

**ČESKÉ VYSOKÉ
UČENÍ TECHNICKÉ
V PRAZE**

**FAKULTA
BIOMEDICÍNSKÉHO
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ
PRÁCE**

2017

**SILVIE
ALVES DE CARVALHO**



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Zavedení hemokultivačního systému BACTEC do rutinní
mikrobiologické laboratoře**

**Introduction of the hemocultural system BACTEC into the routine
microbiological laboratory.**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Filip Prusík

Silvie Alves de Carvalho

Kladno 2018

Zadání bakalářské práce

Student: **Silvie Alves De Carvalho**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Zavedení hemokultivačního systému BACTEC do rutinní mikrobiologické laboratoře**
Téma anglicky: Introduction of the Hemocultural System BACTEC into the Routine Microbiological Laboratory

Zásady pro vypracování:

Sepse je závažný klinický stav vyvolaný infekčním procesem, který má bez včasné léčby nepříznivou prognózu a může vést k multiorgánovému selhání. Jedním z nejdůležitějších kroků ke stanovení diagnózy sepse je průkaz přítomnosti bakterie v krvi za využití hemokultivačních přístrojů. Cílem bakalářské práce bude zavedení automatizovaného hemokultivačního systému do rutinní mikrobiologické laboratoře. Teoretická část se bude zabývat obecnou bakteriologií a přiblíží problematiku bakterémie a sepse. Dalším bodem práce bude popis procesu hemokultivace a principu fungování hemokultivačních přístrojů. V poslední části se zaměříme na vymezení pojmů analytických metod validace a verifikace a na proces zavedení přístroje do rutinní klinické laboratoře. V praktické části bude využito analytických metod a znalostí hemokultivačního systému BACTEC k měření a získávání dat pro zavedení přístroje do praxe.


Seznam odborné literatury:

- [1] BENEŠ, Jiří, Infekční lékařství, Praha: Galén, c2009, ISBN 978-80-7262-644-1
- [2] VOTAVA, Miloslav a kol., Lékařská mikrobiologie obecná, Neptun, 2005, 352 s., ISBN 80-86850-00-5
- [3] SCHARFNER, Josef, Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii, Nucleus HK, 2013, 236 s., ISBN 978-80-87009-32-1
- [4] ČERMÁK, Pavel, Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště, Maxdorf, 2008, 182 s., ISBN 978-80-7345-142-4

Zadání platné do: 13.09.2019
Vedoucí: prim. MUDr. Filip Prusík
Konzultant: Ing. Alice Michálková



vedoucí katedry / pracoviště



děkan

V Kladně dne 25.10.2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Zavedení hemokultivačního systému BACTEC do rutinní mikrobiologické laboratoře 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 Praze dne 18.05.2018

.....
podpis

Poděkování

Ráda bych tímto způsobem poděkovala svému vedoucí práce MUDr. Filipu Prusíkovi za jeho čas a odborné vedení práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Alici Michálkové za ochotu, vstřícnost a veškerý čas, který mé práci věnovala. V poslední řadě bych chtěla poděkovat mikrobiologické laboratoři nemocnice Královské Vinohrady za možnost zpracování mé praktické části bakalářské práce.

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na zavedení automatizovaného hemokultivačního systému BACTEC do rutinní klinické mikrobiologie. Obecná část popisuje bakteriémii, sepsi a původce septických stavů. V této části je také zahrnuta patofyziologie sepse, komplikace orgánových soustav a terapie sepse.

Dalším tématem obecné části je diagnostika sepse. Je zde uvedena preanalytická fáze, která je zaměřena na přípravu vzorků a jeho následné zpracování. Mezi další témata, kterým se věnujeme v obecné části, jsou hemokultivační systémy, automatizované systémy a verifikace těchto systémů.

V praktické části práce je vyhodnocení výsledků simulace hemokultivace při zavádění automatizovaného hemokultivačního systému. Měření a výsledky jsou poskytnuty Fakultní nemocnicí Královské Vinohrady a všechny preparáty fotograficky zdokumentovány.

Klíčová slova

bakteriémie; hemokultivační systémy; hemokultura; sepsi; verifikace.

Abstract

This thesis focuses on the introduction of BACTEC, an automated hemocultural system, into the routine of clinical microbiology. It consists of several parts. The theoretical part describes bacteremia, sepsis and originator of the septic conditions. It also includes the pathophysiology of sepsis, complications of organ systems, therapy of sepsis and its diagnosis of sepsis.

Further, the theoretical part deals with the diagnosis of sepsis. It presents a pre-analytical phase, which concentrates on sample preparation and its subsequent processing. Hemocultural systems, automated systems and verification of these systems are also briefly dealt with in this section.

The practical part of the thesis evaluates the results of the hemocultivation simulation obtained from the introduction of an automated hemocultural system. The measurements and results are provided by the Faculty Hospital of Královské Vinohrady and all the preparations are documented on the photos attached to this thesis.

Keywords

Bacteremia; hemocultural system; hemoculture; sepsis; verification.

Obsah

1	Úvod	11
2	Současný stav	12
2.1	Bakteriémie a sepse	12
2.1.1	Infekce krevního řečiště (IKR)	12
2.1.2	Sepse	13
2.1.3	Terminologie	13
2.1.4	Patofyziologie sepse a komplikace orgánových soustav.....	14
2.2	Terapie sepse	16
2.3	Etiologie sepse.....	18
2.3.1	Grampozitivní koky	18
2.3.2	Gramnegativní koky.....	20
2.3.3	Anaerobní bakterie	21
2.4	Diagnostika sepse	21
2.4.1	Indikace k odběru biologického materiálu.....	21
2.4.2	Transport a zpracování vzorku	23
2.5	Hemokultivační systémy.....	23
2.5.1	Hemokultivace	24
2.5.2	Podmínky kultivace.....	24
2.5.3	Hemokultivační média.....	25
2.6	Validace a verifikace	25
2.6.1	Verifikace validovaných kvalitativních a semikvantitativních metod 26	
2.6.2	Zdravotnická zařízení	26

3	Cíl práce.....	28
4	Metodika.....	29
4.1	Chemikálie.....	29
4.2	Přístroje a pomůcky.....	29
4.3	Spotřební materiál.....	30
4.4	Biologický materiál.....	30
4.5	Referenční kmeny.....	30
4.6	Kultivační média.....	31
4.7	Použitá hemokultivační média.....	32
4.8	Automatizované hemokultivační systémy.....	35
4.8.1	Princip hemokultivačního systému BD BACTEC.....	35
4.8.2	Princip hemokultivačního systému BacT/Alert 3D.....	37
4.9	Mikroskopie.....	38
4.9.1	Gramovo barvení.....	38
4.9.2	Imerzní mikroskopie.....	39
4.10	Simulace kultivace.....	40
4.10.1	Příprava inokula.....	41
4.11	Pracovní postup.....	42
4.11.1	Postup inokulace do HK lahviček.....	42
4.12	Kontrola pozitivních HK.....	43
4.13	Kontrola negativních HK.....	43
4.14	Kontrola falešně negativních HK.....	43
5	Výsledky.....	44
5.1	Simulace hemokultivace.....	44

5.2	Porovnání TTD.....	44
5.3	Stanovení senzitivity a specificity	46
6	Diskuze	50
7	Závěr	54
8	Seznam použitých zkratk	55
9	Seznam použité literatury	56
10	Seznam použitých obrázků	59
11	Seznamu použitých tabulek	60

1 ÚVOD

Sepse je závažný klinický stav, kdy se jedná o zánětlivou a systémovou reakci těla na infekci. Infekce krevního řečiště může být způsobena jakoukoliv infekcí (např. lokální), která není včas léčena, a může docházet až k rozvoji systémové infekce. Infekce krevního řečiště je rozdělena do několika podskupin, které se zvyšují se závažností sepse.

Tyto podskupiny jsou doprovázeny dalšími klinickými příznaky sepse a mohou být výsledkem dysfunkce nebo poškození některých orgánových soustav. Problematika sepse je dnes velmi častým tématem, jelikož představuje obrovskou zátěž pro zdravotnictví a patří mezi nejčastější nemocniční úmrtí. Nejdůležitějším krokem při sepsi je diagnostika a léčba.

Včasná diagnostika a správně zvolená léčba sepse je v laboratoři klinické mikrobiologie zásadní. Pro diagnostiku sepse a septických stavů je předepsáno hemokultivační vyšetření. Krev je nejsnáze dostupným materiálem, a pokud jsou dodrženy všechny podmínky preanalytické fáze, je materiál k dispozici v dostatečné kvalitě.

V dnešní době jsou v laboratoři klinické mikrobiologie vyšetření (metody), které zajišťují velmi dobrou diagnostiku sepse. Automatizované hemokultivační systémy mají tu výhodu, že u hemokultur je možná hemokultivace více vzorků najednou. Doba detekce je u většiny přístrojů stejná, a to od 24 do 72 hodin.

Tato bakalářská práce seznamuje se zavedením hemokultivačního systému BACTEC a metodami stanovení senzitivity a specifity. Dále popisuje sepsi, diagnostiku sepse a včasnou terapii sepse. V praktické části podává vyhodnocení automatizovaného hemokultivačního systému a zároveň srovnává senzitivitu a specifitu již zavedeného automatizovaného hemokultivačního systému BacT/Alert.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Bakteriémie a sepse

Bakteriémie popisuje přítomnost bakterií v krvi, které nemusí být vždy původcem infekce krevního řečiště [1]. Příčinou mohou být infekce, a to především z ložisek vyskytujících se uvnitř těla, přímé zavedení kontaminovaného materiálu do krve nebo poškození kožního a slizničního povrchu [2]. Bakteriémii lze rozdělit podle počtu přítomnosti bakterie na 1 ml krve nebo dle časového výskytu bakterie v krvi [1].

Podle počtu bakterií v krvi se rozlišuje bakteriémie nízká, střední a vysoká. Nízká bakteriémie vyjadřuje počet 10 – 20 bakterií v 1 ml krve. Střední popisuje počet 50 bakterií a vysoká přes 80 bakterií v 1 ml krve [1]. Na základě časového výskytu bakterií v krvi můžeme rozlišit bakteriémii na přechodnou, intermitentní a kontinuální. Přechodná bakteriémie je definována jako stav krátkodobý při lékařských a chirurgických výkonech. Příkladem může být extrakce zubů nebo defekace. U vzniku intermitentní bakteriémie je stav opakovaný se vznikem abscesu. Kontinuální bakteriémii lze popsat jako infekci, která překonala obranu hostitele [2].

2.1.1 Infekce krevního řečiště (IKR)

IKR je stav, kdy dochází k osídlení mikroorganismů krevního řečiště a je doprovázen zánětlivými změnami infekčního procesu. Dnes bývá pojem infekce krevního řečiště velmi často zaměňován s pojmem sepse, a proto došlo ke vzniku několika podjednotek infekcí krevního řečiště:

- Primární IKR – výsledkem bývá pozitivní hemokultivace, kdy patogen není spojen s jiným infekčním procesem.

- Sekundární IKR – výsledkem bývá opět pozitivní hemokultivace, ale zde je patogen původce infekce v jiném místě.
- Infekční endokarditida – infekce srdečních chlopní, která je predisponována lézí nebo vrozeným defektem. Dochází k poškození endotelu, shlukaci krevních destiček, vysrážení fibrinu a kolonizace bakterií z krevního řečiště.
- Katetrová infekce – infekce doprovázená katetrizací.

Toto rozdělení platí pouze pro bakteriální infekci a vychází z podmínek vyspělých zemí. Nevztahuje se na infekce virového nebo parazitárního původu [1].

