

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA

**Závislost detekčních časů na množství bakterií
v systémech BacT/Alert a Bactec**

bakalářská práce

vedoucí práce: MUDr. Pavel Čermák, CSc.

autor: Jindra Norková

Datum: 14. 5. 2008

Dependence of time to detection on the number of bacterial cells in BacT/Alert and Bactec systems

Infection of bloodstream and sepsis are major causes of lethality. The main reason for the increase of cases is many more operations. In patients it is common to use catheters or other plastic materials, which increase the risk of infection. Important role is played by the patient's age and long hospitalization.

Thanks to new automated blood culture systems the capture of pathogens is faster and the spectrum of pathogens is wider. Some types of modern automated blood culture systems are used in Czech hospitals but in Western Europe and in the USA they are standard equipment.

Treatment of infection is based on antibiotic. It seems that successful therapy depends on the fact whether pathogens produce biofilm or not. One of this thesis tasks is to compare time to detection of biofilm and non-biofilm producers.

Another task is the comparison of two automated blood culture systems: Bactec 9240 and BacT/Alert 120. Both of them react to CO₂ concentration changes but differ in principles of detection.

Measured materials were bacterial strains which produced biofilm and came from patients with diagnosis of bloodstream infection.

To the final statistic comparison of results Chow 's test was used. This test rejected the null hypothesis and proved alternative hypothesis that between time to detection of used blood culture systems is a significant difference, and further, time to detection of biofilm and non-biofilm producers do differ.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Závíslost detekčních časů na množství bakterií v systémech BacT/Alert a Bactec vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 14. května 2008

podpis studenta

Tímto děkuji především MUDr. Pavlu Čermákovi, Csc. za jeho pomoc při sestavování této práce, za čas, který mi věnoval a hlavně za ochotný přístup, s jakým se podělil o své znalosti a poznatky z praxe. Také bych chtěla poděkovat pracovnímu kolektivu oddělení Klinické mikrobiologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a v neposlední řadě svým blízkým za jejich podporu a trpělivost.

Úvod.....	6
1. Současný stav diagnostiky infekcí krevního řečiště	8
1.1 Základní pojmy a definice.....	8
1.1.1 Bakteriémie	8
1.1.2 Infekce	9
1.1.3 Infekce krevního řečiště.....	9
1.1.4 SIRS.....	10
1.1.5 Sepse.....	10
1.1.6 MODS	12
1.1.7 Infekce cévních katétrů (katetrové sepsy)	12
1.1.8 Biofilm.....	13
1.2 Nejčastější původci infekcí krevního řečiště	14
1.3 Mikrobiologická diagnostika	15
1.3.1 Přímé průkazy původce	15
1.3.2 Nepřímé průkazy původce	15
1.3.3 Další možnosti průkazu mikroorganismů.....	16
1.4 Diagnostika infekcí krevního řečiště.....	16
1.4.1 Biochemické a hematologické vyšetření.....	16
1.4.2 Mikrobiologická diagnostika	16
1.4.3 Klasická hemokultivace.....	16
1.5 Typy hemokultivačních systémů.....	17
1.5.1 Manuální hemokultivační systémy	17
1.5.2 Automatizované hemokultivační systémy.....	19
1.6 Využití hemokultivačních systémů ke kvantitativní kultivaci.....	20
1.7 Hemokultivační systémy použité pro měření detekčních časů	21
1.7.1 Bactec 9240	21
1.7.2 BacT/Alert 120	24
2. Cíle práce a hypotézy	25
2.1. Cíle práce.....	25
2.2. Hypotézy práce.....	26
3. Metodika	26
3.1 Materiál a pomůcky.....	26
3.2 Charakteristika souboru	27
3.3 Pracovní postup.....	27
3.3.1. Test produkce biofilmu	27
3.3.2 Příprava vzorků.....	28
3.4 Vyhodnocení.....	29
3.4.1. Grafy	29
3.4.2. Statistické vyhodnocení.....	35
4. Výsledky	36
5. Diskuze	38
6. Závěr.....	41
7. Literatura.....	42
8. Klíčová slova	47
9. Přílohy	48
9.1 Tabulky.....	48
9.2 Obrázky.....	50

Úvod

Lokalizované infekce postupně vedou k infekci krevního řečiště, rozvoji sepse a ohrožení života pacientů. Jedině včasným prokázáním infekčního původce a jeho zničením je možné stav pacienta zlepšit. Sepse se stále řadí mezi významné příčiny mortality (u nekoronárních onemocnění) a ani moderní medicína se s tímto problémem nedokázala úplně vypořádat. Pro zdravotnictví navíc sepse představuje vysokou finanční zátěž, která může být včasným diagnostikováním a cílenou léčbou výrazně snížena.

Při určování původce infekce má zásadní význam mikrobiologická diagnostika, která se stále opírá o kultivační vyšetření. Jeho nevýhodou je ale pouze kvalitativní výsledek – přítomnost patogena potvrdí nebo vyvrátí. Postupem času vznikl i požadavek na výsledek kvantitativní. Stanovení množství patogena umožní lepší interpretaci výsledků. Tento posun je důležitý, protože vývoj bakterií vede k vyššímu počtu podmíněně patogenních kmenů. V praxi to znamená, že je složitější rozlišit součást běžné kolonizace od patogenního stavu. Metodika pro stanovení počtu bakterií je dosti náročná – bylo navrženo mnoho postupů, každý však má určité nedostatky. V klinické praxi je možné pro tento účel využít hemokultivační systémy.

V posledních letech je věnována značná pozornost detekci bakteriálních kmenů produkujících biofilm. Tyto a planktonicky rostoucí bakterie se výrazně liší svými růstovými vlastnostmi. Vzhledem k tomu, že bakterie produkující biofilm jsou častým původcem infekcí krevního řečiště spojených s cévními katetry a dalšími implantáty, je nutné ověřit, zda se jejich růst v hemokultivačních lahvičkách odlišuje. Pokud se rozdíl potvrdí, je potřeba stanovit parametry umožňující jejich kvantifikaci na základě detekčních časů hemokultivačních přístrojů.

Tato bakalářská práce zkoumá závislost detekčních časů na množství inokulovaných bakterií ve dvou systémech. Oba mají senzor reagující na koncentraci CO₂, který produkují množící se bakterie, ale liší se způsobem jeho detekce. Systém Bactec (firma Becton Dickinson) je založen na principu fluorimetrie, zatímco systém BacT/Alert (firma Organon Teknika) je založený na kolorimetrické detekci.

Testovány byly bakteriální kmeny z klinického materiálu. To znamená, že byly nalezeny u pacientů s diagnózou infekce krevního řečiště. Následně byl proveden test, který musel potvrdit tvorbu biofilmu, aby mohl být materiál dále zpracován. Mikrobiální biofilm je totiž považován za důležitý faktor při kolonizaci cévních katétrů, proto se tato práce zabývá i porovnáním detekčních časů mezi kmeny, které tvoří biofilm a těmi, které ho netvoří.

1. Současný stav diagnostiky infekcí krevního řečiště

V České republice dnes většina nemocnic využívá některý z kontinuálně měřících automatů. V zemích západní Evropy a v USA jsou standardem. Je běžné, že laboratoře mají více těchto přístrojů. V porovnání s Českou republikou jsou v těchto zemích hemokultury odebrány v daleko vyšších počtech.

V našich nemocnicích a zdravotnických zařízeních se za hemokulturu často považuje jedna hemokultivační lahvička inokulovaná krví pacienta. Za jednu hemokulturu jsou považovány všechny hemokultivační lahvičky, inokulované krví z jednoho odběru, což v případě jedné inokulované lahvičky z důvodu malého množství odebrané krve je pojem identický. Bohužel se ale často inokuluje pouze jedna lahvička z důvodu úspory finančních nákladů na poměrně drahé laboratorní vyšetření. Takovýto přístup je zásadně chybný a krátkozraký, protože jedna odebraná hemokultivační lahvička, která vyjde negativně, nevylučuje sepsi z těchto důvodů: odebraná krev neobsahovala života schopné bakterie, protože bakteriémie byla v okamžiku odběru krve velmi nízká nebo žádná (intermitentní vyplavování) a použitá lahvička nebyla vhodná pro kultivaci původce sepse (aerobní lahvička pro anaeroby a opačně). Naopak ani pozitivní kultivace nemůže jednoznačně potvrdit diagnózu sepse. Nelze vyloučit, že jde o kontaminaci (i při negativním stěru z místa odběru krve). Je nutné pokrýt co nejširší spektrum patogenů. Minimální počet inokulovaných lahviček jsou dvě (aerobní a anaerobní)(12).

1.1 Základní pojmy a definice

Průnik mikrobiálního původce do krevního řečiště dokáže vyvolat patologický stav, který může končit až smrtí pacienta. Rozlišujeme několik patologických i nepatologických stavů.

1.1.1 Bakteriémie

Jako bakteriémií označujeme stav, kdy do krve proniknou životaschopné bakterie (6). Můžeme ji rozdělit na nízkou (10 až 20 bakterií v 1 ml krve), střední (50 bakterií v 1 ml krve) a vysokou (80 a více bakterií v 1 ml krve). Vysoká bakteriémie je typická pro malé děti. Může dosahovat řádově až stovek bakterií na 1 ml krve(12).

I u zcela zdravých jedinců se v krvi vyskytují bakterie, které tam mohly proniknout z míst fyziologicky osídlených bakteriální flórou (např. tlusté střevo). Dalším možným zdrojem jsou běžná drobná poranění (např. při holení nebo čištění zubů) nebo oblasti, ve kterých je rozvinut lokální bakteriální zánět (např. ložisko bronchopneumonie, furunkl a pod.). Tyto bakterie jsou průběžně fagocytovány, aniž by se podílely na rozvoji celkového patologického procesu. (12)

1.1.2 Infekce

K infekci může dojít pokud vzniká zánětlivá odpověď a/nebo se bakterie šíří i do sterilních oblastí. (6)

Infekce je vniknutí choroboplodných mikroorganismů do hostitele a případné pomnožení se v něm. Infekce vždy nemusí znamenat onemocnění, neboť nutně nemusí dojít k poškození makroorganismu. (15)

1.1.3 Infekce krevního řečiště

Pojmem infekce krevního řečiště označujeme stav, kdy je přítomnost mikroorganismů v krevním řečišti spojena s patologickým projevem. V současné době se infekce krevního řečiště dělí na několik jednotek. (7)

- a) Primární = IKR neznámého původu – způsobena infekčním původcem (zachyceným hemokultivací), který není kontaminací a zároveň není spojen s jiným infekčním procesem včetně infekce intravaskulárního katétru.
- b) Sekundární = IKR jiná než katetrová - infekční původce z pozitivní hemokultivace, který není kontaminací a zároveň je původcem infekce v jiném místě.
- c) Infekční endokarditida (= zánětlivé onemocnění srdečních chlopní a vnitřní výstelky srdce)
- d) Katetrová seps – pacient má pozitivní výsledek kultivace krevních vzorků získaných z periferní žíly, klinické příznaky infekce a zároveň u něj není žádný jiný zjevný zdroj infekce s výjimkou katétru.

Nejčastějšími rizikovými faktory vzniku onemocnění jsou věk, malignita, ischemická choroba srdeční a cévní poškození mozku. Mortalita infekcí krevního řečiště je stále velmi vysoká. Pedersen ve své tříleté studii uvádí, že smrtelné infekce způsobily z 21% *Enterobacter* spp., z 22% *Escherichia coli* a z 32% *Klebsiella* spp. a

rozmanitá skupina enterobakterií(26). Podle studie proběhlé v Tokijské Univerzitní nemocnici nejvyšší mortalitu u infekcí způsobuje kmen *Pseudomonas aeruginosa* (20).

1.1.4 SIRS

Tato zkratka označuje systémovou zánětlivou odpověď (z angl. systemic inflammatory response syndrom) – je definována přítomností dvou nebo více následujících kritérií (6):

tělesná teplota > 38 °C nebo < 36 °C

srdeční frekvence > 90/min.

dechová frekvence > 20/min

leukocytóza nebo leukopenie

1.1.5 Seps

Pokud je SIRS důsledkem prokázaného infekčního procesu, jedná se o sepsi (9).

