

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta

**Porovnání bakteriologického vyšetření moči metodou kultivační a  
nefelometrickou**

Bakalářská práce

Jméno autora: Aneta Lojíková

Vedoucí práce: Mgr. Petra Soušková

Datum odevzdání: 7. 5. 2009

## **ABSTRACT**

### **Comparison of bacteriological examination of urine by cultivation-based method and nephelometry**

In population urinary tract infections (UTI) occur as the second most common diseases caused by various pathogens. They manifest themselves by the presence of bacteria in urine called bacteriuria. The objective of the thesis was to compare the bacteriological examination of urine in suspected UTI using cultivation-based methods and nephelometric methods. Two procedures were used for cultivation examination of urine. The first was a gradual dilution technique which is considered to be accurate. The second procedure was cultivation on filter paper which is considered to be less reliable. Two types of culture media - URI Select 4 and COS from the firm BIO-RAD were used.. URI Select 4 is a diagnostic medium designed to cultivate urine samples. Blood agar (COS) is a blood enriched medium on which the majority of medically important bacteria grow. The third measurement was carried out with the automatic system URO-QUICK from ALIFAX S.p.A. Cultivation on filter paper was used only as an extending supplementary method to be compared to the gradual dilution technique and the automatic system URO-QUICK. Total of 50 urine samples were tested. Results: Individual samples were processed by three methods in parallel. The obtained values were used to evaluate clinical characteristics of each laboratory method. In the nephelometric method the following values were found: sensitivity = 100%, specificity = 75% and efficiency = 94%. In the gradual dilution technique the following values were found: sensitivity = 89.5%, specificity = 50% and 80% efficiency. The method using cultivation on filter paper has the values: sensitivity = 94.7%, specificity = 66.7% and efficiency = 88%. The correlation coefficient between the automatic system and the method of progressive dilution equals 0.19 and the correlation coefficient between the automatic system and the method using filter paper is 0.69, the maximum match rate being the coefficient 1.00.

Conclusion: According to the obtained results the automatic system URO-QUICK can be regarded as the most appropriate procedure for processing urine samples in a microbiological laboratory. The second method suitable for bacteriological examination of urine is the filter paper method .

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci na téma Porovnání bakteriologického vyšetření moči metodou kultivační a nefelometrickou vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 4.5.2009

.....

Podpis studenta

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat paní Mgr. Petře Souškové za vedení a odborné rady při realizaci mé bakalářské práce a za čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Danielu Rajdlovi, Ph.D. za pomoc při zpracovávání výsledků a v neposlední řadě také mikrobiologickému oddělení Nemocnice Strakonice, a.s.

## **OBSAH:**

<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>1. SOUČASNÝ STAV.....</b>	<b>9</b>
1.1 Infekce močových cest.....	9
1.1.1 Charakteristika .....	9
1.1.2 Epidemiologie infekcí močových cest.....	9
1.1.3 Patofyziologie infekcí močových cest.....	10
1.1.4 Etiologie .....	11
1.1.5 Klasifikace infekcí močových cest.....	12
1.2 Preanalytická fáze bakteriologického vyšetření moči .....	14
1.2.1 Preanalytická fáze mimo laboratoř .....	14
1.2.2 Preanalytická fáze v laboratoři .....	16
1.3 Analytická fáze.....	17
1.3.1 Kultivace bakterií.....	17
1.3.1.1 Růst a množení bakterií .....	17
1.3.1.2 Růstové nároky.....	18
1.3.1.3 Růstová křivka.....	18
1.3.2 Kultivační půdy.....	19
1.3.3 Disperzní systémy – nefelometrie .....	23
<b>2. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY.....</b>	<b>26</b>
2.1 Cíl práce .....	26
2.2 Předpokládané hypotézy .....	26
<b>3. METODIKA.....</b>	<b>27</b>
3.1 Charakteristika zkoumaného souboru.....	27
3.2 Automatický systém URO-QUICK.....	27
3.3 Kultivační vyšetření.....	29
3.3.1 Metoda postupného ředění .....	29
3.3.2 Kultivace pomocí filtračního papíru .....	31
3.4 Vlastnosti laboratorní metody .....	34
<b>4. VÝSLEDKY.....</b>	<b>38</b>

<b>5. DISKUZE.....</b>	<b>50</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>53</b>
<b>7. KLÍČOVÁ SLOVA .....</b>	<b>55</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>56</b>
<b>9. PŘÍLOHY .....</b>	<b>60</b>

