Escherichia coli* 12%, *Klebsiella pneumoniae* 10%, *Enterobacter* sp. 5%, *Pseudomonas aeruginosa* 5%). (23)

Ve sledovaném souboru bylo nalezeno 149 mikroorganismů aerobních a fakultativně anaerobních (96,1%) a 6 mikroorganismů bylo anaerobních (3,9%). Toto číslo je o trochu vyšší, než udává Votava, 1998. Jednalo se o kmeny *Propionibacterium* sp. Důvodem může být opět délka studie, která je u této studie podstatně kratší, ale také možnost kontaminace z kůže při odběru. Bakterie rodu *Propionibacterium* jsou součástí běžné mikroflóry kůže a jejich nález je také nutné hodnotit velmi opatrně.

7 ZÁVĚR

Práce popisuje základní poznatky o infekci krevního řečiště, bakteriémii a sepsi a podává celkový přehled o hemokultivačním vyšetření pomocí systému Bactec.

Cílem práce bylo statisticky zhodnotit nálezy u pacientů v Oblastní nemocnici Kladno v období 1.6.2016 - 31.8.2016 a výsledky porovnat s odbornou literaturou. Seznámit se s metodikou zpracování hemokultur pomocí systému Bactec 9050, se zpracováním pozitivní hemokultury mikroskopicky i kultivačně a také s identifikací mikroorganismů včetně stanovení citlivosti k antibiotikům.

Z celkového počtu 601 odebraných hemokultur bylo 117 pozitivních (19%) a 484 negativních (81%). Z výsledků vyplývá, že nejvíce nalezených mikroorganismů byly bakterie gram-pozitivní, byly identifikovány celkem 97x (62,6%), nejčastěji byl nalezen stafylokok plazmakoaguláza negativní, který se v hemokulturách vyskytoval celkem 63x. *Staphylococcus aureus* byl nalezen celkem 9x (5,8%). V menší míře byly zastoupeny gram-negativní bakterie, byly v hemokulturách identifikovány celkem 56x (36,1%). Nejčastější izolované gram-negativní bakterie byly *Escherichia coli* (15,5%) a *Klebsiella pneumoniae* (8,4%). Ve dvou případech byly identifikovány kvasinky (1,3%).

Ze statistického vyhodnocení skupiny pacientů s odebranými hemokulturami vyplývá, že nejvíce hemokultur bylo odebráno pacientům ve věku 61-90 let.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

IKŘ	Infekce krevního řečiště
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
IL	Interleukin
NaCl	Chlorid sodný
CRP	C- reaktivní protein
PCT	Prokalcitonin
G+	Gram-pozitivní
G-	Gram-negativní
MH	Mueller-Hintonův agar
EUCAS	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CFU	Colony forming unit

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ČERMÁK, Pavel. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. 1. Praha: Maxdorf, 2008, 182 s. Jessenius. ISBN 978-80-7345-142-4.
2. SCHARFEN, Josef. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. 1. vyd. Praha: Nucleus HK, 2013, s. 236. Mikrobiologie. ISBN 978-808-7009-321.
3. JINDRÁK, Vlastimil, Dana HEDLOVÁ a Pavla URBÁŠKOVÁ. *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici*. 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 2014, 712 s. Aeskulap. ISBN 978-80-204-2815-8.
4. BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009, 651 s. ISBN 978-807-2626-441.
5. SVOBODA, Petr. *Sepe v traumatologii a chirurgii*. Vyd. 1. V Praze: Triton, 2004, 199 s. ISBN 80-725-4550-7.
6. ROZSYPAL, Hanuš. *Základy infekčního lékařství*. Vydání první. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2015, s. 566, 572 s. ISBN 978-802-4629-322.
7. VOTRUBA, Václav, Michal FEDORA a Jiří ŽUREK. *Kapitoly z dětské intenzivní péče*. 1. vyd. Praha: Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, 2013, 136 s. ISBN 978-808-7023-112.
8. HOŘEJŠÍ, Václav. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013, 330 s. ISBN 978-807-3877-132.

9. MAREK BEDNÁŘ ... [ET AL.], . *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
10. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.
11. MELTER, Oto a Annika MALMGREN. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2014, 140 s. ISBN 978-802-4624-143.
12. PETROVIČOVÁ, Anna. *Špeciálna mikrobiológia*. 1.vydání. Bratislava: Slovenská zdravotnícka univerzita, 2008, 144 s. ISBN 9788089352005.
13. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, s. 495. ISBN 80-902-8966-5.
14. BARTŮNĚK, Petr, ed., Dana JURÁSKOVÁ, ed., Jana HECZKOVÁ, ed. a Daniel NALOS, ed. *Vybrané kapitoly z intenzivní péče*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2016, 752 s. Sestra (Grada). ISBN 978-802-4743-431.
15. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, 248 s. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.
16. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014, 248 s. Sestra (Grada). ISBN 978-802-4747-712.
17. PRŮCHA, Miroslav, ed., Michal FEDORA, ed., Eva KIESLICHOVÁ, ed. a Vladimír ŠRÁMEK, ed. *Sepse*. Praha: Maxdorf, 2015, 294 s. Jessenius.