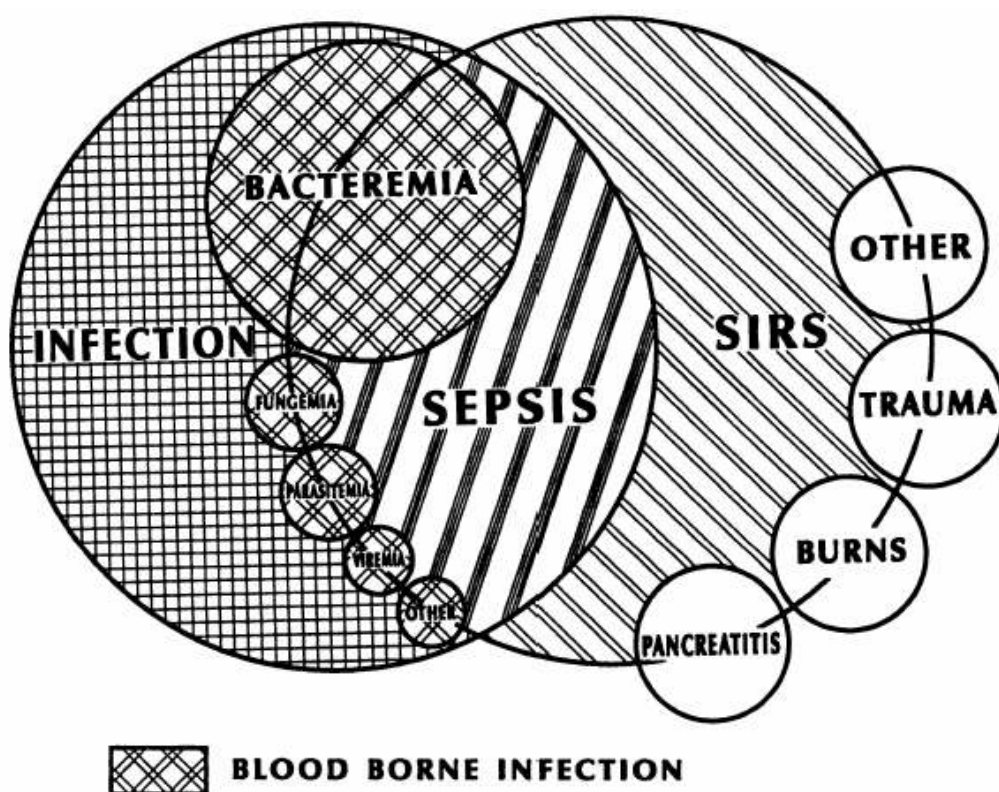
V moderním pojetí je seps systémovou odpovědí na infekci a není spojena s určitým agens. Považuje se za syndrom, který za určitých okolností může vyvolat jakýkoli mikroorganismus. Klinické příznaky jsou stejné jako u SIRS (6). Podle jejich intenzity můžeme rozlišit tři formy či stupně: sepsi, těžkou sepsi, septický šok. (15)

Nejvíce jsou sepsí ohroženi pacienti na jednotkách intenzivní péče (6), s řízeným dýcháním, po úrazech či operaci mozku, transplantacích atd. Nebezpečí vzniku seps zvyšují vnější zásahy jako imunosuprese vyvolaná antibiotiky a chemoterapií, infúze, centrální venózní katetry a močové periferní katetry (28).

Zvyšující se výskyt sepsí v posledních desetiletích lze vysvětlit stále agresivnějšími strategiemi ve všech oblastech medicíny. Je ošetřováno stále více pacientů ve vyšším věku s větším počtem základních onemocnění. Iatrogenní zásahy obecně představují zvýšené riziko a oslabují obranné mechanismy pacientů. Lze je shrnout takto(6, 12):

- Porušení integrity kůže.
- Katétry a plastické hadice umožňují infekčním původcům cestu do těla.
- Léky a těžké operace mohou oslabit hormonální a buněčnou obranyschopnost.
- ATB snižují ochrannou flóru a umožní potenciálním patogenům růst a množit se.
- Mění se pH v zažívacím traktu a na kůži.

Významným rizikovým faktorem je i délka pobytu v nemocničním zařízení. Například pobyt pacienta s kandidovou sepsí se prodlužuje i na 30 dní a to je další příčina přispívající ke špatné prognóze kandidové sepse. Dlouhodobý pobyt samozřejmě vede i ke zvýšení nákladů spojených s léčbou (12). Kromě předcházející antibiotické léčby a doby hospitalizace jsou rezistentní bakterie asociovány s přítomností umělých materiálů (umělé kloubní náhrady, cévní či močový katétr, apod.). U dlouhodobé aplikace těchto materiálů může docházet k tvorbě biofilmu na jejich povrchu (34). Průnik antibiotik do těchto biofilmů je velmi omezený a dovoluje bakteriím osidlujícím tyto povlaky kontakt se subterapeutickými koncentracemi antibiotik vedoucí k zvýšené resistenci (11).



Obrázek 1: Vztah mezi SIRS, sepsí a infekcí (6).

1.1.6 MODS

Zkratka MODS vznikla z angl. Multiple organ dysfunction syndromme, do češtiny je překládána jako mnohočetná orgánová dysfunkce. Je to stav, kdy je přítomná změna dvou a více orgánových systémů a bez terapeutického zásahu organismus neudrží homeostázu (6).

Primární MODS – vyvolán neinfekčním inzultem (trauma, popálení, pankreatitis a jiné příčiny) (6).

Sekundární MODS – vyvolán těžkou sepsí provázenou septickým šokem s hypoperfúzí orgánů(6).

1.1.7 Infekce cévních katétrů (katetrové sepse)

Rozšíření užívání katétrů s sebou přineslo i problém - nárůst katetrových infekčních komplikací, ale i přesto si medicínu bez používání plastových katétrů nelze představit. Cévní katétrů totiž poskytují nezbytný cévní přístup. Nejvíce jsou využívány periferní venózní katétrů, ale většina katetrových infekcí je spojována s centrálními venózními katétrů, především u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Zde je často nutné udržovat centrální venózní přístup po dlouhou dobu, s katétreem může být manipulováno i několikrát denně z důvodu podávání tekutin, léků a krevních produktů, měření hemodynamické rovnováhy nebo získání vzorků krve pro laboratorní analýzu (12). Jeden z názorů říká, že kolonizace katétru se sníží, budeme-li pravidelně měnit místo vstupu. Kowalewska tento názor s odkazem na svou studii odmítá (19).

Výskyt je závislý na typu použitého katétru, na frekvenci manipulace s katétreem a na faktorech příslušejících pacientovi (základní choroba a její intenzita). Ačkoli je výskyt lokálních infekcí nebo infekcí krevního řečiště souvisejících s tímto typem katétrů obvykle nízký, z důvodu frekvence jejich použití jsou zaznamenávány vážné infekční komplikace.

V některých případech jsou katétrů zaváděny v naléhavých situacích, během nichž nemusela být pravidla asepsy náležitě dodržena. To vše zvyšuje riziko kontaminace a následné klinické infekce. Katetrové infekce způsobují zvýšení morbidity i mortality, stejně tak jako nárůst nákladů na léčbu a hlavně prodloužení hospitalizace pacientů (8).

Nejčastějšími původci katetrových infekcí jsou koaguláza negativní stafylokoky, *Staphylococcus aureus* a kvasinky.

1.1.8 Biofilm

Jedna z definic uvádí, že biofilm je strukturované mikrobiální společenství, uložené v mezibuněčné hmotě. Má schopnost adherovat na inertní i živé povrchy v přírodních i laboratorních podmínkách. Slizovitá mezibuněčná matrix je tvořena exopolysacharidy mikrobiálního původu. Není však jednodušá. Obklopuje jednotlivé buňky i mikrobiální mikrokolonie a spolu s nimi vytváří složité struktury obsahující volné, poměrně široké prostory či kanálky, kterými proudí voda (případně krev). Ta se stará o přísun živin a odvod zplodin metabolismu (36).

Tvorba biofilmu začíná tím, že se na povrch ponořený do vodního prostředí nejdříve adsorbují organické molekuly. Pak následuje rychlé přichycení různých bakterií k povrchu. Při bakteriální kolonizaci někdy dochází k prostorové kompetici(15).

Bakterie rostoucí v podobě biofilmu se svými fenotypickými vlastnostmi výrazně liší od bakterií planktonických. Přilnutí bakterií na nějaký povrch inicijuje činnost genů pro tvorbu extracelulárních polymerů(36). V makroorganismu pak vzdorují účinku fagocytů, protilátek a antibiotik, které jinak spolehlivě likvidují planktonické bakterie (13, 34, 35). Souli uvádí, že antibiotická účinnost rifampinu a clindamycinu se přítomností biofilmu stafylokoků nemění (32).

Za příznivých podmínek se z povrchu zralého biofilmu odlučují jednotlivé planktonické bakterie, případně celé shluky. Mohou se tak šířit a kolonizovat nové oblasti.

Jako první byla provedena kvalitativní metoda produkce slizu Christensenem a spol. v roce 1985. Ve svých studiích zaznamenal rozdíl v produkci biofilmu mezi médiem s glukózou a neobohaceným médiem. V současné době je Christensenova metoda využívána a modifikována různými autory. Modifikace spočívají ve změnách objemu a koncentrace suspenze bakterií, používané půdě a délce inkubace. Výhodou této metody je využití u širokého spektra bakteriálních kmenů(12).

Další metodou diagnostiky biofilmu je kultivace stafylokoků na agaru s kongočervení. Citlivost a přesnost kultivace je v porovnání s Christensenovou metodou

velmi nízká(21, 30). K diagnostice biofilmu se dá využít i metoda PCR, pomocí níž se určuje přítomnost a procentuální zastoupení *ica* lokusu, jakožto faktoru virulence stafylokoků (1).

1.2 Nejčastější původci infekcí krevního řečiště

Frekvence bakteriálních patogenů, které se podílejí na etiopatogenezi infekcí krevního řečiště, se v posledních dvou desetiletích výrazně změnila. V současnosti došlo ke zvýšení četnosti koaguláza negativních stafylokoků a enterokoků. Mezi mikroorganismy s rostoucí absolutní četností výskytu patří i kandidy. Výskyt bakteriálních patogenů je výrazně ovlivněn skladbou pacientů a jejich základním onemocněním. (12).

V roce 2001 byla provedena studie trvající pět měsíců, která měla detekovat nejčastější původce infekcí krevního řečiště a jejich rezistenci na antibiotika a chemoterapeutika. Zúčastnilo se jí 12 pracovišť – byla vybrána tak, aby pokryla území celé České republiky. Ve stejném počtu byly zařazeny malé i velké zdravotnické instituce. Maximální počet kmenů z jednoho pracoviště bylo sto po sobě jdoucích gramnegativních izolátů z krve (souhlasících s podmínkami výběru). Ve studii byly zahrnuty gramnegativní tyčky zachycené z krve pacienta pomocí automatického hemokultivačního systému. Muselo se jednat o první záchyt určitého kmene u pacienta hospitalizovaného v daném zdravotnickém zařízení. Další podmínkou byla potvrzená vazba mezi zachyceným bakteriálním kmenem a diagnózou infekční komplikace. V období červen až říjen 2001 bylo zachyceno 831 bakteriálních kmenů. Jednomu kmeni odpovídal právě jeden pacient s jednoznačně diagnostikovanou bakteriální infekcí krevního řečiště. Nejčastěji byly identifikovány kmeny *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*. Dohromady tvořily 66% všech gramnegativních původců. Ostatní původci se vyskytovaly s četností do 7% (17).

Další studie se zaměřila na grampozitivní původce infekcí krevního řečiště. Cílem bylo stanovení incidence a analýza rezistence zjištěných bakteriálních kmenů k antimikrobním přípravkům. Studie se zúčastnilo 15 zdravotnických zařízení v České republice po dobu čtyř měsíců (leden – duben 2003). Zachycené kmeny opět musely splňovat několik podmínek. U pacientů s aplikovanými umělými materiály v krevním oběhu byl mikrobiologicky vyšetřen i daný materiál. Z výsledků vyplynulo, že

nejčastějšími identifikovanými kmeny byly *Staphylococcus aureus* (39%) a koaguláza negativní stafylokoky (34%). Z celkového počtu 32 pacientů, u nichž byl jako zdroj infekce určen umělý vstup do krevního oběhu, byly v 11 případech izolovány kmeny *Staphylococcus sp.* současně z periferní krve i kanyly. V 32% případů se jednalo o katetrové infekce, což potvrzuje, že přítomnost umělého materiálu je rizikovým faktorem vzniku infekce krevního řečiště. Četnost stafylokoků s pozitivním průkazem biofilmu činila 49%, čímž byla dokázána jeho klinická významnost (18).

1.3 Mikrobiologická diagnostika

Mezi přímé metody mikrobiologie řadíme mikroskopii, kultivaci na vhodných půdách, imunochemický průkaz původce, genetické důkazy přítomnosti bakteriální DNA nebo RNA, případně chemický průkaz látek charakteristických pro daný mikroorganismus(21).

1.3.1 Přímé průkazy původce

Podstata spočívá v nálezu mikroorganismu ve vyšetřovaném vzorku. Může být mrtvý či živý. Stačí nalézt jen jeho část, povrchovou strukturu nebo charakteristické látky (nukleové kyseliny, enzymy, toxiny a jiné)(21).

- a) mikroskopie - málo citlivá, ale rychlá a levná metoda
 - převládá diagnostické barvení podle Grama
- b) kultivace - dostatečně specifická i citlivá, ale pomalá
 - vypěstování a pomnožení bakterií na vhodných půdách
- c) citlivost na antibiotika – velmi důležitý výsledek pro lékaře
 - diskový difúzní test nebo minimální inhibiční koncentrace

průkaz bakteriálních složek – mikrobiálních antigenů nebo nukleových kyselin

1.3.2 Nepřímé průkazy původce

Jedná se o průkaz etiologického agens pomocí stop, které zanechal v organismu. Nejčastěji jde o průkaz protilátek. Nepřímé metody se používají většinou ve virologii a parazitologii(21).

- a) precipitace a aglutinace
- b) komplementfixační reakce (=KFR)
- c) neutralizační reakce

d) imunochemické metody - přímá imunofluorescence, ELISA, western blot/blotting

1.3.3 *Další možnosti průkazu mikroorganismů (31)*

- Speciální mikroskopické vyšetření – barvení akridinovou oranží (diagnostika katetrové sepse)
- Radiometrická metoda – kultivační médium obsahuje radioaktivně značenou glukózu nebo aminokyseliny
- Plynová chromatografie – průkaz produkce mastných kyselin bakteriemi
- Mikrokolorimetrie – hodnotí teplo produkované rostoucími bakteriemi
- Indikace vývoje plynu – mechanicky nebo spektrometricky
- Membránová filtrace
- Centrifugační metoda
- Průkaz endotoxinu v krvi
- Diagnostická hemoperfuze

1.4 Diagnostika infekcí krevního řečiště

Laboratorní diagnostika IKR je založena na biochemických, hematologických a mikrobiologických vyšetřeních. Výjimečně se mohou uplatnit jiné obory (např. patologie)(12).