2.1.2 Seps

„Pojmem seps bývá označována systémová zánětlivá reakce organismu na přítomnost infekce.“ [3, str. 13]. Ačkoliv se jedná o obranný mechanismus, kdy dochází k zabránění rozšíření infekce, může docházet k rozvoji orgánové dysfunkce a v některých případech až k smrti. V minulosti byly používány termíny (seps, septický šok, septický syndrom a jiné), která udávaly nejasnost rozdělení systémové zánětlivé reakce. V roce 1991 byla zavedena terminologie popisující jednotlivé stavy [3].

2.1.3 Terminologie

Těžká seps – přítomnost seps s orgánovou dysfunkcí, hypotenzí nebo hypoperfuzí [3].

Septický šok - seps s přetrvávající hypotenzí nebo hypoperfuzí navzdory léčebné tekutinové terapii [3].

Sirs – systémová zánětlivá odpověď, doprovázena alespoň dvěma a více příznaky. Například teplota $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $38\text{ }^{\circ}\text{C}$, počet leukocytů < 4 tisíce, tepová frekvence 90/min [4].

Cars – označován jako syndrom kompenzatorní protizánětlivé odpovědi. Dochází k vyplavování protizánětlivých mediátorů, jako následek probíhající SIRS. Pokud u sepsy dochází k převaze SIRS, jedná se o septický šok. Pokud je větší převaha CARS, vzniká nedostatečná protiinfekční obrana [1].

Mars – syndrom střídavé imunitní odpovědi. Střídají se prozánětlivé a zánětlivé fáze. Často bývá doprovázen SIRS a CARS [1].

Mods – dochází k systémovému multiorgánovému selhání, kdy je alterace alespoň dvou a více orgánových systému. Je nutnost co nejdříve zahájit léčbu k udržení homeostázy organismu. Na rozdíl od primární MODS, která je vyvolána neinfekčním útokem (trauma, popáleniny), je sekundární MODS způsobena těžkou sepsí se septickým šokem [1].

2.1.4 Patofyziologie sepsy a komplikace orgánových soustav

- Zánětlivá odpověď

Patogenní mikroorganismy se prostřednictvím přirozené bariéry (sliznice, kůže) dostávají do těla, kde jsou rozpoznávány buňkami imunitního systému, jako jsou dendritické buňky a makrofágy. Ty inaktivují neutrofile a humorální imunitu (komplement a protilátky). Makrofágy a dendritické buňky fagocytují agens, rozštěpí je a ve vazbě na HLA systém je exprimují na svůj povrch. Zpracované peptidy na povrchu imunitních buněk jsou transportovány k lymfatickým uzlinám, kde jsou prezentovány jako buňky adaptivní imunity. Pro systémový zánět je typické překonání této lokální bariéry nebo nadměrná aktivace. Příkladem může být proniknutí agens do krevního řečiště nebo stačí pouze jeho signální molekula.

V důsledku systémového zánětu a zvýšené systémové stimulace může docházet i k orgánovému nebo multiorgánovému selhání [5].

Vlivem nadměrné stimulace mediátorů dochází k poškození mechanismu lokální obrany a rozvoji systémového zánětu. Díky působení látek jako jsou (IL-6, IL-1, IL-12), tumor nekrotizující faktor, volné kyslíkové radikály a oxid dusný se zesiluje imunitní zánětlivá odpověď. Vlivem těchto látek a jejich nadměrné produkci dochází k poškození endotelu a tedy k neprokrvení orgánů a následně i k jejich dysfunkci. Na rozdíl od systémové sepse, kde převládá prozánětlivé odpověď, se v ložisku infekce vytvářejí protizánětlivé mediátory, z nichž nejznámějšími jsou kortizol a IL-10. Tyto látky rapidně snižují imunitní obrannou odpověď a zvyšují apoptózu [5].

- Postižení orgánové soustavy

K ovlivnění endokrinního systému při septickém stavu dochází vlivem nadměrné stimulace cytokinů, které aktivují hypothalamo-hypofyzární systém. Následkem této aktivity se zvyšuje sekrece kortizolu, kdy jeho hladina v plazmě způsobuje sepsi až septický šok. Na druhé straně zvýšená produkce endogenních katecholaminů způsobuje současně snížení senzitivity receptorů pro katecholamin a to vede k poklesu cévního napětí. Vznikem sepse nastává i vysoká hladina glykémie, při současné inzulinorezistenci. Tento jev má za následek vznik hypoglykémie, kdy nastává prokoagulační účinek a díky tomu dochází k ovlivnění fagocytózy a apoptózy [5].

Nepoměr mezi ventilací a perfúzí plic se sníženou hladinou koncentrace arteriálního kyslíku je při septickém onemocnění velmi častou kardiopulmonální komplikací. Zvýšená propustnost membrány alveolárních kapilár vede k zvětšení objemu vody v plicích, což se kříží s výměnou kyslíku. V mnoha případech je septický šok doprovázen syndromem akutní dechové tísně [5].

Renální komplikace při sepsi způsobuje renální selhání. Akutní tubulární nekróza nastává při poškození endotelu kapilár nebo při hypotenzní krevního oběhu. Běžně se setkáváme s klinickými příznaky, jako jsou oligurie, proteinurie a mikroskopický nález válců v močovém sedimentu [5].

V ostatních patofyziologických komplikacích sepse může docházet i k neurologickým a svalovým potížím. V mnoho případech při akutní sepsi nastává edém a perfúze mozku a vzniká tak septická encefalopatie. Při sepsi je také výrazný úbytek svalové hmoty, který je způsoben katabolismem proteinů, jako následek prozánětlivých mediátorů [5].

2.2 Terapie sepse

„Sepse má vysokou míru úmrtnosti. Přibližně 30 % přijatých pacientů na JIP zemře. Úmrtnost pacientů se zvyšuje se závažností sepse, což demonstruje důležitost včasné diagnózy a správné léčby.“ [4, str. 4].

V současné době mnoho lékařů využívá ke správné diagnostice sepse stanovení biomarkerů především v časných a nejasných případech. Nejčastějšími biomarkery v laboratoři, v nemocnicích i ordinacích lékaře jsou C-reaktivní protein (CRP), prokalcitonin a IL-6. Biomarkery mohou indikovat přítomnost sepse, odlišit lokální a systémovou sepsi a odlišit bakteriálního, virového nebo plísňového původce sepse. Terapie sepse může být rozsáhlá, od imunologické terapie přes antibiotickou. I přesto, že jde zahájit okamžitou terapii ATB u septických stavů, je třeba přesná diagnóza, kvůli zbytečnému podávání antibiotik [4].

Imunologická terapie využívá podání řady farmak, která jsou schopna modulovat zánětlivou reakci organismu. Všechna farmaka nemohou být vždy podána, je třeba určit, o jaký druh sepse (infekce) se jedná, a dané farmakum použít. Mezi doporučené protizánětlivé látky patří kortikosteroidy, které se podávají po

3 dnech v nízkých dávkách a po delší dobu od propuknutí těžké sepse nebo septického šoku. Dalšími protizánětlivými léky mohou být ibuprofen, prostaglandiny a pentoxifyllin [6].

Látky ovlivňující koagulační systém jsou další součástí imunoterapie. Protizánětlivé cytokiny (Tumor nekrotizující faktor, IL-2, IL-6) stimuluje koagulační kaskádu tkáňového faktoru. Cytokiny vedou k poklesu antitrombinu 3 a proteinu C, které aktivují koagulační faktory, a proto užívání antitrombinu 3 je dnes v terapii sepse velmi důležité. Dalšími látkami ovlivňující imunitní reakci jsou intravenózní imunoglobuliny, kdy jejich použití je velmi rozsáhlé (léčba dětí i dospělých). Poslední možností imunologické terapie je léčba antimikrobiálními látkami, jakou jsou polymyxin B, ketokonazol a taurolidin [6].

Antibiotická terapie je nejúčinnější terapie v léčbě sepse. Je třeba při výběru antibiotik upřednostňovat baktericidní přípravky a volit léky s nejrychlejším nástupem poškození buněčné membrány bakterie. Na základě několika hlavních mechanismů se rozdělují ATB vhodná k terapii sepse do několika skupin [3].

1. Skupina – peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, aminoglykosidy, vankomycin, daptomycin a kolistin. Poškození buněčné stěny a buněčné membrány, velmi rychlé a účinné usmrcení bakterií. Omezený průnik do hůře prokrvených tkání, ale velmi vhodné k léčbě.
2. Skupina - fluorchinolony a firampicin. Poškození DNA buňky nebo zablokování její funkce. Dobré usmrcení a poškození bakterie, dostatečný průnik do hůře prokrvených tkání, ale nespolehlivé v léčbě sepse.
3. Skupina - makrolidy, linkosamidy, cotrimaxazol, tetracykliny a sulfonamidy. V buňce dochází k inhibici proteosyntézy, špatné usmrcení bakterie, pouze bakteriostatický efekt. Opět dobrý průnik do hůře prokrvených tkání, ale léčba není vhodná.

Pro těžké sepse a septického šoku na základě GRADE systému se používá iniciální resuscitace, antimikrobiální terapie, vazopresory, inotropika, steroidy a podávání krevních derivátů [3].

2.3 Etiologie sepse

V posledních 50 letech lze pozorovat změnu výskytu sepsí. To je dáno začátkem 30. let minulého století v souvislosti s užíváním sulfonamidu a dalších antibiotik. Pokles je pozorován především u streptokoků ze skupiny A, pneumokoků a zlatých stafylokoků. Naopak vzestup bakterií lze sledovat u gramnegativních bakterií a s nástupem antibiotické léčby i nárůst streptokoků ze skupiny D. Před vznikem antibiotické léčby byla více než polovina sepsí těchto původců (streptokoky A a pneumokoky) smrtelná. Po několika letech nástupu antibiotik bylo možné pozorovat pokles těchto bakterií, ale byl pozorován nárůst gramnegativních bakterií především (enterobakterie), pseudomonád a kvasinek [7].

Příčinou snížení grampozitivních bakterií je nástup antibiotické léčby a neměnná citlivost těchto bakterií na penicilin řady G. Problematika vzestupu gramnegativních bakterií je přiřazována selektivnímu přemnožení a rezistenci, jejichž důvodem je například těžká nemoc nebo nezralost novorozence [7].

2.3.1 Grampozitivní koky

Do grampozitivních bakterií lze zařadit několik rodů: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* a *Enterococcus*. Rod *Staphylococcus* je možné rozdělit do dvou základních skupin: koaguláza pozitivní a koaguláza negativní. Schopnost koagulace plazmy je výsledkem přítomnosti proteinu plazmakoagulázy s enzymatickou aktivitou, kdy se mění fibrinogen na pevný fibrin [8].

- *Staphylococcus aureus* - koaguláza pozitivní staphylococcus. Poměrně dobře rezistentní k zevnímu prostředí. *Staphylococcus* žije v blízkém

komensalismu na kůži nebo sliznici. Při jakékoliv poruše přirozené odolnosti proniká do tkání a vyvolává hnisavé záněty, záněty vnitřních orgánů až sepse. Charakteristickým rysem zánětu je absces. Krví se může *Staphylococcus* projevit jako stafylokoková endokarditida, kdy se na srdečních chlopních objevují tzv. vegetace, které jsou schopny uvolňovat stafylokoky a roznášet je po těle [8].