ISBN 978-807-3454-487.

18. VYTEJČKOVÁ, Renata. *Ošetrovatelské postupy v péči o nemocné II: speciální část*. 1. vyd. Praha: Grada, 2013, 288 s. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3420-0.
19. FRAJÉR, a RUMLETOVÁ, FRAJÉR, ed. OBLASTNÍ NEMOCNICE KLDADNO. *Standardní operační postupy: Vyšetření krve na přítomnost bakterií a mikromycet metodou kultivace pomoci automatizovaného systému Bactec*. Kladno, 2016.
20. BACTEC™ Plus Aerobic/F Medium. In: *BD Medical Technology* [online]. b.r. [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <http://www.bd.com/ds/productCenter/442192.asp>
21. OBLASTNÍ NEMOCNICE KLDADNO. *Laboratorní příručka: Odběrový systém mikrobiologie* [online]. In: OBLASTNÍ NEMOCNICE KLDADNO. Kladno, b.r. [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <http://www.klinickalaborator.cz/laboratorni-prirucka-unor-2017/HVEZDABCBL.htm>
22. KOŠLOVÁ, , FRAJÉR, ed. OBLASTNÍ NEMOCNICE KLDADNO. *Laboratorní příručka: Zpracování hemokultury a stěru před hemokulturou*. Kladno, 2012.
23. VOTAVA, Miroslav a Petr ONDROVČÍK. *Vybrané kapitoly z klinické mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1998, 90 s. ISBN 80-210-1805-4.

24. Praktický průvodce mikrosvětlem I. In: *Http://mikrosvet.mimoni.cz/: Gramovo barvení a imerzní mikroskopie* [online]. Tabor: OS Mimoni, 2010 [cit. 2017-05-11]. Dostupné z:
<http://mikrosvet.mimoni.cz/ulohy?microscope%5B0%5D=mikroskop>
25. KRŠKA, Zdeněk. *Techniky a technologie v chirurgických oborech: vybrané kapitoly*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 262 s. ISBN 978-802-4738-154.
26. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-868-5000-5.
27. API. In: *Biomerieux* [online]. b.r. [cit. 2017-05-10]. Dostupné z:
<http://www.biomerieux.cz/produkty/api>
28. EUCAST dokumenty. In: *Státní zdravotnický ústav* [online]. b.r. [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/eucast-dokumenty>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Hemokultivační systém Bactec 9050	30
Obrázek 2 Lahvičky Bactec (20)	32
Obrázek 3 Bactec Plus Anaerobic/F (21)	32
Obrázek 4 Bactec Plus Aerobic/F (21).....	32
Obrázek 5 Bactec Peds plus/F (21)	33
Obrázek 6 G+ koky.....	36
Obrázek 7 G- tyčinky	36
Obrázek 8 Graf znázorňuje zastoupení pozitivních a negativních hemokultur. .	45
Obrázek 9 Graf ukazuje zastoupení mužů, žen a dětí.	46
Obrázek 10 Graf zobrazuje věkové složení skupiny pacientů.	47
Obrázek 11 Graf znázorňuje počet pozitivních a negativních hemokultur v červnu.....	48
Obrázek 12 Graf znázorňuje počet pozitivních a negativních hemokultur v červenci.....	48
Obrázek 13 Graf znázorňuje počet pozitivních a negativních hemokultur v měsíci červnu.....	49
Obrázek 14 Graf popisuje zastoupení gram-pozitivních (G+) a gram-negativních (G-) mikroorganismů v odebraných hemokulturách.	51
Obrázek 15 Graf zobrazuje zastoupení aerobních a anaerobních mikroorganismů.....	52

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Počet odebraných hemokultur ve sledovaném období a počet pozitivních a negativních hemokultur.....	45
Tabulka 2 Počet hemokultur u mužů, žen a dětí.	46
Tabulka 3 Věkové složení souboru pacientů s odebranými hemokulturami.....	47
Tabulka 4 Výskyt mikroorganismů v odebraných hemokulturách.....	50
Tabulka 5 Zastoupení gram-pozitivních (G+) a gram-negativních (G-) mikroorganismů v odebraných hemokulturách.	51
Tabulka 6 Zastoupení aerobních a anaerobních mikroorganismů	52