1.4.1 *Biochemické a hematologické vyšetření*

Obvykle je pozorována leukocytóza s masivním posunem doleva (> 12 000/mm³). Krevní obraz odhalí přítomnost nezralých forem. Výsledky dalších vyšetření mohou ukázat i pokles trombocytů, pokles železa v séru, anémii. Může dojít i k vzestupu zánětlivých parametrů, hypoalbuminémii, hyponatrémii i hypofosfatémii.

1.4.2 *Mikrobiologická diagnostika*

Během historie prodělala značný vývoj od klasické hemokultivace po nejmodernější molekulárně biologické metody(12).

1.4.3 *Klasická hemokultivace*

Klasické hemokultivace vyžadují nejprve pomnožení v tekutém prostředí, následuje zhotovení subkultur a přesná identifikace původce. Inokulace krve se může provádět dvěma způsoby. Jedna možnost je inokulace přímo u lůžka pacienta, a to do

několika tekutých kultivačních půd obsahujících antikoagulační a antibaktericidní látku popřípadě ještě tuhou agarovou půdu . Druhá možnost je provést inokulaci do nádobky bez živné půdy, která bude opět obsahovat antikoagulační a antibaktericidní látku. Po odběru krve se hemokultivační nádobka okamžitě transportuje do příslušné laboratoře, kde se provede vyočkování na sérii půd včetně kvalitního krevního agaru. (31, 36)

Používané tekuté půdy by měly mít co nejvyšší citlivost a široké spektrum detekce klinicky důležitých mikroorganismů. Jsou to např. trypton sójový nebo tryptózový bujón, mozko-srdcová infuze.

Inkubační teplota je zásadně okolo 35°C. Regulátory teploty u inkubátorů totiž mohou mít 1 – 2° odchylku a kvůli tomu by mohlo i při nepatrném výkyvu dojít k inaktivaci některých mikroorganismů, např.gonokoků či pneumokoků. Pokud je důvodem odebrání vzorku podezření na bakteriémií vyvolanou infuzí kontaminovaného roztoku, plazmy nebo krve doporučuje se teplota 22°C, při které rostou psychrofilní bakterie.

Hemokultivační nádobky a půdy se denně prohlížejí a vyočkovávají. Pozoruje se zákal, tvorba plynu, hemolýza, rostoucí kolonie. Pokud se kolonie objeví, zhotoví se preparát podle Grama a provede se vyočkování na subkultivační půdy. Po vyočkování se aerobní plotny inkubují v prostředí s 10% CO₂ a anaerobní plotny se inkubují za anaerobních podmínek.(31)

1.5 Typy hemokultivačních systémů

Laboratoře mají na výběr z mnoha typů hemokultivačních automatů. Faktory rozhodující o vhodnosti hemokultivačního systému jsou rychlost detekce, velikost laboratoře nebo spektrum vyšetření, které provádí. Každopádně musí laboratoř na začátku počítat s vysokou finanční zátěží. Rychlejší diagnostika ale umožní rychlejší návrh terapie a tím zkrácení hospitalizace pacienta, z čehož se dá usuzovat na snížení nákladů oddělení poskytujícího léčebnou péči. V konečné fázi přináší pořízení automatizovaného hemokultivačního systému profit jak pacientovi, tak laboratoři.

Základní rozdělení hemokultivačních systémů je na manuální a automatizované. Mezi manuální řadíme systémy klasické, bifázické, centrifugační.

1.5.1 Manuální hemokultivační systémy

a) klasické

- *DULAB* – výrobek firmy Dulab, Dubná (Česká republika). Pro tento hemokultivační systém existují tři typy nádobek (aerobní, anaerobní, pediatrický).
- *SIGNAL* – výrobek firmy OXOID, Basingstoke (Anglie). Systém je založen na indikaci vývoje plynu, který v nádobce vzniká při růstu mikroorganismů. Pro záchyt používají jen jeden typ lahvičky. Skládá se ze dvou částí. První je klasická hemokultivační lahvička s tekutým médiem, uzavřená zátkou s gumovým středem pro vpich jehly s krví. Druhou část tvoří plastová průhledná nádobka. Na spodní straně je dlouhá jehla a na vrchu je víčko s odvětráváním. Po inokulaci krví se na lahvičku napíchne plastová nádobka tak, aby jehla zasahovala do kultivačního media. Lahvičky se inkubují na třepačce. Výsledkem růstu mikroorganismů je tlak, který dokáže vytlačit směs krve a média jehlou do průhledné hlavy. Tak je opticky indikována pozitivní nádobka.

b) bifázické (dvoufázové)

- Hemoline – výrobek firmy BioMérieux, Lyon (Francie). Slouží k izolaci a identifikaci aerobních mikroorganismů. Jde o šestistěnnou nádobku, která obsahuje tuhý transparentní agar, tryptysojový bujón a 0,025% antikoagulans SPS. Do nádoby se injikuje 5 – 10 ml krve. Inkubace probíhá při 35 – 37°C ve vertikální či horizontální poloze. Růst mikroorganismů je patrný během 5 – 7 dnů.
- Septi–Chek – výrobek firmy Hoffmann-La Roche Diagnostics, Basel (Švýcarsko). Bifázické lahvičky Septi-Check obsahují tekutou půdu a agarovou destičku. Po inokulaci krve do bujónu se lahvička obrátí tak, aby směs média a krve smočila agar. Růst bakterií se je detekován vytvořením kolonií, zákalem nebo hemolýzou v médiu.

c) centrifugační

- Izolátor – výrobek firmy Oxoid, Wampole Laboratories, Cranbury. Tento manuální hemokultivační systém využívá tuby s 0,7 ml vodného roztoku, který

obsahuje saponinm propylenglykol a SPS. Tuba se inokuluje 6 ml krve. Během následné centrifugace dochází k rychlé lýze buněk (díky tomu dojde i k uvolnění intracelulárních mikroorganismů), k inhibici fagocytózy a neutralizaci baktericidní aktivity séra. Sediment se poté vyočkuje na kultivační půdy. Typ použité půdy se odvíjí od očekávaného patogena. Systém Izolátor má dva typy. Izolátor 10 je určený pro vzorky dospělých pacientů. Izolátor 1,5 je vhodný pro použití v pediatrii. Stačí inokulace 0,5 – 1,5 ml krve a ani není nutná centrifugace (10,31).

1.5.2 *Automatizované hemokultivační systémy*

Tyto systémy u každé pozitivní hemokultury uvádí hodnotu TTD = detekční čas (z angl. time to detection). Detekční čas je doba od vložení nádoby do přístroje do chvíle vyhodnocení pozitivivity. Nedojde-li do 7 dnů k označení lahvičky za pozitivní, je hemokultura považována za negativní. Je možné snížit maximální kultivační dobu ze sedmi na pět dnů, aby se navýšila kapacita přístroje.

- *Vital* – výrobek firmy BioMérieux, prezentován jako první automatický přístroj pro hemokultury pracující na principu přirozené fluorescence. Molekuly prezentované firmou BioMérieux vykazují pokles přirozené fluorescence při biologických jevech, jimiž se mikroorganismy projevují a to bez ohledu na druh metabolického procesu. Všechny mikroorganismy totiž při růstu produkují CO₂ a tím způsobují změnu pH a redox potenciálu média. Vital měří fluorescenci v kultivační nádobce každých 15 min, 24 hod denně. Jde o neinvazivní metodu, takže můžeme vyloučit riziko kontaminace.
- *Bactec* – první systém pod tímto názvem uvedla na trh firma Jonston Laboratories (nyní Becton Dickinson) v 70. letech. Byl to otevřený systém detekující radioaktivní CO₂. Kultivační lahvička obsahovala glukózu značenou radioaktivním uhlíkem. Při růstu bakterií docházelo k metabolické přeměně glukózy na radioaktivní CO₂. Přístroj pomocí jehly odebíral vzorky atmosféry a měřil radioaktivitu. Pokud byla dostatečně vysoká, pozitivní lahvička se vyočkovala běžným způsobem na kultivační půdu. Velkou nevýhodou tohoto systému byla práce s radioaktivními reagensy a zvýšené riziko kontaminace vzorku. V 80. letech vyvinula firma Becton Dickinson otevřený systém měřící

hladinu CO₂ spektrofotometricky. Výhodou bylo nahrazení radioaktivních reagensů infračervenou spektrofotometrií, ale nadále zůstávala nevýhoda otevřeného systému – vyšší riziko kontaminace. Navíc byla spektrofotometrická detekce pomalá. Průběh měření (odsávání atmosféry) a zpracování pozitivních lahvíček zůstal stejný.

Velké zlepšení mikrobiologické diagnostiky způsobil vývoj kontinuálně měřících hemokultivačních systémů. Mezi výhody patří především neinvazivní metody měření, manipulace s lahvíčkou pouze při vkládání a vyjmutí, snížení detekčního času díky kontinuálnímu měření a v neposlední řadě také vznik společné kultivační, třepací a detekční jednotky. Firma Becton Dickinson na trh uvedla nový typ systému Bactec - řadu 9000. Systémové označení 9050, 9120 nebo 9240 udává kolik hemokultivačních nádobek je systém schopen najednou zpracovávat (50, 120 nebo 240). Hemokultivační systémy Bactec dokáží detekovat růst mikroorganismů během inkubace. Přístroj vysílá každých 10 minut světelný paprsek o definované vlnové délce přes dno nádoby k senzitivní vrstvě. Ta se aktivuje, ale po vyzáření se vrací do původního stavu. Množství a kvalita vyzářeného světla je závislá na pH, které CO₂ snižuje. Detektor vyzářeného světla tedy nepřímo pomocí změn fluorescence měří tvorbu CO₂ v nádobce, což znamená, že měření je neinvazivní. Signály z detektorů vyhodnocuje počítač a opticky i akusticky hlásí přítomnost pozitivní hemokultury.

- *BacT/Alert* – plně automatický hemokultivační systém. Na trh byl uveden v roce 1990 firmou Organon Teknika (USA), která jako první přišla s principem membránou odděleného senzoru od kultivačního média. Detekce je kolorimetrická na základě změny barvy senzoru vlivem poklesu pH v kultivačním médiu. Je tvořen vlastním přístrojem, počítačem a kultivačními nádobkami několika typů. Současně dochází k inkubaci, protřepávání a kontinuálnímu monitorování vzorků. Systém poskytuje kvalitativní vyšetření a záchyt mikroorganismů (aerobních i anaerobních) z krve i v případě, kde je předpokládáno velké zředění a obtížný záchyt.

Nyní výrobu převzala firma BioMérieux a na trhu je k dostání nový typ: BacT/Alert 3D, který se od původní verze liší především vzhledem.

1.6 Využití hemokultivačních systémů ke kvantitativní kultivaci

Pro kvantitativní stanovení počátečního množství bakterií v odebrané krvi lze využít centrifugační systém Isolator nebo automatizované systémy Bactec a Bact/Alert.

- Isolator

Centrifugací se separují v krvi přítomné bakterie. Jejich množství je možné stanovit klasickými metodami pomocí ředění a vyočkování na pevné kultivační půdy s následným počítáním kolonií.

- Automatizované systémy

V případě positivity se na základě izolovaného agens a detekčního času může stanovit kvantita. Kultivace v hemokultivační lahvičce zajišťuje dostatečně široké spektrum zachycených bakterií a vysoce kvalitní kultivační prostředí. Detekční časy patogenních bakterií přítomných v kvantitě 10^3 a více dávají předpoklad prvních výsledků již během 10 – 15 hodin.

Kvantita bakterií se určuje dosazením TTD do rovnic závislosti TTD na počtu inokulovaných CFU pro jednotlivé species a podle tabulky hraničních hodnot TTD.

Korelace s klinickým stavem pacienta: výsledek kvantitativního mikrobiologického vyšetření by měl být konzultován s ošetřujícím lékařem. Při hodnocení klinického stavu byly brány v úvahu především následující klinické a laboratorní parametry:

- klinické parametry třesavka, hypertermie (tělesná teplota >38 °C) a/nebo hypotermie (tělesná teplota $<35,6$ °C), tepová frekvence >90 /min, tachypnoe (>20 dechů/min)
- o laboratorní parametry leukocytóza s posunem doleva ($>12\ 000$ /mm³, >10 % nezralých forem) a/nebo leukopenie ($<4\ 000$ /mm³), zánětlivé markery (např. CRP, interleukiny).

1.7 Hemokultivační systémy použité pro měření detekčních časů

1.7.1 Bactec 9240

Základem hemokultivačního systému Bactec 9240 je tepelně izolovaná a temperovaná dvoukřídlová skříň. Uvnitř jsou vodorovně umístěny výkyvné kovové bloky s válcovými otvory – buňkami, do kterých se kultivační nádobky vkládají. Vedle každé buňky je umístěna dvoubarevná (červená a zelená) světelná dioda označující místo k vložení či vytažení lahvičky. Za buňkou je umístěna dioda a fotodioda. Světlo, které dioda emituje, je pohlcováno fluoreskujícím materiálem v senzoru lahvičky. Senzor indukující tvorbu CO₂ je umístěn na dně kultivační nádobky a od kultivačního média je oddělen membránou. Fotodioda funguje jako detektor hladiny fluorescence, která se stoupající koncentrací CO₂ klesá. Zároveň dochází i k poklesu pH.