- *Staphylococcus epidermidis* – koaguláza negativní staphylococcus. Běžně se nachází jako součást lidské mikroflóry. Pouze vzácně mohou vyvolat infekci u normálního hostitele. Ve většině případů se jedná o intravenózní narkomany, imunokompromitované jedince (nezralé novorozence s opsonofagocytárním systémem nebo neutropenií) a osoby se zavedenými implantovanými pomůckami. *Staphylococcus epidermidis* způsobuje infekce krevního řečiště, endokarditidy a infekce močového traktu v souvislosti s používáním katetrů [8].
- *Streptococcus pyogenes* – beta-hemolytický streptokok. Je příčinou hnisavých infekcí. Nejběžnějším onemocněním je akutní tonsilofaryngitida tzv. angína. Pokud kmen produkuje pyrogenní exotoxiny, jedná se o spálovou angínu. Dalšími onemocněními jsou nekrotizující fasciitidy, phlegmóna či meningitidy. Typickým hnisavým a toxickým onemocněním jsou pozdní následky těchto nálezů, mezi které lze zařadit revmatickou horečku nebo akutní glomerulonefritidu [8].
- Streptokoky skupiny B – beta-hemolytické bakterie. Souhrnně se velmi často označují tzv. GBS (group B streptococci, jelikož zařazují několik typů streptokoků vyvolávajících onemocnění jak u zvířat, tak u lidí). Nejběžnějším zástupcem je *Streptococcus agalactiae*. Největší kolonizace bakterií se nachází v oblasti střev a vagíny. Jsou původci novorozeneckých meningitid, sepsí, osteomyelitid a cystitid [8].

- Enterokoky – nejběžnější zástupci enterokoků jsou (*Enterococcus faecalis*, *enterococcus durans*) a neenterokoky (*Streptococcus bovis* a *Streptococcus suis*). Původci nosokominálních nákaz, endokarditid a střevních nádorů [8].
- Pneumokoky – non-beta-hemolytické streptococcy. Jediným zástupcem je *Streptococcus pneumoniae*, jako hlavní původce zánětu plic. Jsou přítomny v nosohltanu a mohou postihnout zánět vedlejších dutin nosních až zánět středního ucha. Dále jsou příčinou purulentní meningitidy u osob nad 60 let a u lidí, kde se začalo očkovat proti *Haemophilus influenzae* typu b [8].

2.3.2 Gramnegativní koky

Ke gramnegativním bakteriím můžeme zařadit čeleď *Enterobacteriaceae*. Morfologicky se jedná o gramnegativní tyčinky a bakterie důležitého významu pro člověka. Důležitost gramnegativních bakterií v oblasti sepse silně závisí na několika faktorech (např. vstupní brána infekce nebo primární ložisko bakteriémie) [7].

- *Escherichia coli* – se dnes běžně vyskytuje jako součást střevní mikroflóry zdravých lidí a rozděluje se na několik kmenů. Kmeny EPEC (enteropatogenní, dyspeptická *E. coli*) způsobují nejčastější bakteriální příčinu průjmu v rozvojových zemích a kmeny EIEC (enteroinvazivní *E. coli*) způsobují krvácivé průjmy. Nejzávažnější onemocnění (hemolyticko – uremický syndrom) způsobují kmeny STEC tzv. (shigela – toxigenní) [8].
- *Klebsiella pneumoniae* – je fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie. Z nemocničního prostředí se nejčastěji dostává do tělních dutin, kde se stává patogenem nosokominálních nákaz. Nejběžnějším druhem rodu *Klebsiella* je *Klebsiella pneumoniae*. Ta je nejběžnějším původcem uroinfekcí a infekcí dýchacích cest [8].

Ostatní gramnegativní bakterie způsobující sepsi: rod *Proteus*, salmonely a *Enterobacter* [8].

2.3.3 Anaerobní bakterie

Tzv. grampozitivní nesporulující anaerobní tyčinky zahrnují rod *Eubacterium*, *Actinomyces* a grampozitivní sporulující tyčinky rodu *Clostridium*, z nichž nejznámějším patogenem je *Clostridium perfringens*. Jeho toxiny jsou schopné vyvolat nekrotizující infekci měkkých tkání a jsou nejčastější původce plynaté sněti. Na základě určitého toxinu lze rozdělit *Clostridium* na několik typů: A, B a C [9].

2.4 Diagnostika sepse

Klinická diagnostika sepse je velmi obtížná a je třeba velmi dobře umět rozpoznat lokální infekci od infekce systémové. Pro sepsi je ve většině případů typická intermitentní horečka a další klinické příznaky: tachykardie, poruchy vědomí, hyperventilace až septický šok [7].

Nezákladnějšími vyšetřovacími metodami stanovení klinické sepse jsou biochemická a hematologická vyšetření včetně mikrobiologického vyšetření (hemokultivace). Na základě stanovení biomarkerů (prokalcitonin, IL-6 a dalších) je možnost zahájení včasné léčby [4].

2.4.1 Indikace k odběru biologického materiálu

Odběr hemokultur na vyšetření sepse je vždy indikován lékařem, a to v případě podezření na bakteriémii, která se může projevovat v několika formách. Prvním typem bakteriémie je klasická sepsi, kdy probíhá putování bakterií do krevního řečiště a často ji doprovází klinické příznaky. Druhým typem bakteriémie je vznik sepse na základě probíhající těžkého infekčního onemocnění, jako jsou například meningitidy nebo pneumonie [7].

Dalším typem může být bakteriémie způsobena lokální infekcí například intravaskulární, kdy je infekce doprovázena mírnými klinickými příznaky. Posledním typem je bakteriémie, kdy dochází k velkému pronikání bakterií do krevního oběhu například u katetrizace infikovaného močového traktu nebo z kontaminovaných zdrojů [7].

- **Odběr vzorku**

Pro správný odběr vzorku je potřeba nejdříve zvolit optimální čas odběru. Ten by měl být proveden co nejrychleji, aby mohla být nasazena antibiotická léčba. Důležitou součástí odběru materiálu je určit vhodnou metodu odběru. Odběr krve na hemokultivaci musí být vždy proveden samostatně. To znamená, že pokud by se měla z jedné venepunkce stanovovat i jiná vyšetření (např. krevní plyny), odběr na hemokultivaci musí být proveden dříve, aby se zabránilo kontaminaci vzorku. Odběr krve se provádí z periferní žíly a je rovnoměrně rozdělen do hemokultivačních lahviček [10].

Důležitým bodem v odběru vzorku je desinfekce. Je třeba vybrat nejvhodnější desinfekci, a to jak na kůži pacienta, tak na septum hemokultivačních lahviček. Desinfekce kůže pacienta by měla být prováděna roztokem (2% chlorhexidinu v 70% isopropyl alkoholu), kdy se nanáší tampónem na povrch kůže a nechá se zaschnout. Toto stejné pravidlo platí i u zátek lahviček, které se desinfikují ethanolem (nebo jinými alkoholy) a opět se volně nechají zaschnout. Správný výběr desinfekce na zátku lahviček je však velmi důležitým bodem odběru materiálu. Desinfekční prostředky s obsahem jódu jsou totiž nevhodné a mohou způsobit poškození integrity gumového septa [10].

Množství a počet vzorků je v mikrobiologickém vyšetření hemokultur zcela zásadní. Je třeba si uvědomit, zda odebíráme krev dospělého člověka nebo dítěte. U dospělého jedince se odebírají jedna nebo více lahviček, kdy celkový odebraný objem by měl být kolem 30 ml. U dětí se odebírá jedna lahvička na hemokulturu a je

třeba rozlišit novorozence, kojence a děti do 13 let, kdy je přesně stanoven počet ml krve pro danou skupinu. Objem krve při odběru novorozence je 1 - 2 ml krve, 2 – 3 ml krve u kojenců a 3 – 5 ml krve u dětí do 13 let. Důležitostí jakéhokoliv odběru je kontrola žádanky a lahvičky se všemi údaji pacienta [10].

2.4.2 Transport a zpracování vzorku

Po odběru materiálu by měl být vzorek co nejdříve dopraven do laboratoře, kde se vkládá do automatizovaného systému. Pokud by byl transport zpožděn nebo by bylo opožděno vkládání lahvičky do systému, je třeba lahvičky inkubovat. Inkubace lahviček závisí na doporučené teplotě výrobcem. V případě opožděného dodání hemokultur do laboratoře by měly být lahvičky inkubovány při pokojové teplotě nebo inkubovány v termostatu při 37 °C. Hemokultivační lahvičky by nikdy neměly být uskladňovány v lednici a pokud se před vložením do systému objeví známky nárůstu, je třeba hemokulturu ihned vyočkovat [2].

Zpracování vzorku se provádí ihned po příjmu materiálu. Vzorek je umístěn do automatizovaného systému zhruba na 5-7 dní. V případě pozitivního nálezu se provádí kultivační vyšetření a mikroskopie, kdy se odebere několik kapek krve, které se nanesou na sklíčko a pomocí Gramova barvení se vytvoří preparát. Obarvený preparát se dále pozoruje pod optickým mikroskopem a diagnostikuje se přítomný mikroorganismus. Ihned po diagnostice se provádí vyšetření citlivosti ATB, které je v danou chvíli nejzásadnější [2].

2.5 Hemokultivační systémy

Hemokultivační systémy jsou systémy sloužící k detekci nárůstu bakterií v hemokultuře po jejich kultivaci. Aby mohlo docházet k detekci bakterií, (makroskopické jevy: např. zákal, kolonie) je třeba vysokého nárůstu bakterií. V dnešní době je známo několik hemokultivačních systému a odlišují se např. ve stupni automatizace nebo jiném způsobu kultivace [1].

2.5.1 Hemokultivace

Vyšetření samotné krve je dnes nejpoužívanější diagnostickou metodou sepsí. Způsob kultivace krve prodělal vysoký historický vývoj od kultivace krevního koláče, kultivace krve na tuhých půdách, lýze – centrifugační kultivace až po dnešní kultivaci krve v automatizovaném systému. Tento typ kultivace krve je nejběžnější metodou, ale je ovlivněn několika negativními faktory:

- Koagulační faktory krve (je třeba zabránit srážení)
- Koncentrací inokula. Množství bakterií v krvi bývá velmi malé, proto je potřeba velkého množství krve
- Antimikrobiální vlivy
- Vysoké spektrum patogenů (neexistuje přesná kultivační půda)
- Možnost kontaminace krve při odběru [1].

2.5.2 Podmínky kultivace

Aby mohlo docházet ke správné kultivaci krve, je třeba dodržet několik základních podmínek kultivace:

- Odběr- popsán v kapitole diagnostika sepse.
- Média - dnes je mnoho typů medií, které se rozlišují různými objemy půd, atmosférou, antikoagulanty a jinými specifiky.
- Poměr krve a bujónu – kvůli zamezení vzniku antibakteriálního efektu je třeba dodržet poměr média a krve (1:15). Jiné poměry (1:5 nebo 1:10) lze použít u anaerobních koků přidáním 0,5% SPS. Ten inhibuje vznik komplementu u imunitních reakcí humorální imunity.

- Inkubační čas a teplota - používaná teplota automatizovaným systémem se pohybuje kolem 35-37 °C po dobu 5-7 dní. U některých specifických, citlivých patogenů je možnost kultivaci prodloužit [2].

2.5.3 Hemokultivační média

Obvykle se používají média s aerobním, anaerobním nebo speciálním prostředím a další média se specifickým složením. Jedním z používaných médií pro hemokultivaci je Oxoid Signal Systém složený z tryptosojeového bujónu, želatinového peptonu, kvasničného a masového extraktu, cysteinu, SPS, KNO₃ a dalších látek, umožňující růst aerobů, anaerobů a mikroaerofilů. [10]. Další typ hemokultivačních médií je uveden v kapitole použitá hemokultivační média.