## ÚVOD

Infekce močových cest patří vedle infekcí horních cest dýchacích k nejčastějším infekčním onemocněním v populaci. Jeho výskyt je lokalizován v běžné populaci, ale i v nemocničním prostředí, kde se řadí mezi nosokomiální nákazy. Mikrobiologická laboratoř představuje významné místo pro jejich vyšetření a udává směr další léčby pacienta. Uroinfekce se projevují bakteriurií, tj. přítomností mikroorganismů v moči. Za signifikantní koncentraci bakterií v moči lze označit hodnotu  $>10^5$  CFU/ml (CFU = colony forming unit), tzn.  $10^5$  a více bakteriálních kolonií v 1 ml moči.<sup>(26)</sup> Záleží, za jakých podmínek a jakým způsobem je moč odebrána. Hodnoty  $<10^5$  CFU/ml jsou pravděpodobně způsobeny pouze kontaminací.

Mezi kvantitativní vyšetření bakteriurie patří kultivační metody. V této bakalářské práci provádím bakteriologické vyšetření moči dvěma způsoby – kultivačním a nefelometrickým. Kultivační metoda postupného ředění je považována za přesnou při dodržení správného pracovního postupu a jedná se o způsob referenční. Druhá kultivační metoda využívá filtrační papírek. Jedná se o metodu jednodušší, ale i méně spolehlivou. Obě metody umožní sdělit výsledky až druhý den. Třetí metodu, kterou jsem zvolila jako vhodnou pro zpracování vzorků moči, je automatický systém založený na principu nefelometrie. Jedná se o přístrojovou techniku fungující pomocí laserové nefelometrie. Tento přístroj se nazývá URO-QUICK. Tímto způsobem měření získám výsledky nejdéle za 4 hodiny. Metodu s filtračním papírkem jsem použila pouze pro porovnání s metodou postupného ředění a automatickým systémem URO-QUICK.

Cílem mé bakalářské práce je porovnat výsledky bakteriologického vyšetření moči metodou kultivační a nefelometrickou a určit, jaký vliv má přítomnost erytrocytů nebo leukocytů ve vzorku na výsledky těchto metod. Zhodnotím, je-li automatický systém přínosem jak pro mikrobiologickou laboratoř, tak pro další subjekty spojené s vyšetřením a léčbou infekcí močových cest (klinický lékař a pacient).



## 1. SOUČASNÝ STAV

### 1.1 Infekce močových cest

#### 1.1.1 Charakteristika

Infekce močových cest (IMC) jsou považovány za jedno z nejčastějších bakteriálních onemocnění vyskytující se v populaci. IMC je termín používaný v souvislosti s výskytem bakterií v moči, tzv. bakteriurií. Vznikají v přítomnosti infekčních agens a jejich pomnožováním v jednom nebo více orgánech močového traktu, například ve vývodných močových cestách, případně v ledvinovém parenchymu nebo prostatě. Infekční agens mohou pronikat do tkání, jejich okolí a do krve. Mikroorganismy nacházející se v močovém traktu jsou nejčastěji Gram-negativní bakterie.<sup>(5)</sup>

IMC se třídí podle několika hledisek:

- a) na *nekomplikovanou* a *komplikovanou* - podle toho, jestli chybí nebo je přítomna jiná patologie močového traktu
- b) na *horní* a *dolní* - podle lokalizace
- c) na *akutní* a *chronickou* - podle časového průběhu
- d) na *asymptomatickou* a *symptomatickou* - z hlediska klinických projevů<sup>(5)</sup>

#### 1.1.2 Epidemiologie infekcí močových cest

Rozdílná četnost urologických onemocnění odpovídá zastoupení v jednotlivých věkových kategoriích a biologických odlišnostech obou pohlaví. U žen se vyskytují IMC častěji než u mužů. V dospělém věku je prevalence signifikantní bakteriurie u žen 4 – 5 % a se vzrůstajícím věkem má tendenci stoupat. U gravidních žen je incidence 4 – 10 %, což je dvojnásobek v porovnání se stejnou skupinou negravidních žen. Výskyt uroinfekcí u mužů nad 40 let věku je způsoben zvýšeným výskytem hypertrofie prostaty a ledvinových kamenů. Přibližně od šesté dekády se incidence výskytu infekcí

močových cest u obou pohlaví vyrovnává a vyskytuje se asi v 10 – 30 %. Zvýšený počet IMC se nachází u rizikových skupin populace, kterými jsou děti, těhotné ženy, starší osoby, pacienti po míšním poranění nebo se zavedeným katétrem, pacienti s derivacemi močových cest, diabetici, pacienti postiženi AIDS nebo roztroušenou sklerózou apod.<sup>(5,9,18)</sup>