Naměřená data se zpracovávají v mikropočítači, který je součástí každého bloku. To umožňuje programovat každou buňku samostatně a kultivovat vedle klasické hemokultivační lahvičky a mykologické nebo mykobakteriální lahvičky s delší dobou kultivace.

Pozitivní lahvička je vyhodnocována pomocí několika algoritmů funkčně podobných algoritmům u přístroje BacT/Alert. Systém Bactec má navíc funkci, která umožňuje správné vyhodnocení růstu bakterií i u lahviček, kde došlo k prodloužení doby transportu do laboratoře.

Při výpadku energie zabezpečuje regulaci napětí náhradní zdroj. Dál dochází k testování a to až do doby spotřebování energie v bateriích UPS.

K řídicímu počítači se dá připojit až 5 inkubačních přístrojů. Pokud dojde k havárii počítačového systému, je spuštěn systém Fall Back Mode, který dál dokáže indikovat pozitivní/negativní lahvičky a volné buňky připravené k vložení nových kultivačních lahviček.

Každý přístroj má nastavitelnou teplotu kultivace. Skříně ale nemají možnost chlazení a za chodu se ohřívají, takže není možné je v našich klimatických podmínkách použít pro kultivaci při běžné pokojové teplotě (22°C). Doporučená teplota kultivace je 35 – 37°C. Doba kultivace hemokultur je 5 – 7 dní, ale v závislosti na typu lahvičky se dá doba kultivace změnit.

• *typy hemokultivačních lahviček(4):*

Standardní aerobní nádobky (Bactec Standard aerobic/F)

- modrý uzávěr a etiketa

Standardní anaerobní nádobky (Bactec Standard anaerobic/F)

- žlutý uzávěr a etiketa

Aerobní nádobky Plus (Bactec Plus aerobic/F Medium)

- šedý uzávěr a etiketa

Anaerobní nádobky Plus (Bactec Plus anaerobic/F Medium)

- hnědý uzávěr a etiketa

Pediatrické nádobky (Bactec Peds Plus/F Medium)

- růžový uzávěr a etiketa
- nádobky přizpůsobené pro malý objem krve (< 3 ml), proto se používají především v pediatrii u novorozenců a malých dětí nebo u pacientů ve vážném stavu.

Bactec Lytic/10 Anaerobic/F Medium

- fialový uzávěr a etiketa
- v médiu je navíc obsažené lyzované agens, takže senzitivita je až o 60% vyšší oproti klasickému anaerobnímu médiu

Bactec Mycosis IC/F Medium

- zelený uzávěr a etiketa
- selektivní detekce hub a kvasinek z krve
- médium obsahuje antibiotika a saponin

Bactec Myco/F Lytic Medium

- červený uzávěr a etiketa
- neselektivní detekce mykobakterií, kvasinek a hub v krvi
- používají se jako doplněk k lahvičkám Plus Aerobic/F

Písmeno F v názvech označuje, že jde o lahvičky pro systém Bactec (řady 9000), který měří hladinu fluorescence.

Pokud je v názvu slovo “Plus”, jedná se o médium, ve kterém je navíc pryskyřice (sorpční kuličky) inaktivující antibiotika. V obohacených médiích dochází k vyššímu záchytu významných mikroorganismů a u některých bakterií se oproti

běžnému typu média sníží detekční čas. Díky tomu se může zkrátit doba hospitalizace pacienta.

Ve všech lahvičkách je podtlak, který usnadňuje inokulaci krve do lahvičky. Hemokultivační lahvičky jsou opatřeny čárovým kódem se sejmutelnou částí pro potřeby dokumentace. Skladování není náročné – k uchování funkčnosti stačí pokojová teplota (22 – 25°C) a ochrana před přímým světlem.

Firma Becton Dickinson doporučuje odebírat krev od jednoho pacienta do jedné aerobní a do jedné anaerobní hemokultivační lahvičky. Ideální pár: Plus Aerobic/F a Lytic/10 Anaerobic/F.

1.7.2 *BacT/Alert 120*

Hemokultivační přístroj BacT/Alert se skládá z tepelně izolované a temperované skříně, která je tvořena kovovými bloky s válcovými otvory, kam se vkládají kultivační nádoby. Bloky se s lahvičkami během kultivace kývají. Otvory označujeme jako buňky – každá má své číslo a písmeno. Vedle je světelná dioda, která indukuje pozitivitu/negativitu vzorku, případně označuje pozici při vkládání nové hemokultivační nádoby. Za každou buňkou je dioda emitující paprsek červeného světla a měřicí fotodioda. Měření probíhá každých 10 min (31).

Pokud dojde k výpadku elektrické energie, systém je přesto schopen zůstat v činnosti až 24 hod. V tomto nouzovém režimu ale nedochází k ohřívání ani třepání lahviček. Naměřené hodnoty jsou korigovány v závislosti na klesající teplotě a jsou ukládány do paměti.

Přístroj řídí osobní počítač, jehož součástí je zálohový zdroj, snímač čárového kódu lahviček a tiskárna. Počítač průběžně zpracovává naměřená data, přepočítává je na koncentrace CO₂ a vyhodnocuje. Podle firemních údajů k tomu používá tři algoritmy. První hodnotí zvýšení produkce CO₂ oproti počátečnímu stavu, druhý hodnotí rychlost změny hladiny CO₂ a třetí na základě počáteční hodnoty CO₂ detekuje růst mikroorganismů v nádobce ještě před vložením do přístroje (3).

V panelu, který je nad kultivačními bloky, jsou umístěna kontrolní světla indikující pozitivní lahvičku, otevřené dveře nebo případné potíže s funkcí přístroje.

- *typy hemokultivačních lahviček (2,11):*

BacT/Alert SA (standard aerobic)

- pro standardní aerobní kultivaci
- modrá barva víčka a etikety

BacT/Alert SN (standard anaerobic)

- pro standardní anaerobní kultivaci
- fialová barva víčka a etikety

BacT/Alert FA

- obsahuje inhibitory ATB, kultivace aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů z krve a normálně sterilních tělních tekutin
- zelená barva víčka a etikety

BacT/Alert FN

- médium obohacené o inhibitory ATB pro anaerobní kultivaci
- oranžová barva víčka a etikety

BacT/Alert PE (pediatric)

- ideální pro použití v pediatrii nebo u pacientů v těžkém stavu, protože stačí inokulace 0,5 ml krve. Podle firemních údajů je 90% nádobek označeno za pozitivní do 24 hod.
- žlutá barva víčka a etikety

BacT/Alert MB (mycobacterial blood)

- určeny pro detekci mykobakterií v krvi

Ve všech lahvičkách je podtlak, který usnadňuje inokulaci krve do lahvičky. Optimální objem je 10 ml, u lahvičky pediatric jsou 4 ml maximum. Lahvičky jsou opatřeny čarovým kódem s částí, která jde sejmout pro případ archivace. Z počátku výroby byly lahvičky skleněné, ale v roce 2003 byly nahrazeny odolnějšími lahvičkami z plastu. Z hlediska detekce bakterií nebyly mezi skleněnými a plastovými nádobkami zjištěny žádné rozdíly (26). Všechny typy lze skladovat při pokojové teplotě (15 – 30°C) na místě chráněném před přímým světlem.

2. Cíle práce a hypotézy

2.1. Cíle práce

- Srovnání detekčních časů u dvou použitých hemokultivačních přístrojů – zjistit, zda je detekce u jednoho z přístrojů rychlejší.
- Srovnání vybraných bakteriálních producentů biofilmu s bakteriemi netvořícími biofilm.

2.2. Hypotézy práce

- Oba systémy jsou srovnatelné pro identifikaci klinicky významných mikroorganismů od dospělých pacientů. Dále tuto hypotézu označujeme jako nulovou.
- Bakterie produkující biofilm mají stejné detekční časy jako bakterie biofilm neprodukující.

3. Metodika

3.1 Materiál a pomůcky

- Vybrané bakteriální kmeny:
Enterobacter cloacae
Koaguláza negativní stafylokok (blíže neurčený)
Serratia marcescens
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus haemolyticus
Stenotrophomonas maltophilia
- Roztoky a média:
lahvičky Bactec Standard aerobic/F a BacT/Alert standard aerobic
fyziologický roztok
krevní agar
- Pomůcky a přístroje:
skleněné zkumavky
automatické pipety a vyměnitelné špičky
sterilní injekční stříkačky a jehly
třepačka

3.2 Charakteristika souboru

Měřeným materiálem byly bakteriální kmeny odebrané z klinického materiálu pacientů, u kterých byla diagnostikována infekce krevního řečiště. Důležitým kritériem byla tvorba biofilmu, na kterou jsme všechny kmeny testovali. K detekci biofilmu jsme použili krystalovou violet'. Je to levná a přímá metoda, ale nedostačující pro testování kmene *Pseudomonas aeruginosa* (Peeters, 2008).

3.3 Pracovní postup

3.3.1. Test produkce biofilmu

- Do plastové zkumavky se 2 ml TSB (tryptózo sojový bujon) nebo MHB (Mueller-Hinton bujon) (oba s přídavkem 0,25% glukózy) byly naočkovány bakteriální buňky tak, aby výsledný zákal bakteriální suspenze byl 2 stupně Mc Farlanda. Pro

každý kmen byly testovány obě půdy. Zkumavky byly inkubovány 24 hodin při 37°C.

- Naočkování mikrotitračních destiček - ze suspenze buněk bylo připraveno ředění 1:100 příslušným čerstvým bujonem. Naředěná směs byla rozplněna do jamek mikrotitrační destičky po 200 μ l . Takto naočkovaná destička byla inkubována 24 hodin při 37°C.
- Barvení ve zkumavce - předběžný test barvení byl proveden ve zkumavce, která zůstala po první inkubaci. Po odstranění zbytku bujonu byla naplněna 2 ml 1% krystalové violeti, která se nechala 30 minut působit. Po promytí vodou byl vizuálně hodnocen její vzhled. Bezbarvá zkumavka je negativní. Fialové zabarvení po stěnách až do místa, kam barvivo zasáhlo, je výsledkem pozitivním. Barevný prstenec na rozhraní voda - vzduch se jako pozitivní výsledek nehodnotí.
- Barvení mikrotitrační destičky - po inkubaci bylo z mikrotitrační destičky odstraněno médium a planktonické buňky. Je důležité jamky před barvením propláchnout vodou, aby se odstranily na dně usazené shluky bakterií, které by se obarvily a ztížily hodnocení. Propláchnutí musí být provedeno opatrně, aby se nevymyla vrstvu biofilmu. Do všech jamek bylo přidáno 1% krystalové violeti o objemu 200 μ l. Po 20 minutovém barvení byly jamky propláchnuty destilovanou vodou a byla hodnocena přítomnost biofilmu obdobně jako ve zkumavce.

3.3.2 Příprava vzorků

- Inokulum - připraví se z čisté 24 – hodinové bakteriální kultury izolované z klinického materiálu jako suspenze v 1,8 ml sterilního fyziologického roztoku. Zákal suspenze musí odpovídat 0,5 stupně McFarlandovy zákalové stupnice. Suspenzi důkladně roztřepáme a použijeme k dalšímu ředění.
- Ředící řada – z bakteriální suspenze odebereme 0,2 ml a přidáme do dalších 1,8 ml fyziologického roztoku. Tím získáme ředění I (1:10). Z ředění I odebereme 0,2 ml do další zkumavky s 1,8 ml fyziologického roztoku a stejným způsobem postupujeme dál, až získáme ředění VII (1:10⁷).

- inokulace hemokultivačních nádobek – dále pracujeme pouze s ředěními III – VII. Z každého ředění odebereme automatickou pipetou 0,1 ml. Jednou tento objem rozetřeme na petriho misku s krevním agarem a dvakrát přidáme do zkumavek se 3 ml fyziologického roztoku. Vznikne tím roztok, který injikujeme do hemokultivačních nádobek pro systémy Bactec a BacT/Alert pomocí sterilní injekční stříkačky (5 ml) a jehly.
- inkubace – hemokultivační nádoby umístíme do systémů a sledujeme čas do stanovení pozitivita = detekční čas (TTD). Petriho misky s krevním agarem dáme do termostatu na 24 hod při 37°C. Další den, po proběhlé inkubaci, spočítáme vyrostlé kolonie (CFU) na misce příslušného ředění a počet zaznamenejeme do tabulky.