2.6 Validace a verifikace

"Validace analytické metody slouží k posouzení a dokumentaci kvality analytického postupu, a to stanovením požadavků na kritéria metody jako je přesnost, správnost, linearita, mez detekce, a podobně, a měřením reálných hodnot těchto kritérií" [11].

Validace analytických metod se provádí u nestandardních metod, in-house metod (vyvinuté v laboratoři), pozměněných metod, popř. u metod, u kterých jejich použití překročilo zamýšlený rozsah [11].

Verifikace je potvrzení, že daná položka splňuje veškeré specifikované požadavky. V klinické laboratoři to jsou především požadavky na měřicí systém, kde je třeba nutno prověřit dosažení funkčních vlastností měřicího systému a potvrdit, že data o analytických znacích (ať už potvrzena referenční institucí nebo jinou laboratoří) jsou dosažena [12].

V obou případech je potřeba u těchto zkoušek vést záznam ve formě verifikačního protokolu. [12].

Mikrobiologická vyšetření nejsou standardizována, jelikož je biologický materiál pro mikrobiologii často nestabilní a nehomogenní, proto není důvod zajišťovat opakovatelnost vyšetření. I přesto, že mikrobiologický výsledek je číselně vyjádřen, jedná se pouze o semikvantitativní nález a je třeba slovní hodnocení nálezu. Z tohoto důvodu je kladen menší důraz na kontroly v mikrobiologické laboratoři, ale větší důraz na interpretaci výsledků. Validace i verifikace podléhá dokumentaci SOP [13].

2.6.1 Verifikace validovaných kvalitativních a semikvantitativních metod

Jedná se o IVD metodu s označením „CE“. IVD označení popisuje diagnostiku ve skle tzv. In vitro diagnostikum a označení CE potvrzuje, že je metoda certifikovaná. Požadavky v oblasti validace jsou u IVD CE metod nižší než u kvantitativních metod. Na rozdíl od kvalitativní metody, kde je jediným požadavkem dodržení pracovních postupů, je u semikvantitativní metody verifikace zajištěna stanovením senzitivity a specifity. V obou případech je potřeba u těchto zkoušek vést záznam ve formě verifikačního protokolu [12].

2.6.2 Zdravotnická zařízení

Zacházení se zařízením v laboratoři vychází z normy zdravotnické laboratoře ČSN EN 15189 o zvláštních požadavcích na kvalitu a způsobilost [12].

Pro tuto normu obecně platí několik zásad. Každá laboratoř musí mít zdokumentován postup pro výběr, nákup a zacházení se zařízením [12].

„Laboratoř musí ověřit po instalaci a před použitím, že dané zařízení je schopné dosáhnout požadovanou výkonnost a že vyhovuje požadavkům příslušných laboratorních vyšetření“ [12, str. 23].

„Zařízení smí vždy obsluhovat jen zaškolení a oprávnění pracovníci. Aktuální návody k použití, instrukce o bezpečnosti a údržbě zařízení včetně příslušných příruček a směrníc k použití dodaných výrobcem zařízení musí být snadno dostupné“ [12, str. 23].

Dále musí být zdokumentován postup kalibrace zařízení, a to v případě, pokud má vyšetření přímý a nepřímý vliv na výsledek. To je zajištěno záznamem o metrologické návaznosti a ověřením požadované přesnosti měření. V neposlední řadě je nutné, aby laboratoř vedla program preventivní údržby a vedla o zařízení záznamy [12].

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem teoretické části bakalářské práce je poskytnout informace o problematice bakteriémie a septických stavů. Dále se práce zabývá diagnostikou sepse, hemokultivace a hemokultivačními systémy.

Hlavní cíl praktické části práce je zaměřen na zavedení automatizovaného hemokultivačního systému BACTEC do rutinní mikrobiologické laboratoře. Hlavního cíle dosáhneme přípravou ředěných suspenzí z referenčních kmenů. Tyto suspenze se za sterilních podmínek aplikují do určitých hemokultivačních lahviček, a to do nového přístroje BACTEC a pro srovnání i do stálého přístroje BacT/Alert. Do všech lahviček je přidána dárcovská krev o určitém objemu. Pro negativní kontrolu je přidána pouze dárcovská krev bez suspenze mikroorganismů. Všechny lahvičky se umístí do přístrojů a do 72 hodin se provádí vyhodnocení.

Cílem této práce je dosáhnout u všech pozitivních lahviček pozitivitu a u všech negativních lahviček negativitu. Specifická a senzitivita metody by měla být 100%. Praktická část probíhá ve spolupráci s mikrobiologickou laboratoří Ústavu laboratorní diagnostiky nemocnice Královské Vinohrady.

4 METODIKA

4.1 Chemikálie

- Aceton – Penta, Česká republika
- Automatické pipety - Eppendorf Czech & Slovakia, Česká republika
- Cutasept F (desinfekce na hemokultury) – Hartmann-Rico, Česká republika
- Fyziologický roztok – Viamar International, Česká republika
- Gram Nowy (krystalová violeť) – Penta, Česká republika
- Imerzní olej – Olympus Europe SE & Co. KG – Německo
- Karbofuchsin – Penta, Česká republika
- Lugolův roztok – Lach-ner, Česká republika
- Methylalkohol – Penta, Česká republika

4.2 Přístroje a pomůcky

- Anaerobní vzduchotěsný box Concept 400– Ruskin Technology LTD – UK
- BacT/Alert 3D – Biomérieux, Česká Republika
- BACTEC FX TOP – Becton Dickinson, USA
- BACTEC FX 40 - Becton Dickinson, USA
- Digitální fotoaparát OMD E M1 Mark II – Olympus Czech Group, Česká republika
- Hlubokomrazicí box ULTF (-40°C až -80°C) – Trigon Plus, Česká republika
- Chladnička LcV 4010 – Liebherr, Německo
- Inkubátor CO2 – Esco, Singapore
- Mikroskop Olympus BX 41 – Olympus Czech Group, Česká republika
- Stojan na zkumavky, hliníkový – Maneko, Česká republika
- Vortex V1 Plus – Biosan, Litva

4.3 Spotřební materiál

- Buničina (čtverce)
- Mikroskopické sklíčko
- Nádobá na infekční materiál
- Nádobá na infekční materiál (ostré předměty)
- Jednorázové sterilní očkovací kličky kalibrované na objem 10 μ l
- Plastové zkumavky
- Sterilní injekční jehla
- Sterilní injekční stříkačka
- Vatové tampóny

4.4 Biologický materiál

Pro pokus byl použit transfúzní přípravek z transfúzního oddělení nemocnice Královské Vinohrady. Pro měření byla použita plná krev krevní skupiny A Rh-.

4.5 Referenční kmeny

V rámci verifikace byla stanovena senzitivita a specificita, pro kterou byly použity 4 referenční kmeny. Výrobce referenčních kmenů doporučuje tyto kmeny pro testování. Referenční kmeny jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka 1- Referenční kmeny

Sbírka	Kmen	Kultivační podmínky (půda/prostředí/teplota/čas)	Číslo šarže	Expirace m/rok
CCM 4435	<i>Clostridium perfringens</i>	SCH, anaerobně, 37°C, 48 hod.	2405201220473	5/20
CCM 3954	<i>Escherichia coli</i>	MCV, aerobně, 37°C, 24 hod.	2304201421732	4/24
CCM 3953	<i>Staphylococcus aureus</i>	CSB, aerobně, 37°C, 24 hod.	1008200614134	8/21
CCM 4502	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CSB, aerobně se zvýšenou tenzí CO ₂ , 57°C, 24-48 hod.	1903200516088	3/22

4.6 Kultivační média

V praktické části bakalářské práce byla použita kultivační média firmy Bio-rad.

Mac Conkey + Crystalová violet

Selektivní médium sloužící k izolaci a stanovení počtu bakterií řádu Enterobacteriaceae, zejména pro izolaci Salmonella, Shigella a enteropatogenních Escherichia coli. Selektivita tohoto média je daná kombinací účinku žlučových solí a krystalové violeti [14].

Složení základní půdy [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]: Bakteriologické peptony (20), žlučové soli (1,5), chlorid sodný (5), laktóza (10), neutrální červeň (0,003), krystalová violet (0,001) a agar (13,5) [14].

Scheadler + Vitamín K3

Médium sloužící k izolaci anaerobních bakterií endogenní flóry nebo anaerobních bakterií z půd, které jsou schopny se transformovat na patogeny a vyvolat vážně infekce. Toto médium je obohaceno o růstové faktory např. hemin nebo redukující látky jakou jsou cystein a glukóza a toto složení dává médiu vlastnost dokonale se přizpůsobit pro růst anaerobních bakterií včetně náročných druhů [15].

Složení základní půdy [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]: Trypto-kasein-sója bujón (10), speciální bujón (5), kvasničný extrakt (5), tris pufr (3), cystein hydrochlorid (0,4), hemin (0,01), glukóza (15) a agar (15) [15].

Columbia agar \pm 5 % ovčí krev

Izolační médium, které se používá k primokultivaci nebo subkultivaci pro všechny typy vzorků. Přítomnost krve umožňuje prokázat hemolytickou reakci určitých kmenů bakterií. Pro růst bakterií na tomto médiu je důležitá přítomnost živin z dodaných peptonů a krve [16].

Složení základní půdy [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]: Peptony (18), škrob (1), kvasničný extrakt (5), chlorid sodný (5) a agar (10). Médium je doplněno 5% ovčí krve [16].

4.7 Použitá hemokultivační média

Pro kultivaci bakterií v přístroji BD BACTEC FX a BD BACTEC FX 40 byly použity 2 druhy hemokultivačních lahviček: BD BACTEC Plus Aerobic/F, BD BACTEC Lytic/ Anaerobic/F firmy Becton and Dickinson a v přístroji BacT/Alert 3D

byly použity lahvičky BacT/Alert SA Standard Aerobic a BacT/Alert SN Standard Anaerobic. Díky nerozbitné plastové lahvičce je u všech těchto medií zajištěna maximální bezpečnost bez odpadu.

BD BACTEC Plus Aerobic/F

Hemokultivační lahvička je značena modrým víčkem. Toto médium se používá pro kvalitativní stanovení aerobních mikroorganismů a jejich následnou izolaci z krve. Pro kultivaci a průkaz aerobních mikroorganismů je použit fluorescenční přístroj firmy BD BACTEC. Všechny média BACTEC jsou sycena oxidem uhličitým. V kulturách je vytvořen podtlak, který umožňuje nasátí 5 - 10 ml krve [17].

Testovaný vzorek se přenesení do jedné nebo více lahviček, které se vloží do fluorescenčního přístroje BD BACTEC za účelem inkubace a pravidelného odečtu. Lahvička obsahuje chemické činidlo, které detekuje zvýšení množství CO₂ vyprodukovaného růstem mikroorganismů. Kromě detekce CO₂ je i možnost pozitivní výsledek odlišit od negativního výsledku na základě zbarvení hemokultivační lahvičky, kdy se pozitivita projeví čokoládovým zbarvením krve a vypouklým víčkem [17].

Složení média [hmotnost/objem]: destilovaná voda (30 ml), živná půda s výtažkem sójového kaseinu (3,0 %), kvasničný extrakt (0,25 %), aminokyseliny (0,05 %), sps (0,05 %), vitamíny (0,025 %), antioxidanty (0,005 %), neionická adsorpční pryskyřice (16,0 %) a kation aktivní výměna pryskyřice (1,0 %) [17].

BD BACTEC Lytic/ Anaerobic/F

Hemokultivační lahvička značena žlutým víčkem. Toto médium (obohacená živná půda s výtažkem sójového kaseinu a oxidu uhličitého) slouží k izolaci

anaerobních mikroorganismů z krve pomocí fluorescenčního přístroje BD BACTEC. V nádobce je vytvořen podtlak, umožňující nasátí krve o objemu 5 - 10 ml [18].