### ***1.1.3 Patofyziologie infekcí močových cest***

Močový trakt zdravého jedince je bakteriologicky sterilní s výjimkou zevního ústí uretry.<sup>(4)</sup>

Ve více než 95 % případů se rozvine infekce ascendentní (vzestupnou) cestou. Mikroorganismy putují vzhůru z uretry a kolonizují močový měchýř a mohou proniknout přes uretery až do ledvin, resp. ledvinných pánviček a parenchymu ledvin. U žen je obvyklým rezervoárem IMC vagina. U mužů je rezervoárem IMC prostata s poruchou mikce obstrukčního charakteru, u chlapců kolonizované perineum a preputium.<sup>(19)</sup>

Infekce vzniklá descendentní cestou je neobvyklá u dospělé populace a obvyklá u novorozenců. Jedná se o močovou infekci hematogenního původu. Tímto způsobem jsou postiženy parenchymové orgány, především ledvinný parenchym, prostata, méně pak nadvarle a varle. K poškození organismu hematogenní infekcí je potřeba vysoké virulence patogenu vyvolávajícího onemocnění a současného oslabení hostitelského organismu. Mikroorganismy jsou do místa infekce transportovány krevním řečištěm, které je zdrojem infekčního agens v důsledku endokarditidy, flebitidy, infekce centrálních žilních katétrů, bakterémie nebo kandidémie. Dalšími ohroženými skupinami mohou být senioři, chronicky nemocní nebo imunosuprimovaní pacienti.<sup>(5,18)</sup>

Lymfogenní cesta šíření není v patogenezi IMC zcela objasněna. Jako příklad se uvádí šíření bakterií mízním systémem z oblasti střeva se stagnujícím obsahem.<sup>(18)</sup>

Pohlavním stykem se přenášejí sexuálně přenosná onemocnění. Nejedná se o typickou cestu šíření IMC, ale sexuálně přenosné bakterie mohou způsobit uretritidy,

prostatitidy, epididymitidy mužů a uretritidy žen. Tato zánětlivá onemocnění patří do klasifikace infekcí močových cest.<sup>(19)</sup>

### 1.1.4 Etiologie

Bakterie *Escherichia coli* z čeledi *Enterobacteriaceae* je v 90 % vyvolavatelem akutních nekomplikovaných IMC, méně často komplikovaných a nosokomiálních IMC. Je to nejčastější původce uroinfekce, která se šíří ascendentně.<sup>(6)</sup>

Tabulka 1: Patogenita a frekvence výskytu mikroorganismů ve vzorku ze středního proudu moči spontánně vymočené

Patogenita v močových cestách	Frekvence (izoláty v procentech)			
	A. běžná (> 10 %)	B. častá (1 - 10 %)	C. neobvyklá (0,1 - 1 %)	D. vzácná (< 0,1 %)
I. Primární patogeny	<i>E.coli</i>	<i>S. saprophyticus</i>		<i>E. coli</i> <i>CO<sub>2</sub>-dependentní</i> <i>Salmonella spp.</i> <sup>/a</sup> ( <i>Leptospira</i> , <i>mycobacteria</i> ) <sup>*</sup>
II. Sekundární patogeny		<i>Enterobacter spp.</i> <i>Enterococcus spp.</i> <i>Klebsiella spp.</i> <i>P. mirabilis</i> <i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Citrobacter spp.</i> <i>M. morgani</i> <i>P. vulgaris</i> <i>Serratia spp.</i> <i>S. aureus</i>	<i>Corynebacterium urealyticum</i> <i>Haemophilus spp.</i> <sup>/b</sup> <i>Streptococcus pneumoniae.</i> <sup>/b</sup>
III. Nejisté (pochybné) patogeny		<i>GBS</i> <sup>c</sup> , <i>kandida</i> <i>CNS</i> <sup>d</sup>	<i>Acinetobacter spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
IV. Obvykle flóra uretry nebo genitálu <sup>/e</sup>		<i>Streptococcus sp.</i> <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Lactobacilli atd.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	

Zdroj: (4)

<sup>/a</sup> – nízká koncentrace v moči je suspektní fekální kontaminace vzorku během odběru

<sup>/b</sup> – nejčastěji izolovány v moči u dětí

<sup>/c</sup> – *Streptococcus agalactiae* (β-hemolytické streptokoky skupiny B)