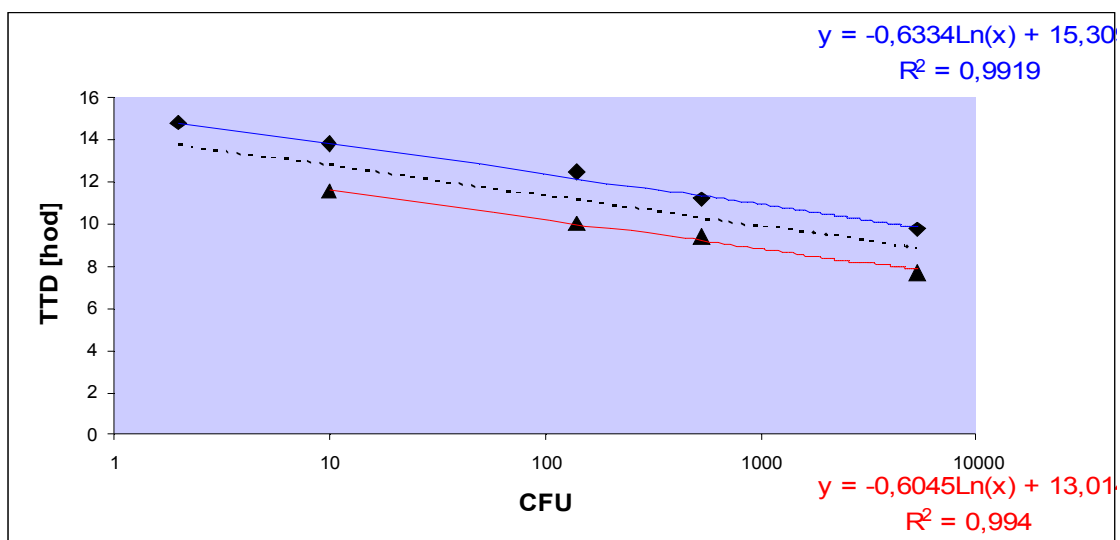
3.4 *Vyhodnocení*

Detekční časy, které hemokultivační systémy naměřily, se zaznamenaly společně s napočítanými počty kolonií do tabulek a podle nich se vytvořily grafy - pro každý bakteriální kmen zvlášť.

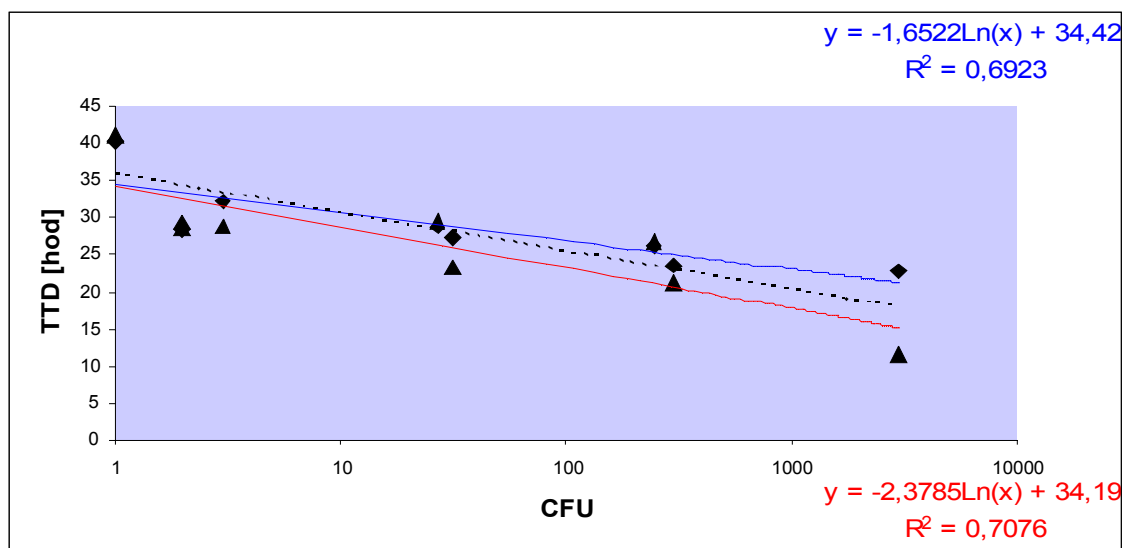
3.4.1. *Grafy*

Nejprve jsme chtěli docílit linearitu grafu, takže jsme osu x , tedy počty kolonií, zlogaritmovali. V grafu jsou vidět 2 typy značek – černý kosočtverec patří hodnotám systému BacT/Alert a černý trojúhelníček systému Bactec. U každého bakteriálního kmene jsme vytvořili tři spojnice trendu. Modře označená patří spojnici vytvořené z hodnot pro systém BacT/Alert, červeně je označená spojnice pro systém Bactec a slabá přerušovaná čára je výsledkem porovnání obou přímek.

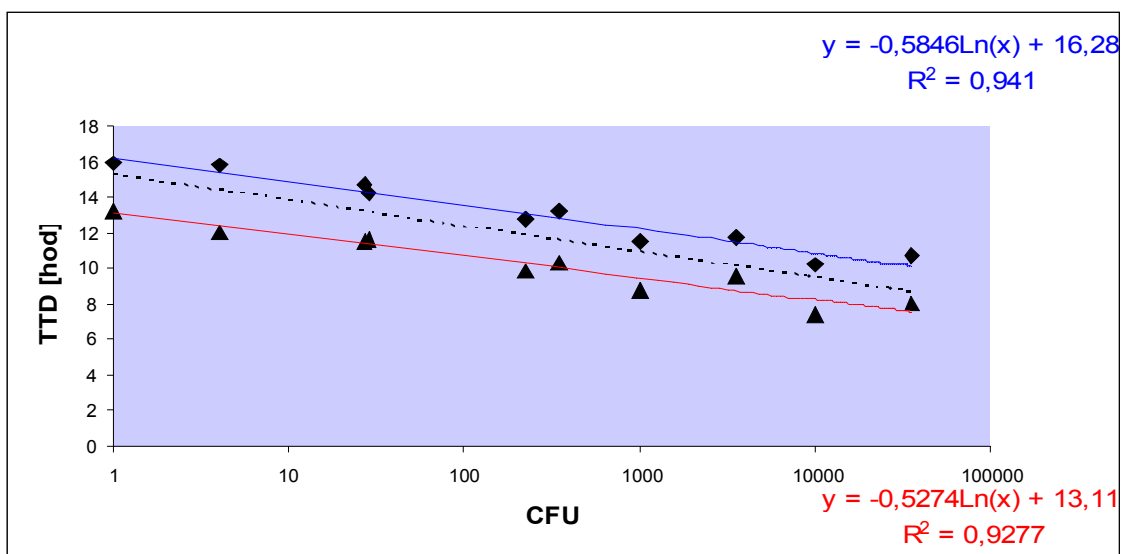
V případě porovnání producenta a neproducenta biofilmu jsme použili stejný postup. Body zastupující neproducenta biofilmu jsou značené modrou barvou, stejně tak i příslušná spojnice trendu. Růžová barva značí producenta biofilmu a jeho spojnici trendu. Slabě přerušovaná čára je spojnici trendu vyjadřující odlišnost přímek.



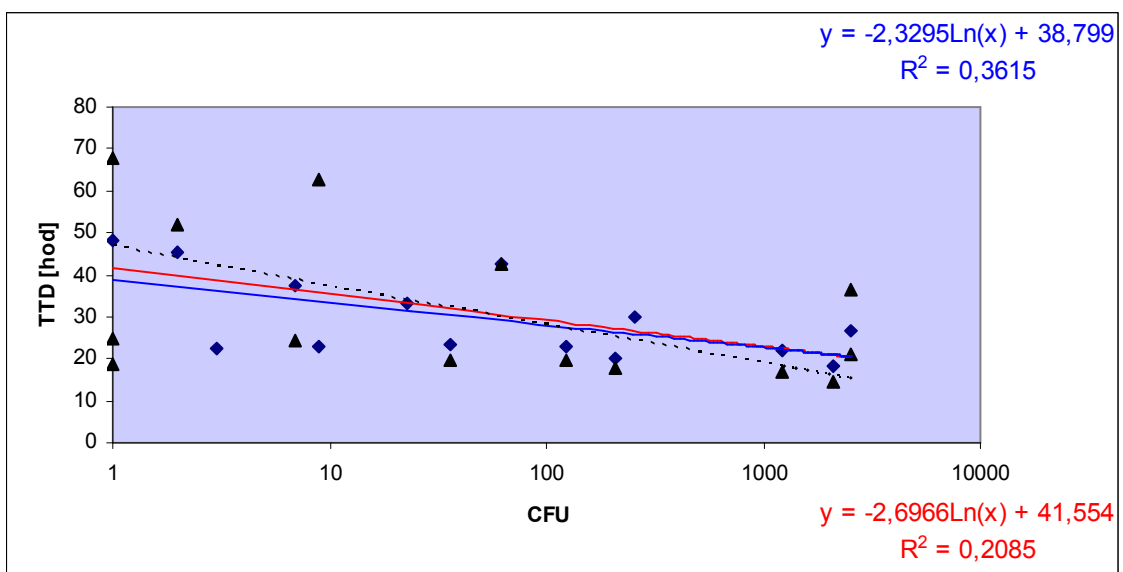
Graf 1: Závislost TTD na CFU u kmene *Enterobacter cloacae*



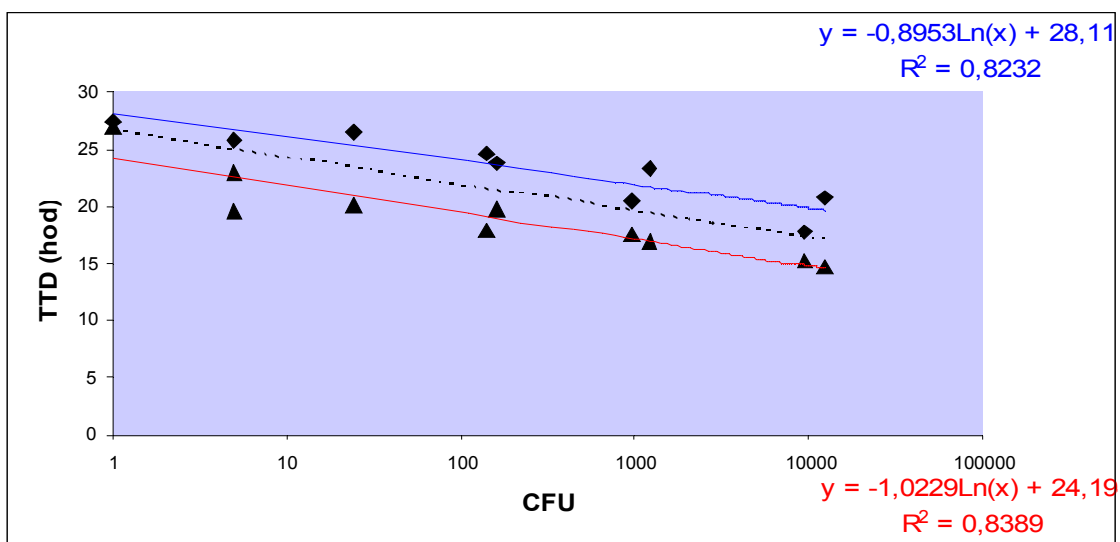
Graf 2: Závislost TTD na CFU u koaguláza negativního stafylokoka



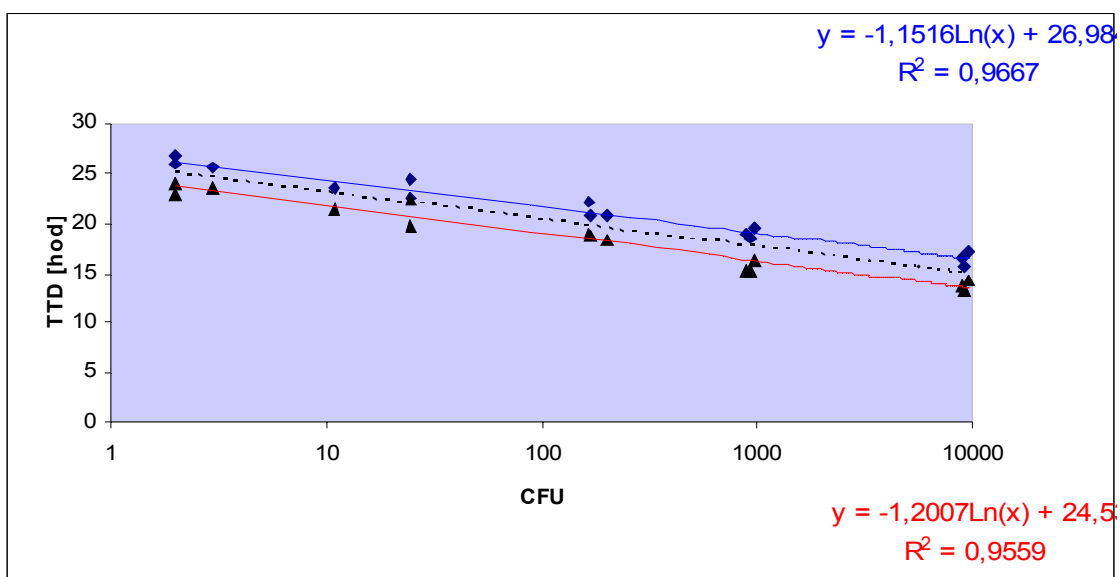
Graf 3: Závislost TTD na CFU u bakteriálního kmene *Serratia marcescens*