Testovaný vzorek se přenese do jedné nebo více lahvíček, které se vloží do fluorescenčního přístroje BD BACTEC za účelem inkubace a pravidelného odečtu. Lahvička obsahuje chemické činidlo, které detekuje zvýšení množství CO₂ vyprodukovaného růstem mikroorganismů. Na rozdíl od hemokultivačního média BD BACTEC Plus Aerobic/F, kde lze pozitivitu prokázat i zbarvením média, je u tohoto typu média neprokazatelným znakem. Pozitivní výsledek je dán určitou hladinou CO₂, které detekuje fluorescenční přístroj BD BACTEC. Pozitivní kultura je dále určena k subkultivaci nebo histologickému barvení [18].

Složení média [hmotnost/objem]: destilovaná voda (40 ml), živná půda s výtažkem sójového kaseinu (2,75 %), kvasničný extrakt (0,2 %), natrávenina zvířecí tkáně (0,05 %), dextróza (0, 2 %), hemin (0,0005 %), manadion (0,00005 %), citrát sodný (0, 02 %), thioly (0,1 %), pyruvát sodný (0,1 %), saponin (0,26 %), činidlo pro zpěnění (0,01 %) a sps (0,035 %). Všechna anaerobní média jsou redukována a sycena CO₂ a N₂ [18].

Hemokultivační lahvičky přístroje BD BACTEC se uchovávají na suchém místě bez dosahu přímého záření a to při 2 – 25 °C [18].

BacT/Alert SA Standard Aerobic

Hemokultivační nádobka je značena modrým víčkem. Použití tohoto média slouží k detekci aerobních mikroorganismů ve vzorcích krve a jiných tělních tekutin. Tato média využívají kolorimetrickou detekci, kdy speciální senzory na bázi tekutých emulzí ve spodní části každé lahvičky změni barvu při každé změně pH v důsledku zvýšené produkce CO₂ z mikroorganismů a dávají tak přesnost pozitivního výsledku. Tato schopnost zamezí výskytu falešně negativních výsledků [19].

Médium obsahuje pankreaticky natrávený kasein, papainem natrávený sójový substrát, sps, pyridoxin chlorid a dalších komplexních substrátů obsahujících aminokyseliny a cukry v purifikované vodě o celkovém složení 40 ml [19].

BacT/Alert SN Standard Anaerobic

Nádobka je značena růžovým víčkem. Tento typ média slouží k detekci anaerobních mikroorganismů, které vyžadují náročnější podmínky. Detekce je opět jako u média BacT/Alert SA zajištěna kolorimetrickou metodou, kdy za pomoci speciálních senzorů dochází ke změně barvy kultur na spodní části lahvičky [20].

Médium obsahuje pankreaticky natrávený kasein, papainem natrávený sójový substrát, sps, menadion, hemin, redukující činidla a další komplexní substrát v podobě aminokyselin a cukrů v purifikované vodě o celkovém objemu média 40 ml [20].

4.8 Automatizované hemokultivační systémy

4.8.1 Princip hemokultivačního systému BD BACTEC

Přístroj BD BACTEC FX je automatizovaný systém detekující přítomnost mikroorganismů ve vzorcích. Naočkované lahvičky se umístí do jedné ze zásuvek přístroje, Přístroj BD BACTEC FX TOP umožňuje umístit lahvičky o celkové kapacitě 200 vzorků a přístroj BD BACTEC FX 40 o celkové kapacitě 40 vzorků. Hemokultivační lahvičky jsou umístěny do jednotlivých vložek a umožňují současně inkubaci, protřepání i monitoring. Po uzavření zásuvky dochází k pravidelnému monitoringu mikrobiální aktivity hemokultur, která je způsobena přítomností speciálně navrženého čidla, který měří hladinu fluorescence. Na dně lahvičky je senzitivní vrstva, která odděluje médium membránou a dochází tak k propouštění CO₂. Senzitivní vrstva společně s CO₂ vytváří kyselinu uhličitou, a díky tomu dojde k poklesu pH hemokultur. Inkubační systém přístroje a jednotlivé

inkubační zóny zásuvek jsou navrženy na teplotu $35\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$. To je zajištěno neustálým prouděním vzduchu kolem hemokultivačních lahvíček [21].

Každých 10 min je pomocí laseru vyzářen světelný paprsek určité vlnové délky. V momentě záření paprsku dochází k aktivaci senzitivní vrstvy a vyzáření světla. Kvalita a množství vyzářeného světla je ovlivněna hodnotou pH. Toto měření provádí měřicí subsystém. Algoritmový subsystém analyzuje signály z měřicího subsystému a určuje přítomnost mikrobiálního růstu [21].

Veškerá data jsou přenesena do informačního nemocničního systému a uživatelského programu přístroje. Subsystém zaopatřuje spojení s přístrojem, a to především vkládání hemokultur a následné vyjmutí pozitivních nebo negativních lahvíček. Umožňuje vkládat pomocí dotykové obrazovky demografické informace týkající se pacientů nebo vkládat inkubační čas kultivace pro každou jednotlivou lahvíčku. Vkládání hemokultur je zajištěno naskenováním čárového kódu, který je umístěn na správně označené hemokultuře, a to pomocí čtecího zařízení zabudovaného v přístroji nebo lze čárový kód zapsat ručně do obrazovky přístroje. Přístroj má dvě základní konfigurace (samostatnou a spojitou). Spojitá konfigurace je složená z horního a dolního přístroje. U více přístrojů, ať už samostatných nebo spojitých lze přístroje vzájemně propojit se systémem BD Epicentrum a umožnit tak rychlejší propojení mezi stanicemi. Systém Epicentrum dále zaznamenává chybové hlášení obou přístrojů a jejich zaplněnost včetně pozitivních a negativních hemokultur [21].

Přístroj umožňuje optickou a zvukovou zpětnou vazbu při monitorování hemokultur. V průběhu měření a při negativních výsledcích je přístroj vizuálně odlišný. Zásuvková stanice a jednotlivé vložky pro hemokultury, včetně úchytek zásuvek, mohou svítit zelenou, červenou nebo žlutou barvou, buď samostatně, najednou nebo v kombinaci. Zeleně svítí v případě přítomnosti negativně vyhodnocených hemokultivací. Žlutě svítí v případě chybového hlášení nebo

přítomnosti anonymní hemokultury (špatně identifikovaná hemokultura při příjmu, nepřechtení čárového kódu apod). Červeně svítí v případě, je přítomna pozitivní hemokultura. Pozitivně vyhodnocené anonymní hemokultivační lahvičky svítí střídavě červeně a žlutě. Pozitivní vzorek lze kromě vizualizace i zvukově zaznamenat pomocí zvukového alarmu, který je nastaven do 60 (dB) [21].

K přístroji BD BACTEC FX a FX 40 jsou dodána od výrobce hemokultivační média. V tuto chvíli výrobce dodává 8 médií, a to: BACTEC Standard Aerobic a Anaerobic, BACTEC Plus Aerobic a Anaerobic, BACTEC Peds Plus, BACTEC Lytic Anaerobic, BACTEC Mico Lytic a BACTEC Mycosis [22].

4.8.2 Princip hemokultivačního systému BacT/Alert 3D

Automatizovaný systém, který umožňuje širokou škálu detekce mikroorganismů, např. bakterií, hub nebo mykobakterií. Vkládání lahviček je stejné jako u přístroje BD BACTEC FX. Vzorky jsou pomocí čárových kódů načteny čtecím zařízením přístroje a vloženy do jednotlivých vložek zásuvek. Hemokultivační lahvičky jsou umístěny do jednotlivých vložek a umožňují současně inkubaci, protřepání i monitoring. Ovládání přístroje se provádí pomocí dotykové obrazovky a veškeré informace se převádějí do informačního nemocničního systému a zároveň do vlastního uživatelského systému přístroje [22].

Princip přístroje BacT/Alert 3D je založen na kolorimetrické technologii. Nárůst hladiny CO₂ produkovaný růstem mikroorganismů je monitorován na základě kolorimetrických senzorů umístěných na dně hemokultivačních lahviček. Přítomnost polopropustné membrány dává oxidu uhličitému schopnost procházet, reagovat s vodou a ovlivňovat hodnotu pH. Takové prostředí působí na kolorimetrické senzory a dochází tak ke změně barvy indikátoru, který je umístěn na dně lahvičky, a to ze zelené barvy na žlutou. Přístroj umožňuje také optickou a zvukovou zpětnou vazbu při monitorování hemokultur [23].

K přístroji BacT/Alert 3D je dodáno od výrobce 6 hemokultivačních médií: BacT/Alert Standard Aerobic a Anaerobic, BacT/Alert FA Plus, BacT/Alert FB Plus, BacT/Alert PF Plus a BacT/Alert MP Mycobacteria [22].

4.9 Mikroskopie

4.9.1 Gramovo barvení

Gramovo barvení se řadí mezi tzv. diagnostické barvení, kdy pomocí několika barvicích kroků lze bakterie rozdělit na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Toto rozdělení bakterií vychází z jejich odlišné stavby buněčné stěny. U grampozitivních bakterií je buněčná stěna tvořena silnou vrstvou peptidoglykanem a polysacharidů, kterými prochází kyselina teichoová. Tato kyselina ve spojení s krystalovou violetí a moření Lugolovým roztokem vytváří komplex, který se pomocí rozpouštědla (alkoholu a acetonu) nevymyje. V preparátu má tento druh bakterií barvu krystalové violeti, tedy fialovou [9].

U gramnegativních bakterií je buněčná stěna složena ze zevní membrány a periplasmatického prostoru s peptidoglykanem, který je tenký, téměř jednovrstevný a obsahuje kyselinu diaminopimelovou. Po obarvení krystalovou violetí a Lugolovým roztokem nedochází k vytvoření komplexu a krystalová violet se díky rozpouštědлу z preparátu vymývá. Po obarvení karbofuchsinem dochází u preparátu k barvení bakterií do červené barvy [9].

Zvláštním případem barvení mohou být bakterie tzv. G labilní – nebarví se. Tyto bakterie obsahují ve své buněčné stěně mnoho mastných kyselin a vosků a na základě vysoké hydrofobii jejich stěny přijímají barviva velmi obtížně a Gramovým barvením se nemusí obarvit. Příkladem takových bakterií může být *Mycobacterium tuberculosis*, která se barví speciální barvicí technikou tzv. (Ziehl – Neelsen barvení) [9].

Při pozitivní hemokultuře je přítomný mikroorganismus neznámého původu. K zjištění přesného původce je třeba provést z kultury preparát, zvolit správnou techniku barvení a mikroskopicky jej vyhodnotit.

Pracovní postup k zhotovení mikroskopického preparátu:

1. Hemokultivační pozitivní lahvička se několikrát promíchá (převrácením) a provede se desinfekce septa lahvičky.
2. Desinfekce se nechá volně zaschnout a pomocí sterilní jehly a stříkačky se odebere několik ml krve.
3. Na správně označené mikroskopické sklíčko se kápne 1 kapka krve a pomocí sterilní kličky se provede tenký nátěr po celé ploše sklíčka.
4. Krevní nátěr se fixuje. Fixace probíhá plamenem a ponořením nátěru do roztoku methanolu po dobu 5 minut. Takto fixovaný preparát je vhodný k barvení.
5. Na preparát se nanese po celé délce nátěru krystalová violet a nechá se 20 sekund působit.
6. Lugolovým roztokem se spláchne krystalová violet a barví preparát, na kterém se nechá roztok 20 sekund působit a poté se slije, ale neoplachuje.
7. Po slití barviva se preparát oplachuje acetonem do doby vymytí barviva. Dále se preparát opláchne vodou a převrství karbofuchsinem po dobu 5 sekund a opět se opláchne vodou.
8. Takto obarvený preparát se vysuší (pomocí buničiny) a je připravený k mikroskopii [23].