<sup>/d</sup> – koaguláza-negativní stafylokoky, kmeny produkující ureázu nebo kmeny v moči pacientů s permanentním katétrem mohou být významné

<sup>/e</sup> – neprovádí se identifikace a testy citlivosti k antibiotikům (pouze při výjimečných indikacích)

<sup>/\*</sup> - specifické bakterie, leptospiry, salmonely, sexuálně přenosní původci a kandidy nejsou detailně diskutovány

*Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Serratia sp.* jsou bakterie, které vyvolávají především komplikované a nosokomiální infekce močových cest často spojených se strukturálními a funkčními abnormalitami močových cest. Kmeny se vyznačují častou rezistencí k antibiotikům.<sup>(18,28)</sup>

*Staphylococcus epidermidis* a *S. saprophyticus* jsou původci akutních cystitid u mladých žen. Z vaginálního rezervoáru se při ascendentních infekcích uplatňuje *Streptococcus viridans* nebo *S. agalactiae*. Koaguláza negativní stafylokoky se jako původci infekce objevují častěji u pacientů se zavedeným katétrem.<sup>(20)</sup> Vyvolavateli hematogenních infekcí jsou nejčastěji koky, např. *Staphylococcus epidermidis* nebo *Staphylococcus aureus*, také mykobakterie nebo plísně. Méně obvyklým původcem IMC může být *Salmonella sp.*, šířící se hematogenní cestou v průběhu septického onemocnění, kdy se salmonely vylučují do moči.<sup>(5,18,26)</sup>

Anaerobní bakterie se jako původci IMC vyskytují velmi vzácně. Podílí se na invazivních rozpadových patologických procesech v orgánech močového traktu a jejich okolí. Neobvyklou bakterií je *Pseudomonas sp.* Je možným reziduem nosokomiální infekce po invazivních vyšetřovacích metodách nebo zákrocích v močovém traktu.<sup>(4)</sup>

### **1.1.5 Klasifikace infekcí močových cest**

Infekce dolních cest močových zahrnuje cystitidu, prostatitidu a uretritidu. Cystitida je onemocnění, které se z infekcí dolních cest močových vyskytuje nejčastěji a postihuje převážně ženy. Původcem těchto infekcí je především bakterie *Escherichia*

*coli*. Projevuje se častým bolestivým močením. V moči se nachází leukocyty, bakterie a někdy erytrocyty. Pro určení diagnózy cystitis je důležitá anamnéza, klinický obraz a nález signifikantního množství bakterií v moči.

Prostatitida se vyskytuje jako forma akutní nebo chronická. Může dojít ke vstupu infekčního agens ascendentní cestou z uretry do prostatické tkáně nebo hematogenním způsobem šíření. Akutní prostatitida je provázena horečkou, bolestivostí infikované žlázy a poruchami odtoku moči. Mikrobiální agens je někdy možno prokázat v první porci moči po masáži prostaty. Chronická forma zánětu prostaty je vleklé onemocnění s řadou mikčních a sexuálních dyskomfortů. Při této formě prostatitidy se bakteriální původce zachytí velmi zřídka. Z chronické prostatitidy tvoří největší podíl tzv. nebakteriální zánět prostaty.<sup>(5,18,19)</sup>

Uretritida je zánětlivé onemocnění, které způsobují jak enteropatogenní bakterie, tak původci přenášení sexuálně pohlavní cestou. Jedná se o mikroorganismy ze skupiny koků, anaerobní bakterie, intracelulární parazity (chlamydie) a protozoa (trichomonády).<sup>(18,26)</sup>

Pyelonefritida resp. intersticiální bakteriální nefritida je infekcí horních cest močových. Dělí se na akutní a chronickou formu. Při akutní pyelonefritidě dochází k infiltraci intersticia ledvin polymorfonukleáry.<sup>(18)</sup> Těžké formy onemocnění mohou vést až k septickému šoku, jehož následky mohou být fatální. Je provázena leukocyturií, ale nemusí se vyskytovat bakteriurie a kulturační nález v moči může být negativní. Pokud se při kultivaci objeví nějaký patogen, jedná se převážně o bakterii *Escherichia coli*, méně často o enterokoky a enterobakterie. U chronické pyelonefritidy se přidružují již vytvořené a stále se tvořící jizvy, které vedou k deformaci kalichů a pánviček ledvin. V dětství se vyskytuje jako důsledek vezikoureterálního refluxu. U dospělých osob se objevuje při recidivující infekci nebo jako následek abusu analgetik. Laboratorním nálezem je především proteinurie 1g/24h a leukocyturie.<sup>(5,8)</sup>

Infekce horních a dolních cest močových jsou doprovázeny signifikantní bakteriurií. Prokazuje se kvantitativně významná bakteriurie. Může chybět u uretritid, specifických procesů, pacientů již léčených antibiotiky nebo u pacientů infikovaných hematogenní cestou.