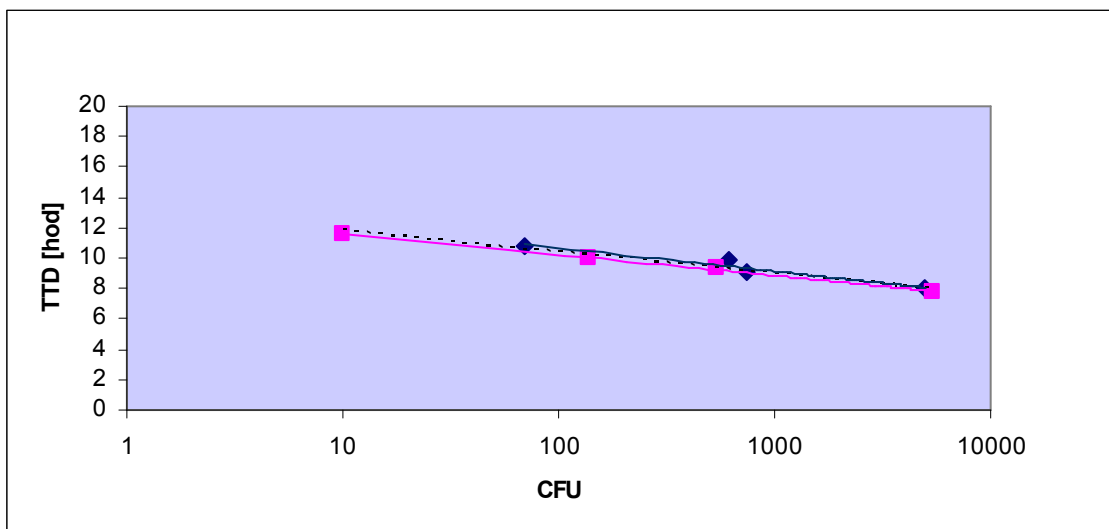
Graf 4: Závislost TTD na CFU u bakteriálního kmene *Staphylococcus epidermidis*



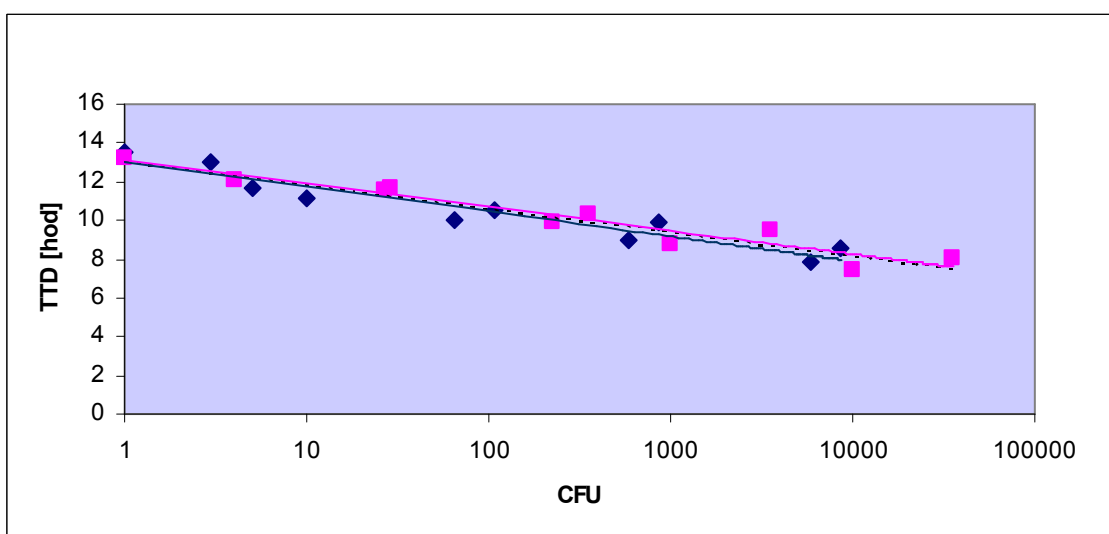
Graf 5: Závislost TTD na CFU u bakteriálního kmene *Staphylococcus haemolyticus*



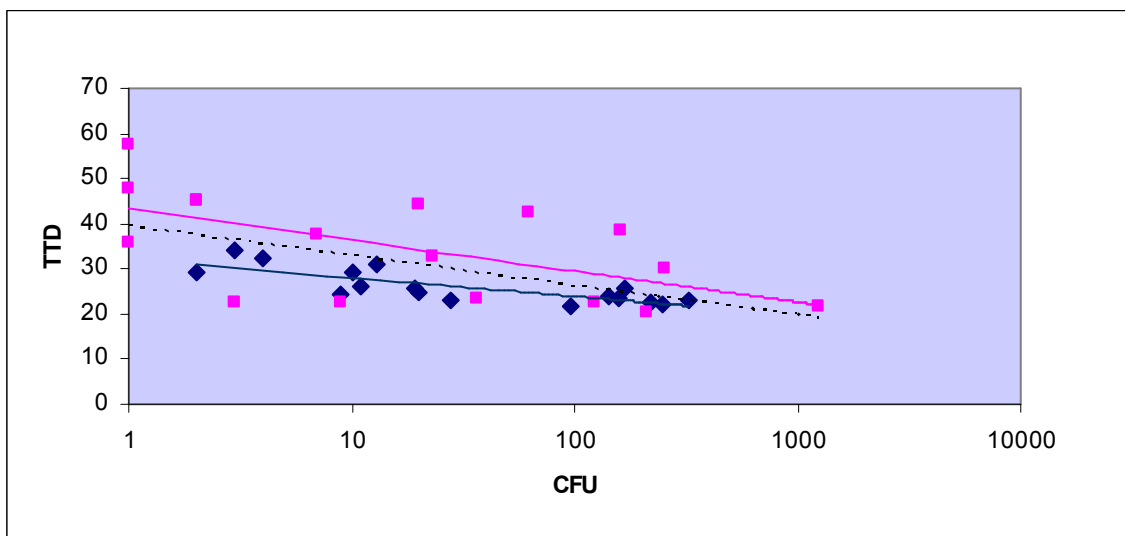
Graf 6: Závislost TTD na CFU u bakteriálního kmene *Stenotrophomonas maltophilia*



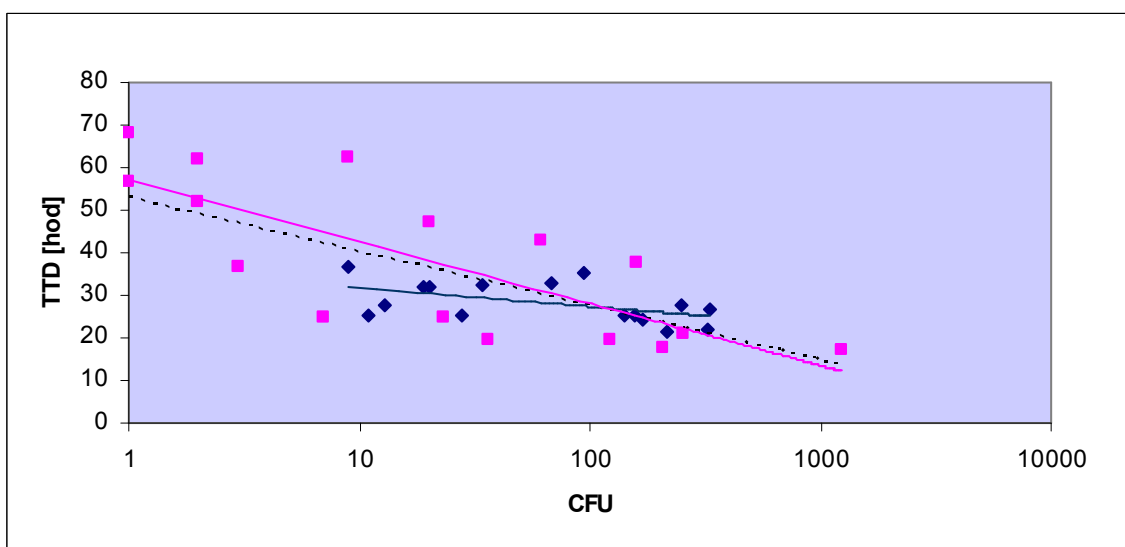
Graf 7: TTD producentů a neproducentů biofilmu kmene *Enterobacter cloacae* (systém Bactec)



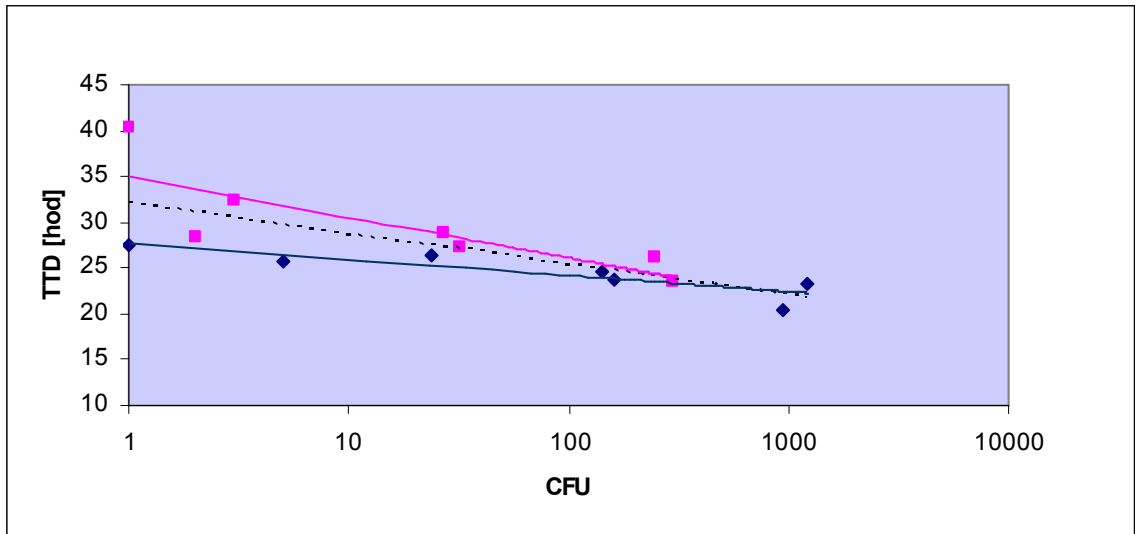
Graf 8: TTD producentů a neproducentů biofilmu kmene *Serratia marcescens* (systém Bactec)



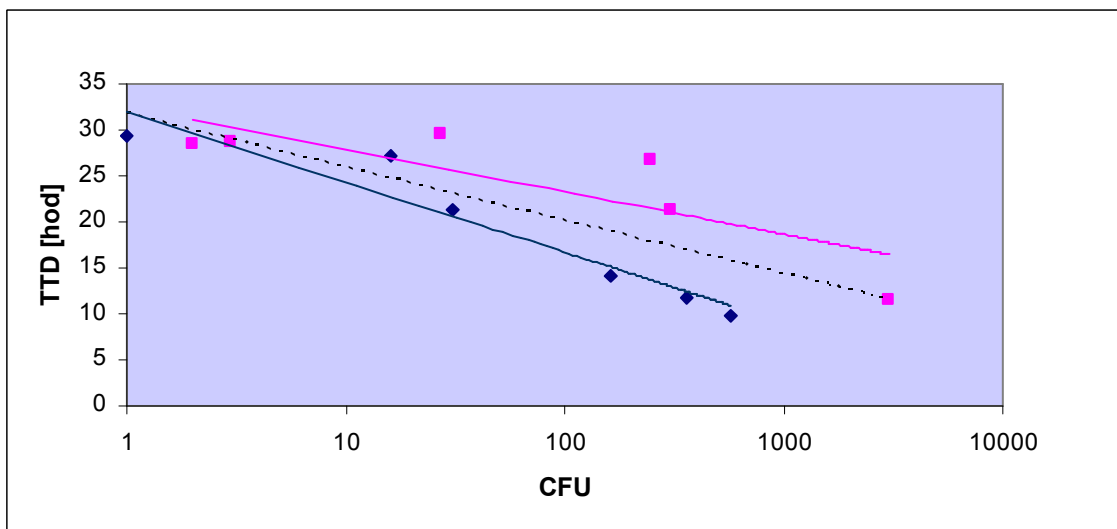
Graf 9: TTD producentů a neproducentů biofilmu kmene *Staphylococcus epidermidis* (systém BacT/Alert)



Graf 10: TTD producentů a neproducentů biofilmu kmene *Staphylococcus epidermidis* (systém Bactec)



Graf 11: TTD producentů a neproducentů biofilmu koaguláza negativního stafylokoka (systém BacT/Alert)



Graf 12: TTD producentů a neproducentů biofilmu koaguláza negativního stafylokoka (systém Bactec)

3.4.2. Statistické vyhodnocení

Základem byl předpoklad, že počet bakterií se zvyšuje exponenciálně podle vzorce $f(t) = b \exp(ct)$, kde t je čas od začátku kultivace do detekce positivity (TTD) a b , c jsou parametry. Růst byl posuzován podle chování derivace $f(t)' = bc \exp(ct)$. Dostatečně velká derivace byla posuzována pomocí rovnice $bc \exp(ct) = D$, kde D je konstanta daná detekčním systémem hemokultivačního přístroje.

Předpokládané množství bakterií na počátku kultivace je označeno písmenem x . To znamená, že od počátku, když jich bylo b , uplynul čas t_1 daný rovnicí $b \exp(ct_1) = x$. Dalšími matematickými úpravami jsme došli k výsledku, že t je lineární funkcí $\ln(x)$.

Pomocí jednoduchých lineárních regresních modelů: $Y_A = \alpha_A + \beta_A \ln(x)$; $Y_B = \alpha_B + \beta_B \ln(x)$, jsme z naměřených hodnot vypočítali regresní parametry α a β . Parametr α představuje posun na ose y a β směrnici křivky. Následně jsme nalezené parametry zhodnotili pomocí t testu, přičemž hypotézy byly $H_0: \alpha_A = \alpha_B$, $H_0: \beta_A = \beta_B$. Pokud t výsledné je menší než t kritické, znamená to, že na hladině $\alpha = 0,05$ mezi parametry není statisticky významný rozdíl.