4.9.2 Imerzní mikroskopie

Patří v mikrobiologii k velmi často používaným metodám a využívá imerzního objektivu. Imerzní mikroskopie využívá zvýšené rozlišovací schopnosti, kdy je možné sledovat i velmi malé objekty. Mezi pozorovaný objekt a čočku objektivu se nanáší imerzní olej, jehož index lomu je stejný jako index lomu skla,

a tudíž nedochází ke zkreslení tvaru objektu, a naopak se zvyšuje ostrost pozorovaného objektu [24].

Pracovní postup k mikroskopování:

1. Odstranění ochranného obalu a zapnutí mikroskopu.
2. Na desku mikroskopu se umístí preparát tak, aby byl na vrchní straně podložního sklíčka a pérky připevněn.
3. Při použití imerzního objektivu se použije imerzní olej, který se nakape na preparát.
4. Objektiv se nejdříve nastaví na menší rozlišení, kdy se objektiv nezanořuje do imerzního oleje a hrubým posunem pouze zaostří.
5. Po zaostření je možné objektiv přetočit na požadované rozlišení a zanořit jej do imerzního oleje.
6. Úprava rozpětí očních okulárů a jemné zaostření otáčivým mikrošroubem.
7. Prohlédnutí požadovaných zorných polí a následné vyhodnocení.
8. Po skončení je třeba preparát vyjmout, umýt lihovým roztokem imerzní objektiv a desku mikroskopu od imerzního oleje. Nakonec mikroskop vypnout [23].

4.10 Simulace kultivace

Pro zavedení automatizovaného hemokultivačního systému BACTEC je výrobcem poskytnuta pro měření semikvantitativní metoda s označením IVD CE, která je součástí normy ČSN EN ISO 15189 pro validaci, verifikaci a zavádění zařízení. K simulaci hemokultivace jsou použity přístroje BD BACTEC FX TOP/ FX 40 a BacT/Alert 3D.

V rámci verifikace metod je stanovena senzitivita a specifita metody. Pro testování jsou použity 4 referenční kmeny. Metoda je souběžně porovnávána s již zavedenou metodou stejných referenčních kmenů za stejných podmínek. Pro každý

z přístrojů je použito 36 HK lahviček (aerobních a anaerobních), zmíněných v kapitole „použitá hemokultivační média“.

Dohromady pro celkové měření je potřeba 108 hemokultivačních lahviček. V každém z přístrojů bylo testováno 36 lahviček, rozdělených po 9 kusech do 4 skupin na základě referenčních kmenů. 72 lahviček je testováno na pozitivní výsledek a zbytek 36 lahviček je testováno pro negativní kontrolu. Podle pracovního protokolu, který je uveden v seznamu příloh, je provedena simulace hemokultivace. Termínem hemokultivace je označen standardizovaný laboratorní postup zaměřený na průkaz mikroorganismů v krvi pacienta za definovaných podmínek.

- **Porovnání TTD**

Pro všechny pozitivně vyhodnocené lahvičky byl vypočítán čas detekce. Čas detekce vyjadřuje dobu od vložení HL lahvičky do přístroje po čas positivity. Hodnoty jsou uvedeny v minutách. Byl sledován odlišný detekční čas jednotlivých mikroorganismů a zároveň porovnán detekční čas jednotlivých přístrojů. Stanovení detekčních časů je v diagnostice sepsí velmi důležité. Čím dříve je zachycen nárůst mikroorganismu včetně mikroskopie, tím rychleji je možné zahájení léčby.

4.10.1 Příprava inokula

Pro zavedení hemokultivačního systému BACTEC byly použity 4 referenční kmeny dodány výrobcem. Narostlé kultury referenčních kmenů byly resuspendovány ve fyziologickém roztoku na hustotu (0,5 McFarlanda), která byla měřena pomocí dozimetru. Dle tabulky č. (2) bylo provedeno ředění suspenze. Konečné ředění obsahovalo 10 ml suspenze s danou bakterií (4 zkumavky s jednotlivými bakteriemi po 10 ml objemu).

Tabulka 2 - Ředění inokula

Ředění inokula	Objem zákalu a fyziologického roztoku	Výsledná koncentrace (mol/l)
1	0,5 McF	$1,5 \cdot 10^8$
2	10 μ l 1 + 0,99 ml fyz. roz.	$1,5 \cdot 10^6$
3	10 μ l 2 + 0,99 ml fyz. roz.	$1,5 \cdot 10^4$
4	1 ml 3 + 9 ml fyz. roz.	$1,5 \cdot 10^3$

Ve 4 zkumavkách bylo provedeno ředění (požadovaný objem suspenze a fyziologického roztoku) na požadované koncentrace.

4.11 Pracovní postup

4.11.1 Postup inokulace do HK lahviček

- Všechny hemokultivační lahvičky, celkem 108 kusů různých typů médií (anaerobní a anaerobní) a odlišných výrobců, byly vyskládány na pracovní plochu. U všech lahviček byla provedena desinfekce septa lahviček pomocí desinfekce na hemokultury.
- Pro simulaci a zavedení hemokultivačního systému BACTEC byla použita dárcovská krev (krevní transfúze) skupiny A-. Podle pracovního protokolu bylo do všech hemokultivačních lahviček přidáno 1 -2 ml dárcovské krve. Krev byla odebrána z krevního vaku pomocí sterilní injekční stříkačky a sterilní injekční jehly.
- Po přidání krve bylo do všech 72 lahviček přidáno pomocí sterilní injekční stříkačky a sterilní injekční jehly 0,4 ml roztoku naředěné

suspenze s mikroorganismy. Do zbylých 36 lahviček nebyla přidána suspenze mikroorganismů z důvodu stanovení negativní kontroly.

- Všechny lahvičky byly převrácením promíchány a vloženy do jednotlivých přístrojů. Výsledky byly vyhodnoceny do 72 hodin.

Práce s referenčním kmenem (*clostridium perfringens*), včetně přípravy suspenze bakterie a přidání suspenze bakterie do anaerobních lahviček byla provedena v anaerobním vzduchotěsném boxu za sterilních podmínek.

4.12 Kontrola pozitivních HK

Do 72 hodin byla stanovena pozitivita výsledků. Po stanovení všech 72 pozitivních lahviček byla provedena kultivace na kultivační média. Z důvodu citlivosti mikroorganismů na podmínky kultivace, včetně prostředí, teploty a médií byla provedena kultivace na speciálních kultivačních médiích pro jednotlivé organismy. Nakonec byly z hemokultury vytvořeny preparáty (krevní nátěry), které se barvily barvením dle Grama a byla u nich provedena následná mikroskopie. Mikroskopie preparátů je uvedena v obrázcích č. ()

4.13 Kontrol negativních HK

Pro kontrolu negativní signalizace bylo provedeno vyočkování 36 negativně vyhodnocených lahviček. U všech negativních lahviček byla provedena kultivace na krevním agaru, McConkey agaru nebo schaedler agaru, podle typu lahvičky.

4.14 Kontrola falešně negativních HK

Pro kontrolu falešně negativní signalizace bylo provedeno vyočkování 50 negativně vyhodnocených lahviček. U všech negativních lahviček byla provedena kultivace na krevním agaru, McConkey agaru nebo schaedler agaru, podle typu lahvičky.

5 VÝSLEDKY

5.1 Simulace hemokultivace

Všechny HK lahvičky byly vyhodnoceny pro jednotlivé přístroje. Pro každý přístroj bylo vyhodnoceno 72 pozitivních hemokultur a 36 negativních hemokultur. Přístroj BACTEC FX TOP/FX 40 a BacT/Alert vyhodnotil správně všechny pozitivní lahvičky a všechny negativní lahvičky.

Tabulka 3- Celkové výsledky

Počet testovaných lahviček						
Kontrola	Typ lahviček	BACTEC FX TOP	BACTEC FX 40	BacT/Alert	Pozitivně vyhodnocené	Negativně vyhodnocené
(A) <i>E. coli</i> CCM 3954	Aerobní lahvičky	6	6	6	18	0
(B) <i>Staph.aureus</i> CCM 3953		6	6	6	18	0
Negativní kontrola		6	6	6	0	18
(C) <i>Cl. perfringens</i> CCM 4502	Anaerobní lahvičky	6	6	6	18	0
(D) <i>Strep. pneumoniae</i> CCM 4502		6	6	6	18	0
Negativní kontrola		6	6	6	0	18

5.2 Porovnání TTD

Hodnoty detekčního času jsou uvedeny v tabulce č. (4) a vypočítány v aritmetickém průměru.

Tabulka 4- Porovnání času detekce

TTD															
E. coli CCM 3954				Stap. aureus CCM 3953				Cl. perfringens CCM 4435				Strep. pneumoniae CCM 4502			
BACTEC FX TOP	BACTEC FX 40	Bact/ALERT	BACTEC FX TOP	BACTEC FX 40	Bact/ALERT	BACTEC FX TOP	BACTEC FX 40	Bact/ALERT	BACTEC FX TOP	BACTEC FX 40	Bact/ALERT	BACTEC FX TOP	BACTEC FX 40	Bact/ALERT	
9:46	9:46	11:02	13:05	12:55	12:41	9:04	9:13	11:08	20:05	20:04	16:09				
10:06	9:56	11:22	13:25	13:45	12:41	9:34	9:53	11:18	19:34	20:34	18:49				
9:56	10:06	11:12	13:05	13:25	12:41	10:14	10:23	12:08	20:04	20:04	17:39				
9:36	9:36	11:02	12:55	13:05	12:41	10:23	9:23	11:18	19:04	18:34	17:29				
9:56	9:55	11:02	12:55	12:55	13:01	9:43	9:53	11:48	20:34	19:34	17:19				
9:55	10:05	11:02	13:15	12:05	12:31	9:23	10:03	11:18	19:34	19:34	17:29				
Průměr															
9:52	9:54	11:07	13:06	13:01	12:42	9:43	9:48	11:29	19:49	19:44	17:29				
Porovnání TTD s Bact/ALERT															
1:14	1:13		0:24	0:19		1:46	1:41		2:20	2:15					

5.3 Stanovení senzitivity a specificity

Všechny HK lahvičky, které byly negativně vyhodnoceny a které jsou inokulovány pouze krví, musí být vyhodnoceny nejdéle do 5 dnů. Podle poměru skutečně pozitivních lahviček k součtu pozitivně vyhodnocených lahviček a falešně negativních lahviček byla vypočítána senzitivita testu. Podle poměru skutečně negativních lahviček k součtu negativně vyhodnocených lahviček a falešně pozitivních lahviček byla vypočítána specificita testu.