Asymptomatická bakteriurie se vyskytuje se přibližně u 15 % gravidních žen, ale jen u 0,1 % mužů. Jedná se o signifikantní bakteriurii, která není provázána subjektivními potížemi ani klinickými příznaky. V moči se většinou nachází koliformní Gram-negativní bakterie. Terapie u nekomplikované asymptomatické bakteriurie není nutná, většinou dojde k vymizení nálezu. Léčí se pouze těhotné ženy. Pokud jsou ve vyšetřovaném vzorku moči přítomny tři a více bakteriálních druhů, jedná se většinou o kontaminaci během odběru či kontaminaci způsobenou nevhodným skladováním. Výjimku tvoří pacienti s dlouhodobě zavedenými katétry.<sup>(4,8,25,29)</sup>

## **1.2 Preanalytická fáze bakteriologického vyšetření moči**

Preanalytická fáze je období před vlastním laboratorním vyšetřením. Rozděluje se do dvou skupin. První skupinu tvoří preanalytická fáze mimo laboratoř. Druhou skupinou je preanalytická fáze v laboratoři. Zahrnuje přípravu pacienta, vlastní odběr biologického materiálu, zaslání odebraného vzorku do laboratoře a přípravné práce, event. skladování před provedením samotné analýzy.<sup>(16)</sup> V této fázi vyšetření se vyskytuje největší pravděpodobnost vzniku chyb. Faktory, které se shrnují do fáze před vlastní analýzou, mohou nesprávným postupem odběru nebo transportu vzorku negativně ovlivnit výsledek vyšetření.

### **1.2.1 Preanalytická fáze mimo laboratoř**

Zahrnuje procesy odběru materiálu a jeho transport. Je kladen zvláštní důraz na to, aby se co nejvíce zabránilo kontaminaci a následnému znehodnocení biologického materiálu.<sup>(16)</sup> Vzorek moči je jinak ohrožen druhotným pomnožováním bakterií po odběru a může tak dojít k poškození nebo smrti mikroorganismů, které způsobují vlastní onemocnění u pacienta. Výsledek pak není hodnotitelný, protože nejsou přítomny etiologicky relevantní bakterie.

Základní parametry odběru moči jsou následující – čas a místo odběru, identifikace vzorku, odběrová a transportní souprava. Každý infekční proces má svůj

průběh daný lokalizací infektu, interakcí mikro a makroorganismu a dalšími vlivy. Většina infekcí začíná jako invaze relativně malého množství původců, kteří se v těle hostitele množí, vytvářejí ložisko a šíří se kontinuálně do okolí. Proti tomuto procesu působí imunitní systém, pokud není zásadním způsobem utlumen. Odběr materiálu je proto nutné vhodně načasovat z hlediska patofyziologického průběhu infekčního procesu.<sup>(7)</sup>

Místo odběru souvisí s druhem infekčního procesu a jeho průběhem. Odběr musí být proveden lege artis a asepticky do vhodné odběrové soupravy jedním ze čtyř způsobů, které jsou popsány níže.

Odběrová a transportní souprava musí umožnit odběr vzorku, zajistit přežití mikroorganismů a ochránit vzorek před vnější kontaminací a vnější prostředí před kontaminací vzorkem.

Jednoznačná identifikace vzorku je velmi důležitá. Nádobka se vzorkem musí být čitelně označena jménem a příjmením pacienta a rodným číslem. Společně s biologickým materiálem musí být poslána žádanka, která by měla obsahovat následující údaje: jméno a příjmení pacienta, rodné číslo, druh materiálu, místo odběru, diagnózu dle mezinárodní klasifikace, zdravotní pojišťovnu pacienta, IČZ, adresu žadatele, datum a čas odběru, razítko a podpis lékaře a pokud byla započata antibiotická terapie, tak i druh nasazených antibiotik. Z těchto průvodních dat by mělo být zcela jasné, jaké vyšetření je požadováno.<sup>(7)</sup>