Pro konečné zhodnocení jsme použili Chowův test na hladině $\alpha = 0,05$, který je vytvořen pro test shodnosti lineárních modelů (rovnost vektorů koeficientů). Výsledkem je hodnota F , která se porovná s kritickou hodnotou F_{kr} , abychom ověřili, jestli je mezi použitými modely statisticky významný rozdíl nebo ne (tab 2). V následující rovnici n odpovídá počtu měření v systému BacT/Alert a Bactec, k je počet výběrů a RSS je residuální součet čtverců. $F = \frac{(RSS - RSS_1 - RSS_2) \cdot (n - 2k)}{(RSS_1 + RSS_2) \cdot k}$, která má na platnosti nulové hypotézy rozdělení $F(2; n - 2k - 2)$.

4. Výsledky

Během 2.pololetí roku 2007 jsme otestovali 6 bakteriálních kmenů, jež splňovaly dvě stanovená kritéria. Bakterie byly označeny za původce infekce krevního řečiště a měli pozitivní test na produkci biofilmu. Suspenze vybraných kmenů jsme kultivovali ve výše popsaných hemokultivačních systémech. Použili jsme hemokultivační lahvičky BacT/Alert standard aerobic a Bactec Standard aerobic/F. Měření jsme se snažili zopakovat minimálně dvakrát (tab 1). Kmen *Enterobacter cloacae* jsme měřili pouze jednou.

Tabulka 2 ukazuje všechny vypočítané statistické hodnoty pro srovnání rychlosti růstu producentů biofilmu v systémech BacT/Alert a Bactec. Hodnoty t-testu jsou dílčí. Hodnota t_a ukazuje odlišnost v úsecích přímek (parametr α) a hodnota t_b popisuje odlišnost hodnot směrnic (parametr β). Pro rozhodnutí zda je rozdíl statisticky významný či ne, rozhoduje především hodnota F. Může se stát, že rozhodnutí nebude zcela shodné - oba parametry mohou ukazovat na statistický rozdíl, ale celek rozhodne proti. Statisticky nevýznamný rozdíl vyšel u kmene *Staphylococcus epidermidis* a u koaguláza negativního stafylokoka. Statisticky významný je rozdíl u kmenů *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Serratia marcescens* a *Stenotrophomonas maltophilia*.

V tabulce 3 najdeme stejné statistické hodnoty jako v tabulce 2, ale tentokrát se jedná o porovnání výsledků detekčních časů u producentů a neproducentů biofilmu. Statisticky nevýznamný rozdíl vyšel u kmenů *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*, které se měřili v systému Bactec. Statisticky významný rozdíl jsme shledali u kmene *Staphylococcus epidermidis* v systému BacT/Alert a u koaguláza negativního stafylokoka v obou systémech.

Tabulka 4 ukazuje průměrné detekční časy jednotlivých kmenů. Nejrychleji byly detekovány kmeny *Enterobacter cloacae* a *Serratia marcescens*. Jejich průměrný detekční čas byl až o 10 hodin kratší než u kmenů *Staphylococcus haemolyticus* a *Stenotrophomonas maltophilia*. Nejdéle trvala detekce koaguláza negativního stafylokoka a kmene *Staphylococcus epidermidis*.

V tabulce 5 najdeme porovnání detekčních časů producentů a neproducentů biofilmu (získané z předešlé studie). Producenti biofilmu mají průměrný detekční čas přibližně o 5 hodin delší. Pouze u kmene *Enterobacter cloacae* a *Serratia marcescens*

jsou detekční časy téměř shodné a u kmene *Staphylococcus epidermidis* je rozdíl 10 hodin.

Do tabulky 6 jsme zaznamenali výskyt falešných výsledků. Falešně pozitivní vzorek nebyl zaznamenán žádný a falešně negativní vzorky byly tři. V systému Bactec byl zaznamenán falešně negativní vzorek při měření kmene *Enterobacter cloacae* a dvakrát při měření kmene *Staphylococcus epidermidis*. Systém BacT/Alert vydal falešný výsledek při měření koaguláza negativního stafylokoka a při měření kmenů *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus haemolyticus*.

Poslední tabulka (tab 7) ukazuje rozptyl hodnot u producenta a neproducenta biofilmu. Největší je rozptyl hodnot je u kmene *Staphylococcus epidermidis*. Naopak minimální rozptyl je u kmenů *Enterobacter a Serratia*.

5. Diskuze

Tato bakalářská práce porovnávala výsledky dvou významných automatizovaných hemokultivačních přístrojů. Sledovány byly detekční časy po inokulaci lahvíček bakteriálními suspenzemi o známé koncentraci. Dále jsme se zabývali odlišností detekčních časů mezi producenty a neproducenty biofilmu.

Podle tabulky s průměrnými detekčními časy (tab 5) systém Bactec oznámí přítomnost bakterií dříve. Jeho časy jsou o dvě, někdy až tři, hodiny nižší. Ke stejnému závěru došel i Endimiani (13) a Mirrett (25). Oba ve svém závěru shodně uvádějí, že průměrné detekční časy odebraných vzorků jsou u systému Bactec kratší než u systému BacT/Alert. Během našeho měření jsme však zaznamenali i výjimku z tohoto závěru. Kmen *Staphylococcus epidermidis* měl nižší detekční čas v systému BacT/Alert (30,04 vs. 31,32). Další studie uvádí, že oba systémy mají srovnatelnou schopnost detekce, ačkoli u gram-pozitivních bakterií byla zaznamenána kratší doba detekce u systému Bactec a naopak u *Enterobacteriaceae* byla sledována rychlejší detekce u systému BacT/Alert (38), což naše výsledky nepotvrdily. Rozdíl mohl vzniknout tím, že autor pracoval s jinými kultivačními médii – použil Bactec aerobic Plus/F a BacT/Alert aerobic FAN, zatímco my jsme použili lahvičky Bactec standard aerobic/F a BacT/Alert SA.

Pokud jde o počty falešně negativních a falešně pozitivních nálezů, studie se v tomto směru odlišují. Během našeho výzkumu jsme nezaznamenali žádnou falešně pozitivní lahvičku. U různých bakteriálních kmenů jsme zaznamenali tři falešně negativní lahvičky u systému Bactec i u systému BacT/Alert, což odpovídá 4,3% (tab 6). Náš výsledek je tedy vyšší než u studie Kocoglu a spol. (16), kteří prokázali u systému BacT/Alert 3D 2,6% falešně negativních lahviček. Většinou se jednalo o grampozitivní koky, 58% z nich tvořili koaguláza negativní stafylokoky, gramnegativní rody tvořili 12,5%. Rozhodně můžeme říct, že jejich výskyt u obou systémů je celkově nízký.

Vezmeme-li v potaz statistické zhodnocení – tedy využití studentova t-testu a Chowova testu, docházíme k závěru, že rozdíl mezi detekčními časy je nevýznamný jen u kmene *Staphylococcus epidermidis* a u vzorku blíže neurčeného koaguláza negativního stafylokoka. U ostatních kmenů nulovou hypotézu zamítáme a naopak

přijímáme hypotézu alternativní, která říká, že mezi detekčními časy zkoumaných bakteriálních kmenů existuje statisticky významný rozdíl.

Vyvstává zde otázka, je-li statisticky významný rozdíl patrný i v praxi. Může se stát, že statistický rozdíl vyjde sice významný, v reálné praxi se ale neuplatní. Pokud bychom využívali detekční časy ke kvantifikaci, vůbec nemusí dojít k podstatným rozdílům. Kultivaci cévního katétru považujeme za pozitivní, pokud je přítomnost CFU větší nebo rovna 1000 a v tomto případě spadají rozdíly do rámce jednoho řádu, což je pro klinické hodnocení nálezu zanedbatelné.

Hodnocení detekčních časů producentů a neproducentů biofilmu je následující. Ve 3 případech, kdy šlo o zástupce stafylokoků, vyšly statisticky významné rozdíly. U kmene *Enterobacter* a *Serratia*, což jsou gramnegativní tyčky, rozdíl v rychlosti detekce nebyl. Z výsledků je patrné, že produkce biofilmu může ovlivňovat dobu detekce v automatických hemokultivačních systémech, což je nový a zatím nepublikovaný poznatek. K ověření tohoto závěru bychom ale potřebovali otestovat více kmenů.

Vysvětlení rozdílných detekčních časů bychom mohli najít ve způsobu tvorby a kontroly biofilmu. U producentů biofilmu dochází ke komunikaci mezi bakteriemi, kterou nazýváme quorum sensing systémy. Tyto QS systémy kontrolují expresi mnoha genů a dokážou tak změnit chování bakterií v okamžiku, kdy hustota bakteriální populace přesáhne určitý práh. U stafylokoků QS systémy více redukuje než indukují tvorbu biofilmu. (37) Tento fakt potvrzuje i graf 9 a 11, kde je vidět, že s rostoucím počtem kolonií, klesá rozdíl mezi detekčními časy producenta a neproducenta biofilmu. Bakterie rostoucí v biofilmu jsou sice chráněny, ale na druhou stranu je omezováno jejich další množení. U stafylokoků by rozdíly v růstu mohly být způsobeny také jejich schopností adherovat na povrchy (34). Vypadá to, že v hemokultivačních lahvičkách rostou bakterie jak planktonicky, tak i ve formě biofilmu. Důkaz tohoto tvrzení, tedy prokázání biofilmu vytvořeného na stěnách hemokultivační lahvičky, tato práce ale nepředkládá. Jaký je poměr těchto dvou forem zřejmě závisí na mnoha faktorech. Příkladem je materiál lahvičky a složení kultivační půdy. Růst bakterií ve dvou formách může být příčinou nejen delších detekčních časů, ale i velkého rozptylu naměřených hodnot (tab 7). Gramnegativní tyčky nemají takovou schopnost adheze na umělé

povrchy, proto i když jsou producenty biofilmu, se detekčními časy neliší. Předpokládáme, že v hemokultivačních lahvičkách rostou v planktonické formě.

6. Závěr

Na oddělení Klinické mikrobiologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze jsme v období od 1.9. do 31.11. 2007 zpracovali 6 bakteriálních kmenů. U většiny kmenů jsme museli zavrhnout nulovou hypotézu, že oba posuzované systémy mají srovnatelné výsledky při identifikaci klinicky významných mikroorganismů odebraných od dospělých pacientů. Jen u kmene *Staphylococcus epidermidis* a u vzorku blíže neurčeného koaguláza negativního stafylokoka se nulová hypotéza potvrdila. Přijali jsme tedy alternativní hypotézu, která říká, že mezi detekčními časy u producentů biofilmu testovaných v systémech BacT/Alert a Bactec je statisticky významný rozdíl. V systému Bactec byla detekce producentů o více než 2 hodiny rychlejší. Jedinou výjimkou byl kmen *Staphylococcus epidermidis*, u něhož byl o 1,5 hodiny rychlejší systém Bact/Alert.

V otázce producentů a neproducentů biofilmu opět zavrhneme nulovou hypotézu a přijímáme hypotézu alternativní. Ta říká, že mezi detekčními časy producentů a neproducentů biofilmu je statisticky významný rozdíl. Producenti biofilmu mají minimálně o 5 hodin delší detekční časy. Pouze kmeny *Enterobacter cloacae* a *Serratia marcescens* mají detekční časy shodné.

Výsledek bohužel nemůžeme považovat za validní, protože bylo testováno malé množství kmenů. Důvody byly pracovného i finančního charakteru. Měření jsme prováděli v hemokultivačních systémech za běžného provozu. Cena jedné hemokultivační lahvičky se pohybuje kolem 150 Kč. Přesto práce přinesla nové ještě nepublikované poznatky, především o srovnání detekce producentů biofilmu v automatických hemokultivačních systémech.

7. Literatura

1. ARCIOLA C.R., BALDASSARRI L., MONTANARO L. Presence of icaA and icaD Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. *Journal of clinical microbiology* [online]. June 2001, vol.39, no.6, p. 2151–2156. [cit. 2008-02-14].
URL: <<http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/39/6/2151> >
2. BacT/Alert 3D Culture Media Selection [cit. 2008-02-18]. <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/microbiology/bact_alert3d/bact_alert3d_mediasselection.htm>
3. BacT/Alert 3D Technology [cit. 2008-02-18]. <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/microbiology/bact_alert3d/bact_alert3d_technology.htm>
4. BACTEC™ 9240, 9120 and 9050 Fluorescent Series Bar Coded Blood Culture Media [cit. 2008-02-18]. <<http://www.bd.com/ds/productCenter/BC-bactecMedia.asp>>
5. BOLDIŠ, P. *Bibliografické citace dokumentů podle ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2: Část 2 – Modely a příklady citací u jednotlivých typů dokumentů.* [online] [cit. 2008-01-10]. URL: <<http://www.boldis.cz/citace/citace2.pdf>>.
6. BONE, R.C., BALK, R.A., CERRA, F.B. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. [online] *Chest* 1992, vol.101, p.1644-1655. [cit. 2008-01-20]. URL:<<http://www.chestjournal.org/cgi/reprint/101/6/1644>>
7. CALANDRA, T. COHEN J. The International Sepsis Forum Conference on definitions of infection in the intensive care unit. [online] *Crit Care Med* 2005, vol.33(7), p.1538-1548. [cit. 2008-03-16].
URL:<<http://www.ccmjournal.com/pt/re/ccm/abstract.00003246-200507000-00010.htm;jsessionid=LXGW0CLXbBTQ848rp1kyzh1YjYWxB4GtpSKkTWdPnVvQ6TLywmf!1379360954!181195629!8091!-1>>
8. CAPDEVILA, J.A., Catheter-related infection: An update on diagnosis, treatment, and prevention. [online] *International Journal of Infectious Diseases*. April-June 1998, vol. 2, issue 4, p. 230-236. [cit. 2008-02-20].