- Výpočet senzitivity a specificity

Senzitivita = počet skutečně pozitivních / počet skutečně pozitivních + počet falešně negativních

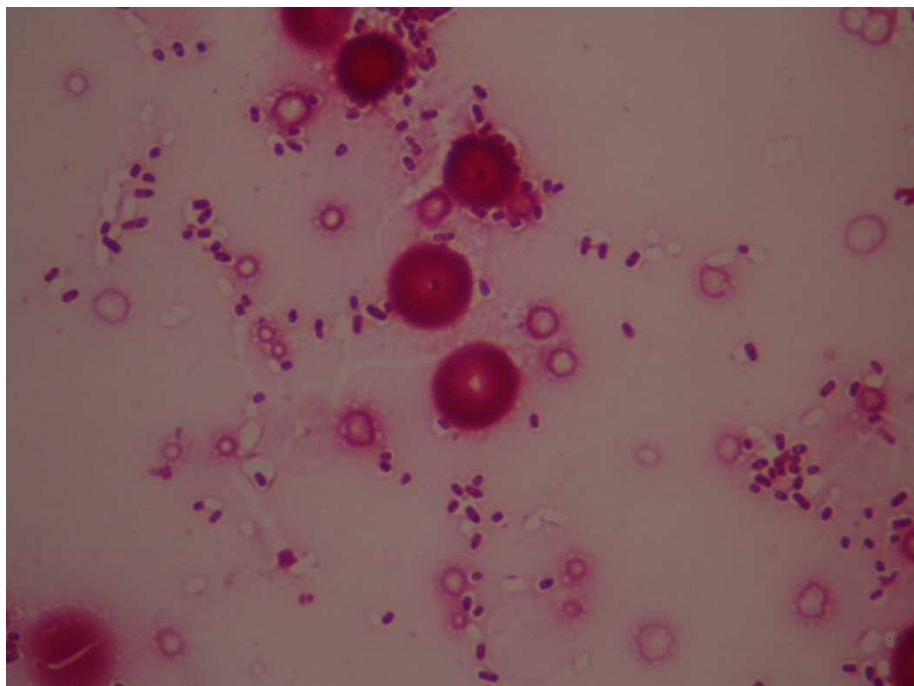
Specificita = počet skutečně negativních / počet skutečně negativních + počet falešně pozitivních

Hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. (5)

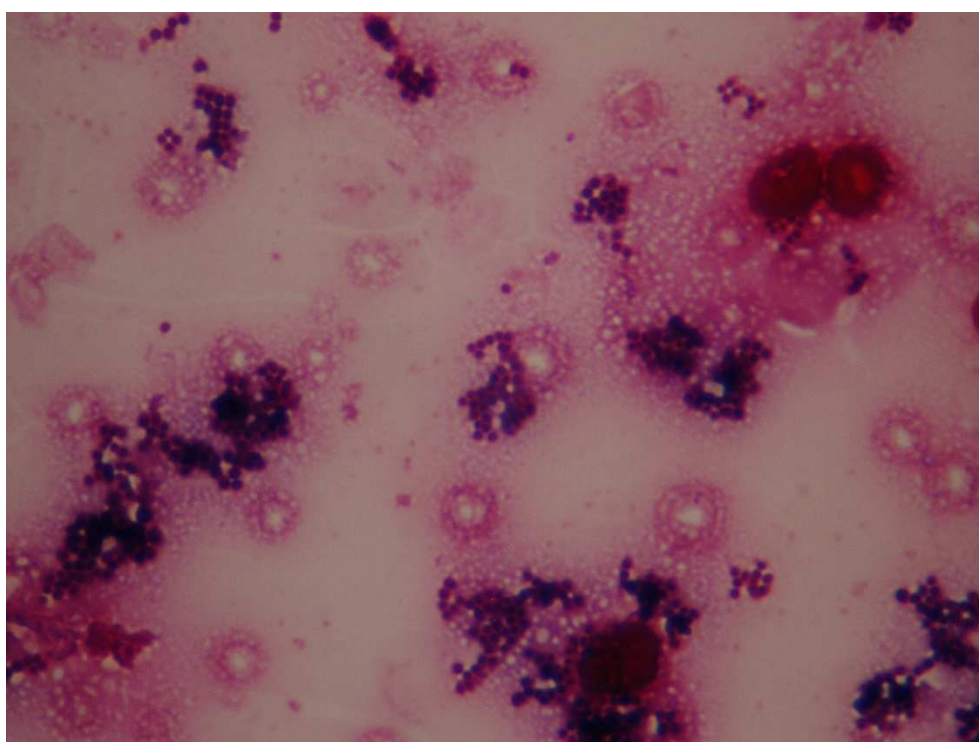
Tabulka 5 – Vyhodnocení senzitivity a specificity metody

BACTEC FX TOP	Cílová hodnota		Součet	BACTEC FX 40		Součet	BacT/ALERT		Součet	Cílová hodnota		Součet
	pozitivní	negativní		pozitivní	negativní		pozitivní	negativní		pozitivní	negativní	
Počet hodnot												
	pozitivní	0	18	pozitivní	0	18	pozitivní	0	18	pozitivní	0	18
	negativní	18	18	negativní	18	18	negativní	18	18	negativní	18	18
Součet	18	18	18	Počet hodnot	0	18	Počet hodnot	0	18	Počet hodnot	0	18
				Součet	18	18	Součet	18	18	Součet	18	18
Senzitivita	100,00%			Senzitivita	100,00%		Senzitivita	100,00%		Senzitivita	100,00%	
Specificita	100,00%			Specificita	100,00%		Specificita	100,00%		Specificita	100,00%	

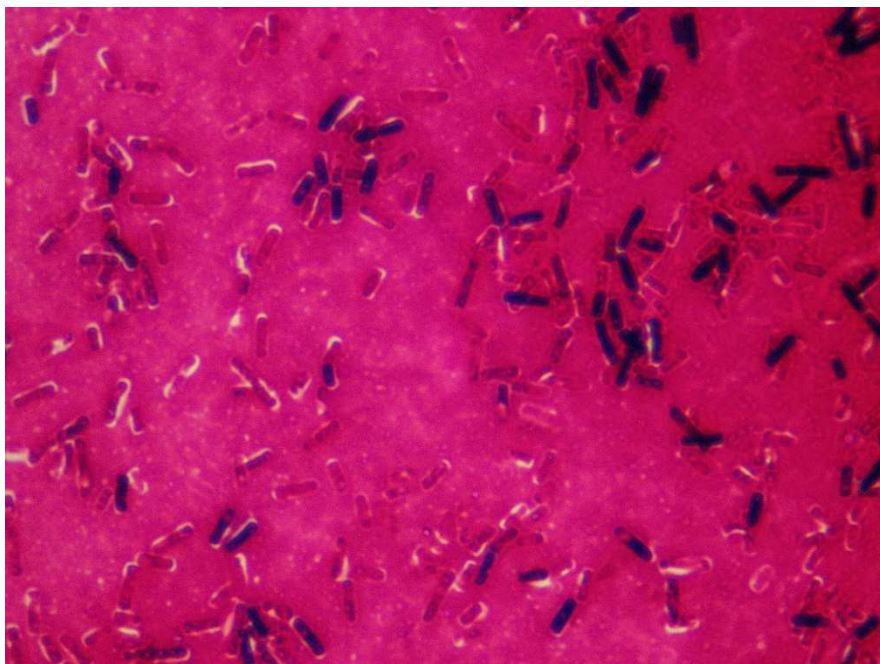
U všech pozitivně vyhodnocených lahvíček bylo provedeno zhotovení mikroskopických preparátů, které byly mikroskopicky zhodnoceny a digitálním fotoaparátem vyfoceny. Všechny fotografie jsou uvedeny zde:



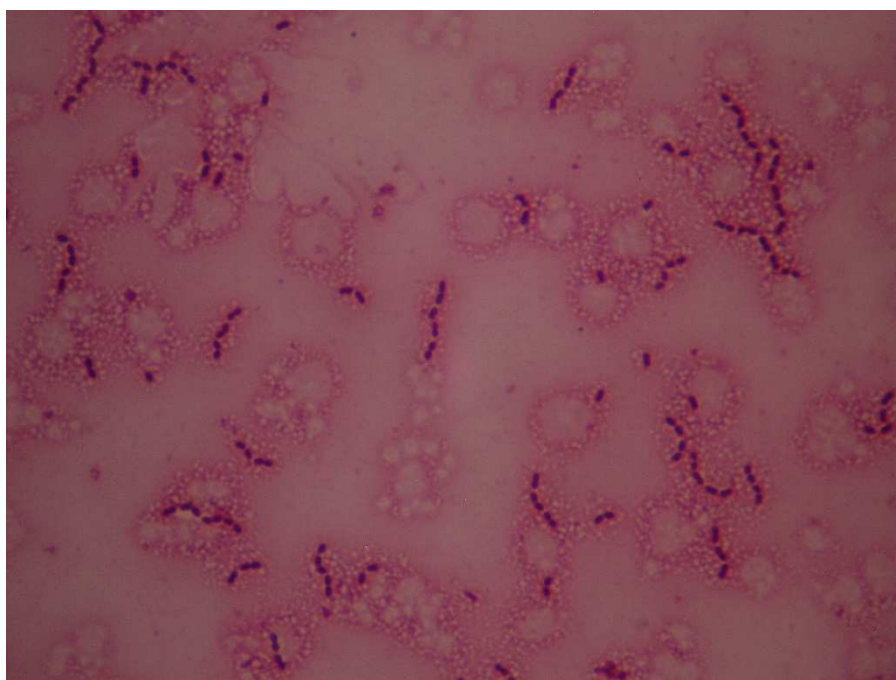
Obrázek 1: Mikroskopie bakterie *E. coli* (Silvie Carvalho, 2018, vlastní fotografie)



Obrázek 2: Mikroskopie bakterie *Staph. aureus* (Silvie Carvalho, 2018, vlastní fotografie)



Obrázek 3: Mikroskopie bakterie *Cl. Perfringens* (Silvie Carvalho, 2018, vlastní fotografie)



Obrázek 4: Mikroskopi bakterie *Strep. Pneumoniae* (Silvie Carvalho, 2018, vlastní fotografie)

6 DISKUZE

Bakteriémie je stav, který popisuje přítomnost bakterií v krvi bez klinických příznaků. Naopak sepse popisuje stav, kdy je přítomna těžká bakteriémie se systémovou zánětlivou reakcí těla na infekci.

Sepse je velmi závažná, těžká nemoc a může skončit až smrtelně. Každoročně se ve světě vyskytne kolem 18 miliónu případů sepse a většině případů vede k hospitalizaci v nemocnicích až k úmrtí. Dle zvyšující se závažnosti systémové zánětlivé reakce těla na infekci, je možné rozdělení tohoto stavu do několika podskupin. Při jedné ze studií bylo v Brazílii přijato na oddělení JIP kolem 13 000 pacientů a byla zaznamenána zvyšující se úmrtnost se závažností stavu [4].



Obrázek 5: Grafické znázornění zvyšující se úmrtnosti se závažností sepse [4]

Sepsis a septické stavy představují obrovskou finanční zátěž pro společnost. V roce 2006 byly v Evropě roční finanční náklady na hospitalizaci spojenou se sepsí a septickými stavy kolem 7,6 miliard eur. Tyto náklady jsou pro zdravotnictví velkou zátěží a pacienti, kteří přežijí sepsí a septické stavy trpí dlouhodobými komplikacemi a sníženou kvalitou života. Opět je zde potřeba zdravotnické péče a s tím spojené další finanční náklady [4]. „88 % zdravotníků považuje sepsí za jednu z nejobtížněji léčitelných nemocí“ [4, str. 5].

Diagnostika a léčba sepse je podstatnou součástí v onemocnění sepse. Dnešní konvekční vyšetřovací metody v klinické mikrobiologie nejsou plně vyhovující, zvláště v oblasti rychlosti vyšetření. Trvání diagnostiky je zhruba kolem 24-72 hodin, tudíž je výrazným problémem. Do budoucnosti je potřeba hledat stále rychlejší metody pro identifikaci a detekci bakterií. V oblasti rychlejší diagnostiky hrají dnes významnou roli biomarkery.