URL:<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B7CPT-4BM4R91-8B&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=7da9020d078f65db6c9241d24d41190c>

9. CETKOVSKÝ, P. et al. *Intenzivní péče v hematologii*. Praha: Galén, 2004.
10. COQUET, L., JUNTER, GA., JOUENNE T. Resistance of artificial biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and tobramycin. [online] *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 1998, vol.42, p.755-760. [cit. 2008-02-20].
URL:<<http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/42/6/755>>
11. Culture, Blood [cit. 2008-01-20].
URL:<<http://www.pathology.unc.edu/labs/test/cult/blood.htm>>
12. ČERMÁK, P. a kol. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. Praha, 2008.
13. ENDIMIANI, A., TAMBORINI, A., LUZZARO, F. et al. Epidemiology of bloodstream infections and time to detection of positive blood cultures: an evaluation of the automated BacT/Alert and Bactec 9240 systems. [online] *New Microbiology* 2002; 25, p.9-16. [cit. 2008-02-20].
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11837397?ordinalpos=28&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum>
14. HOLÁ, V., RŮŽIČKA, F., TEJKALOVÁ, R. Determination of sensitivity of biofilm-positive forms of microorganisms to antibiotics. [online] *Klinická Mikrobiologie Infekčního Lékařství*. 2004 Oct;10(5):218-22 [cit. 2008-03-16].
15. KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén, 2005
16. KOCOGLU, M., BAYRAM, A., BALCI, I. Evaluation of negative results of BacT/Alert 3D automated blood culture system. [online] *J Microbiol*, 2005, vol.43(3), p.257-259. [cit. 2008-03-16]. URL:<<http://www.msk.or.kr/jsp/downloadPDF1.jsp?paperSeq=2216&fileName=p.257-259.pdf>>
17. KOLÁŘ, M. Látal T, Čermák P. Frekvence gramnegativních patogenů u infekcí krevního řečiště a jejich rezistence k antibiotikům v České republice. [online] *Clinical Microbiology and Infection*, 2002, vol.2, p.61-67.
URL:<<http://www.blackwellpublishing.com/eccmid14/abstract.asp?id=14436>>

18. KOLÁŘ, M., Heinigeová, B., Bartoníková, N. et al. Grampozitivní patogeny při infekcích krevního řečiště – multicentrická studie. *Klinická Mikrobiologie Infekčního Lékařství*, 2003, č.9, s.244-252.
19. KOWALEWSKA, K., RICHARDS, R., MOYSA, G.L. et al. Guidewire catheter change in central venous catheter biofilm formation in a burn population. [online] *Chest*, 1997, vol.100, p.1090-1095. [cit. 2008-02-14].
URL:<<http://chestjournal.org/cgi/content/abstract/100/4/1090>>
20. KUMASAKA, K., HOSOKAWA, N., YANAI, M. et al. Clinical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriemia. [online] *Rinsho Byori*, November 1999, vol.47(11), p.1064-9. [cit. 2008-02-18].
URL:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed&uid=10590685&cmd=showdetailview&indexed=google>>
21. Laboratory Diagnosis of Infectious Disease [cit. 2008-01-20].
<<http://www.merck.com/mmpe/sec14/ch168/ch168a.html>>
22. MATHUR. T, SINGHAL. S, KHAN. S et al. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci an evaluation of three different screening methods. [online] *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2006, vol.24 (1), p.25-29 [cit. 2008-02-18]. URL:<<http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=2006;volume=24;issue=1;spage=25;epage=29;aulast=Mathur>>
23. McDONALD, LC, WEINSTEIN MP, FUNE J et al. Controlled comparison of BacT/Alert FAN aerobic medium and Bactec fungal blood culture medium for detection of fungemia. [online] *J Clin Microbiol*, 2001, vol.39, p.622-624. [cit. 2008-03-16]. URL: <<http://jcm.highwire.org/cgi/content/abstract/39/2/622>>
24. MELOUN, M., MILITKÝ, J. *Statistická analýza experimentálních dat*. Vyd. 2., upr. a rozš. Praha: Academia, 2004. 953 s.
25. MIRETT S, RELLER L, PETTI C et al. Controlled clinical comparison of BacT/Alert standard aerobic medium for culturing blood. [online] *Journal Clin Microbiol*, 2003, vol.41(16), p.2391-2394. [cit. 2008-02-18].
URL: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=156516>>
26. PEDERSEN, G., SCHONHEYDER, H.C., SORENSEN, H.T. Antibiotic therapy and outcome of monomicrobial gram-negative bacteraemia: A 3-year population-

- based study. [online] *Scandinavian journal of infectious disease*, 1997, vol.29(6), p.601-6. [cit. 2008-02-18].
 URL:<<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=2235877>>
27. PEETERS, E., NELIS, H.J., COENYE T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. [online] *Journal of microbiological methods*, 2008, vol.72, p.157-165. [cit. 2008-02-14].
 URL:<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T30-4R5VYMF-4&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=69143fd87cd4c5c1d85f440128e76d55>
28. PRŮCHA, M., DOSTÁL, M., KAVKA, B. *Sepse a poruchy imunitních funkcí*. [online] [cit. 2008-03-16]. <<http://www.tigis.cz/alergie/ALERG300/04pruch.htm>>
29. RILEY, J. A., HEITER, B. J., BOURBEAU, P. P. Comparative Recovery of Microorganisms from BacT/ALERT Plastic and Glass FA and FN Blood Culture Bottles [online] *Journal of Clinical Mikrobiology*, July 2005, vol.43, p.3244–3246. [cit. 2008-01-20].
 URL:<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?&artid=1169184>>
30. RŮŽIČKA, F., HOLÁ, V., VOTAVA, M. et. al. Biofilm detection and the clinical significance of Staphylococcus epidermidis isolates. [online] *Folia Microbiol*, 2004, vol.49(5), p.596-600. [cit. 2008-02-18].
 URL:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15702552> >
31. SOUKUPOVÁ, J. *Diplomová práce*. Pardubice, 2002. 58 s.
32. SOULI, M., GIAMARELLOU, H., Effects of Slime Produced by Clinical Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci on Activities of Various Antimicrobial Agents. [online] *Antimicrobial agents and chemotherapy*, April 1998, p. 939–941 [cit. 2008-02-18]. URL: <<http://aac.highwire.org/cgi/content/full/42/4/939>>
33. ŠŤASTNÝ, Z. *Matematické a statistické výpočty v Microsoft Excelu*. Praha: Computer Press, 1999.
34. TODAR, K. *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [cit. 2008-01-20]. <<http://textbookofbacteriology.net/staph.html>>

35. VADYVALOO, V. Otto M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. [online] *Int Journal Artif Organs*, 2005, vol.28 (11), p.1069-1078. [cit. 2008-02-18].
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16353113?ordinalpos=6&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum>
36. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005.
37. Xu L, L.H., Vuong, C., Vadyvaloo, V. et al. Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. [online] *Infect Immun*, January 2005, vol.74(1), p.488-96. [cit. 2008-02-14].
<<http://mdl.csa.com/partners/viewrecord.php?requester=gs&collection=ENV&recid=6576939&q=&uid=792586904&setcookie=yes>>
38. ZIEGLER, R., JOHNSCHER, I., MARTUS, P. et al. Controlled clinical comparison of two supplemented aerobic and anaerobic media used in automated blood culture system to detect bloodstream infections. [online] *Journal of Clinical Mikrobiology*, 1998, vol.36, p.657 – 661. [cit. 2008-02-18].
URL: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=104604>>
39. <http://www.ilustrados.com/publicaciones/multimedia/0211068.jpg>

8. Klíčová slova

Detekční čas (TTD), hemokultivační systém, biofilm

9. Přílohy

9.1 Tabulky

	opakování
<i>E.cloacae</i>	1
koagulaza neg. staf.	2
<i>S. marcescens</i>	2
<i>S.epidermidis</i>	4
<i>S.haemolyticus</i>	2
<i>S.maltophilia</i>	4

Tabulka 1: Počet opakování při měření jednotlivých kmenů

	t_a	t_b	t_{kr}	F	F_{kr}	stat.rozdíl
<i>E.cloacae</i>	6,40	0,72	2,78	113,87	6,94	ano
koaguláza neg.staf.	0,91	1,70	2,18	1,80	3,89	ne
<i>S. marcescens</i>	6,85	0,78	2,12	63,56	3,63	ano
<i>S.epidermidis</i>	2,07	2,08	2,06	2,33	3,40	ne
<i>S.haemolyticus</i>	2,43	1,28	2,16	28,57	3,74	ano
<i>S.maltophilia</i>	4,26	0,76	2,02	39,93	3,32	ano

Tabulka 2: Hodnoty pro statistické zpracování průměrných detekčních časů hemokultivačních systémů Bact/Alert 120 a Bactec 9240

	t_a	t_b	t_{kr}	F	F_{kr}	stat.rozdíl
<i>E. cloacae</i> (Bactec)	0,91	0,53	2,78	1,59	6,94	ne
koaguláza neg.staf.(B/A)	3,01	1,75	2,23	4,29	4,10	ano
koaguláza neg.staf.(Bactec)	0,13	1,55	2,31	4,93	4,46	ano
<i>S. marcescens</i> (Bactec)	0,20	0,37	2,12	0,53	3,63	ne
<i>S.epidermidis</i> (B/A)	2,74	1,06	2,04	4,96	3,32	ano
<i>S.epidermidis</i> (Bactec)	3,31	2,69	2,05	2,92	3,34	ne

Tabulka 3: Hodnoty pro statistické zpracování průměrných detekčních časů producentů a neproducentů biofilmu

	TTD: BacT/Alert	TTD: Bacte
<i>E.cloacae</i>	12,42	9,67
koagulaza neg. staf.	28,69	26,67
<i>S. marcescens</i>	13,12	10,263
<i>S.epidermidis</i>	30,04	31,32
<i>S.haemolyticus</i>	23,4	19,19
<i>S.maltophilia</i>	21,24	18,54
celkový prům. TTD	21,485	19,2755

Tabulka 4: Průměrné detekční časy u jednotlivých bakteriálních kmenů rostoucích v lahvičkách BacT/Alert standard aerobic a Bactec Standard aerobic/F

	TTD: neproducent	TTD: producent
<i>E. cloacae</i> (Bactec)	9,44	9,67
koaguláza neg.staf.(B/A)	24,59	29,53
koaguláza neg.staf.(Bactec)	18,96	24,39
<i>S. marcescens</i> (Bactec)	10,53	10,26
<i>S.epidermidis</i> (B/A)	26,00	34,80
<i>S.epidermidis</i> (Bactec)	28,20	38,00
celkový průměrný TTD	19,62	24,44

Tabulka 5: Průměrné detekční časy producentů a neproducentů biofilmu

	TTD: BacT/Alert	TTD: Bactec	v %
celkem měření	70	70	100
falešně pozitivní	0	0	0
falešně negativní	3	3	4,3

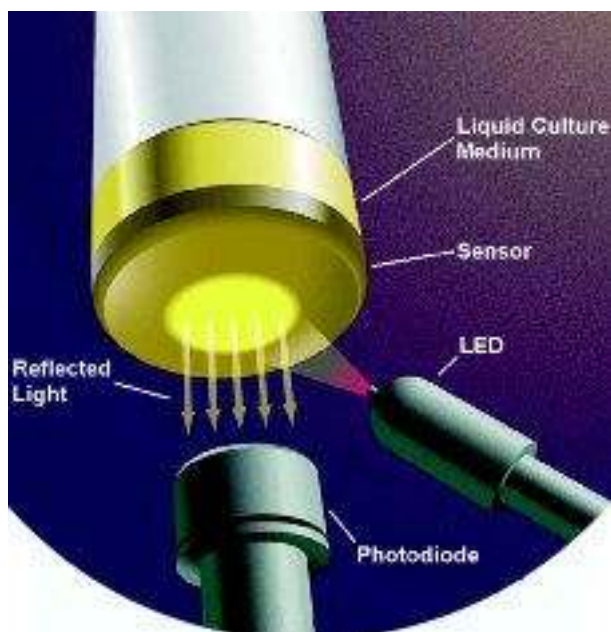
Tabulka 6: Výskyt falešně negativních a falešně pozitivních lahviček (BacT/Alert standard aerobic a Bactec Standard aerobic/F) během měření

	neproducent	Producent
<i>E. cloacae</i> (Bactec)	1,09	1,9
koaguláza neg.staf.(B/A)	4,66	25,45
koaguláza neg.staf.(Bactec)	56,68	39,96
<i>S. marcescens</i> (Bactec)	3,11	3,13
<i>S.epidermidis</i> (B/A)	13,63	121,22
<i>S.epidermidis</i> (Bactec)	20,45	307,7

Tabulka 7: Rozptyl detekčních časů u producentů a neproducentů biofilmu

9.2 Obrázky

Obrázek 1: Vztah mezi SIRS, sepsí a infekcí (6) – str.12



Obrázek 2: Schéma práce systému BacT/Alert (3)



Obrázek 2: Média pro systém BacT/Alert (2)



Obrázek 3: Média pro systém Bactec (4)



Obrázek 4: Práce se systémem (39)