Biomarkery jsou biochemickými a imunologickými ukazetely při diagnostice sepse. V dnešní době naprostou součástí všech ambulancí nemocnic, ordinací lékařů i laboratoří. Biomarkery mohou odlišit bakteriální infekci od virové nebo plísňové, mohou indikovat přítomnost sepse a odlišit lokální a systémovou infekci. Mezi nejznámější biomarkery patří C- reaktivní protein, prokalcitonin a IL- 6. C- reaktivní protein je dnes k dostání v odpovídající finanční ceně a lze jej snadno sehnat i v lékárnách a drogeriích. Biochemické testy pomocí prokalcitoninu jsou poměrně dražšími testy a dostupnými pouze v klinických laboratořích. Kromě časné diagnostiky sepse mohou biomarkery pomáhat v řízení antibiotické léčbě [3].

Kromě biochemických, imunologických a hematologických ukazatelů při diagnostice sepse je nejdůležitějším mikrobiologickým vyšetřením hemokultivace. Hemokultivančí vyšetření se provádí při podezření na sepsi. Krev pacienta je odebrána do 2 hemokultivančích lahviček kvůli odlišnému prostředí růstu bakterií a následně jsou lahvičky transportovány do laboratoře. V laboratoři jsou lahvičky umístěny do automatizovaných hemokultivačních přístrojů, kde je prováděna detekce CO₂. Pokud se zaznamená zvýšená hladina CO₂ vypovídá vzorek o pozitivitě, resp. o přítomnosti bakterií. Z tohoto důvodu se dále provádí vyočkování krve na kultivační médium a zhotovení mikroskopického preparátu, který je mikroskopicky pozorován a je diagnostikována přesná identifikace druhu bakterie.

Cílem bakalářské práce bylo zavést nový přístroj BACTEC s automatizovaným hemokultivačním systémem do rutinní klinické laboratoře. Pro zavedení byla potřeba provést simulaci hemokultivace. K simulaci hemokultivace byly použity nové přístroje firmy BACTEC a starý hemokultivační přístroj firmy BacT/Alert. Přístroj BacT/Alert sloužil pouze k porovnání výsledků. Pro zavedení nového přístroje BACTEC byla k simulaci hemokultivace poskytnuta od výrobce metoda IVD s CE označením. Pro tuto metodu bylo nutné stanovení senzitivity a specifity.

- Vyhodnocení výsledků

Všechny hemokultivační lahvičky, které byly inokulovány bakteriální suspenzí, byly vyhodnoceny hemokultivačním systémem jako pozitivní do 72 hodin. Všechny negativní kontroly byly vyhodnoceny jako negativní. Jako falešně negativní/pozitivní nebyla vyhodnocena ani jedna testovaná lahvička. Senzitivita a specifita metody byla 100 %.

Porovnání časů detekce je pro srovnání přístrojů velmi podstatné. Čas detekce se velmi odlišoval dle typu bakterií. U bakterie *E. coli* byl čas detekce na přístroji BACTEC 9 hodin a 53 minut. S porovnáním s přístrojem BacT/Alert byl čas detekce o hodinu později, tedy 11 hodin a 7 minut. Odlišný čas byl i na přístroji BACTEC a to v případě bakterie *Cl. perfringens* o 1 hodinu a 43 minut. Naopak u přístroje BacT/Alert byly odlišné časy detekce, a to u bakterie *Stap. aureus* a *Strep. pneumoniae*. Čas detekce byl s porovnáním přístroje BACTEC kratší, a to v prvním případě o 22 minut a v druhém o 2 hodiny a 17 minut.

Po informacích z článku: Srovnání detekce bakterií v hemokultivačních systémech BACTEC Lytic/10 Anaerobic F, BacT/Alert FAN Anaerobic a BacT/Alert FN Anaerobic je zřejmé, že lahvičky Bactec Lytic vykazují lepší růst, kultivaci a detekci anaerobních bakterií, než lahvičky BacT/Alert FAN Anaerobic a BacT/Alert FN Anaerobic [25].

V rámci onemocnění, které tyto 4 referenční kmeny mohou způsobit, se domnívám, že velmi špatné onemocnění způsobují kmeny *Stap. aureus* a *Strep. pneumoniae* a čas detekce včetně nasazení léčby je podstatně výhodnější u přístroje BacT/Alert.

V oblasti hemokultivačních přístrojů je velmi těžké určit, který z přístrojů je výhodnější a je třeba dalších měření nebo testování antimikrobiální aktivity. Testování mikrobiální aktivity jsme nedělali, jelikož jsme prováděli pouze zavádění již vybraného přístroje.

Množství krve může velmi ovlivnit finální výsledek. Podle studie z roku 1985 závisí citlivost kultivačního systému BACTEC na objemu vzorku, a to především gramnegativních bakterií. Studie prokázala, že zvýšením požadovaného objemu krve je výtěžnost a detekce bakterií o 2,6 % vyšší na mililitr objemu vzorku [26].

U další studie byly srovnány přístroje VersaTREK a BacT/Alert. U všech vzorků byla prokázána pozitivita, ale velmi se odlišoval čas detekce u několika mikroorganismů. Čas detekce u přístroje VersaTREK a hemokultivačních lahviček VT REDOX 1 byl oproti přístroji BacT/Alert o 97,3 % rychlejší. Při další studii byl prokázán velmi dobrý mediální systém. Média VersaTREK jsou vyvinuta jako obohacený mediální systém např. (odhalí všechny mikrobiální aktivity, je účinný pro všechny populace pacientů, u pediatrických pacientů není potřeba jiných médií a používají minimální objemy krve [27].

Volba nákupu hemokultivačního přístroje je ovlivněna různými podmínkami výběrového řízení a každá mikrobiologická laboratoř (včetně vedení zdravotnického zařízení) si jej vybírá sama. Jedním z hlavních důvodů výměny hemokultivačního přístroje na oddělení klinické mikrobiologie byla možnost satelitového menšího analyzátoru, který je umístěný na CLP 24 hodin denně.

7 ZÁVĚR

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo poskytnout informace o bakteriémii a sepsi. Dále přiblížit diagnostiku sepse, hemokultivaci, hemokultivační systémy včetně validace a verifikace metod.

V praktické části bakalářské práce bylo cílem zavést automatizovaný hemokultivační systém BACTEC pomocí metody IVD s CE označením. U této metody bylo úkolem stanovit senzitivitu a specifitu a zároveň výsledky porovnat s automatizovaným hemokultivačním systémem BacT/Alert.

U všech pozitivně vyhodnocených lahvíček byla prokázána pozitivita vzorků a u všech negativních lahvíček negativita. Pozitivní a negativní lahvíčky byly ověřeny pomocí kultivace na určitých typech kultivačních médií a dále byl u pozitivních lahvíček vytvořen mikroskopický preparát. Nakonec byl preparát mikroskopicky vyhodnocen a zdokumentován.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

%	procenta
°C	stupeň Celsia (jednotka teploty)
ATB	antibiotika
CCM	česká sbírka mikroorganismů
CLP	nařízení o klasifikaci a balení látek a směsí
CO ₂	oxid uhličitý
dB	decibel (jednotka zvuku)
HLA	histokompatibilní systém
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
IL- 12	interleukin 12
JIP	jednotka intenzivní péče
SOP	standartní operační postupy
SPS	sulphite polymyxin sulphadiazine
TTD	čas detekce

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ČERMÁK, Pavel. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. Praha: Maxdorf, 2008. 182 s. ISBN 978-80-7345-142-4.
- [2] SCHARFEN, Josef, ml. *Diferenciální diagnostika v klinické mikrobiologii*. Hradec Králové: Nucleus, 2013. 236 s. ISBN 978-80-87009-32-1.
- [3] PRŮCHA, Miroslav, Michal FEDORA, Eva KIESLICHOVÁ a Vladimír ŠRÁMEK, ed. *Sepse*. Praha: Maxdorf, 2015. Jessenius. 264 s. ISBN 978-80-7345-448-7.
- [4] ROCHE. *Sepse: závažnost onemocnění, včasná diagnostika a správná léčba*. Praha: Roche, 2015. 12 s.
- [5] BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*, Praha: Galén, 2009. 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.
- [6] ČERNÝ, Vladimír. *Sepse v intenzivní péči: vybraná doporučení v diagnostice a terapii*. Druhé a rozšířené vydání. Praha: Maxdorf, c2005. Intenzivní medicína. 211 s. ISBN 80-7345-054-2.
- [7] POTUŽNÍK, Vladislav. *Klinická mikrobiologie sepse*. Praha: Avicenum, 1978. 136 s.
- [8] VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- [9] VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
- [10] VOTAVA, Miroslav. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Brno: Hortus, 1999. 407 s. ISBN 80-238-5058-X.
- [11] *Validace metod* [online]. [cit. 2018-05-18].
Dostupné z: <http://www.fffchem.cz/reseni/laboratorni-specialiste/validace-metod/>

- [12] ČSN EN 15189. *Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost laboratoře.*
- [13] *Validace a verifikace v oboru lékařské mikrobiologie* [online]. [cit. 2018-05-18].
Dostupné z: http://www.splm.cz/dokumenty/PSSLP_2.pdf
- [14] Bio Rad. Mac Conkey and Crystal Violet. Příbalový leták. 63617 - 69084.
- [15] Bio Rad. Scheadler and Vitamin K3. Příbalový leták. 63959 – 69624.
- [16] Bio Rad. Columbia and 5% Sheep Blood. Příbalový leták. 63784.
- [17] Becton, Dickinson and Company. Bactec Plus Aerobic/F. Příbalový leták. 442192.
- [18] Becton, Dickinson and Company. Bactec Lytic/10 Anaerobic. Příbalový leták. 442021.
- [19] Biomérieux. BacT/Alert® SA Standard Aerobic. Příbalový leták. 259789.
- [20] Biomérieux. BacT/Alert® SA Standard Anaerobic. Příbalový leták. 259790.
- [21] Becton, Dickinson and Company. BD BACTEX® FX/FX 40. Uživatelská příručka 441427.
- [22] Biomérieux. BacT/Alert 3D. Uživatelská příručka. 15-0064-00/CE.
- [23] SOP, *Standartní operační postupy mikrobiologické laboratoře nemocnice Královské Vinohrady.*
- [24] VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody.* Brno: Neptun, 2010. 504 s. ISBN 978-80-86850-04-8.
- [25] FÖRSTL, Miroslav, ČERMÁK, Pavel. *Srovnání detekce anaerobních bakterií v hemokultivačních systémech BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F, BacT/Alert FAN Anaerobic a BacT/Alert FN Anaerobic.* Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. 2005, Roč. 11, č. 3, s. 100-104. ISSN: 1211-264X.

[26] JAMES J. FLORDE, FRED C. TENOVER, LARRY G. CARLSON. *Specimen Volume Versus Yield in the BACTEC Blood Culture System*. Journal of clinical microbiology, 1985. 292-295 s. ISSN 0095-1137/85/080292-0402.00/0.

[27] American Society of Microbiology. *Comparison of the VersaTREK® and the BacT/Alert® Blood Culture Systems for the Growth of Fastidious Microorganisms*. Studies. Florida, 2005. Poster C-214.

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Mikroskopie bakterie E. coli.....	48
Obrázek 2 Mikroskopie bakterie Staph. aureus.....	48
Obrázek 3 Mikroskopie bakterie Cl. perfringens.....	49
Obrázek 4 Mikroskopie bakterie Strep. pneumoniae.....	49
Obrázek 5 Grafické znázornění zvyšující se úmrtnosti se závažností sepse.....	53

11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Referenční kmeny.....	34
Tabulka 2 Celkové výsledky.....	44
Tabulka 3 Porovnání času detekce.....	45
Tabulka 4 Vyhodnocení senzitivity a specificity.....	47