Vzorky moči se odebírají čtyřmi způsoby. Moč odebraná ze středního proudu je rutinním typem. Při tomto druhu odběru je určité riziko sekundární kontaminace. V první porci moči jsou bakterie vypláchnuté z močové trubice a vyšetření by tím mohlo být znehodnoceno. Z tohoto důvodu se odebírá střední proud. Postupem pro správný odběr je omytí zevních genitálií vodou a mýdlem a otření zevního ústí močové trubice tamponem namočeným v dezinfekčním roztoku. Do sterilní nádoby se širokým hrdlem se zachytí střední proud. Odebraná moč se přelije do nádoby určené k transportu. Používané nádoby jsou většinou plastové, různých objemů a musí být sterilní.<sup>(4,6,10,14)</sup>

Druhým způsobem je moč získaná katetrizací jednorázově. Riziko kontaminace vzorku při odběru je minimální, ale nelze jej doporučit jako běžný typ odběru pro riziko zavlečení infekce do močových cest. Jedná se o tzv. cévkovanou moč.

Třetím způsobem je moč získaná z permanentního katétru. Kriteria posouzení přítomnosti, kvantity a interpretace signifikantní bakteriurie nejsou zcela jednoznačná. Interpretace výsledku se odvíjí od klinické symptomatologie, bakterie jsou často součástí biofilmu povrchu katétru a mohou, ale nemusí být zdrojem klinických komplikací.<sup>(6)</sup>

Čtvrtým způsobem je moč získaná sběrem do adhezivních sáčků u dětí. Metoda je zatížená relativně vysokým rizikem sekundární kontaminace. Sáček by neměl být nalepen déle než 30 minut a odstraněn by měl být ihned po mikci.<sup>(4,7)</sup>

Vzorek moči musí být transportován ve sterilní nádobce a zpracován nejpozději do 2 hodin po odběru. Pokud se transport zpozdí, je nutno uložit vzorek do přenosné lednice a udržovat teplotu mezi 4 až 8 °C. K transportu lze použít i komerční odběrové soupravy, tj. ponorné plastické folie potažené kultivačními medii, které se inokulují bezprostředně po odběru vzorku. Způsob použití, transportu a vyhodnocení kultivace se řídí předpisy doporučenými výrobcem.<sup>(6,7,10)</sup>

### ***1.2.2 Preanalytická fáze v laboratoři***

Po přijmutí vzorku do laboratoře se zkontroluje jeho identifikace, která musí souhlasit se žádankou. Žádanka i vzorek se označí stejným čárovým kódem popř. číslem. Pokud nelze provést laboratorní vyšetření daného materiálu ihned, musí se vzorek správně uchovávat. Vzorek moči je nutno uchovávat při 4 – 8 °C, maximálně však 24 hodin. Při nízké teplotě se sníží metabolické pochody bakterií na minimum a předejde se tak znehodnocení vzorku pomnožením bakterií.<sup>(4,7)</sup>



### **1.3 Analytická fáze**

Samotné laboratorní vyšetření zahrnuje tzv. analytická fáze. Analýza se provádí výhradně v mikrobiologické laboratoři za předem stanovených podmínek. Biologický materiál po správném odběru, transportu a identifikaci na příjmu je zpracován danou mikrobiologickou metodou. Vyšetření by mělo probíhat podle zásad správné laboratorní praxe.

#### ***1.3.1 Kultivace bakterií***

Kultivací se rozumí pěstování neboli rozmnožování mikroorganismů za laboratorních podmínek na přirozených nebo umělých půdách.<sup>(15)</sup> Kultivace mikroorganismů patří mezi základní a nejčastěji používané metody v mikrobiologické laboratoři. Slouží k přímému průkazu infekčního agens. I přesto, že je tato metoda velmi zdoluhavá oproti dnešním moderním postupům (PCR, detekce antigenu, atd.), je stále potřebná k identifikaci vypěstovaného mikroba a následnému stanovení jeho citlivosti k antimikrobiálním látkám.<sup>(3)</sup>

##### ***1.3.1.1 Růst a množení bakterií***

Množení a růst bakterií jsou založeny na několika biochemických a fyzikálních procesech. Počet buněk vzrůstá geometrickou řadou s kvocientem  $q = 2$ , tzn. že se z 1 buňky vytvoří 2, ze 2 buněk se vytvoří 4, atd. Tuto geometrickou řadu množících se patogenů sleduje exponenciální funkce. Doba, za kterou se zdvojnásobí počet buněk, je veličina konstantní. Tato veličina je nezávislá na aktuálním počtu buněk v daném časovém okamžiku. Za stejnou dobu tak vzniknou ze 2 buněk 4 jako z 32 buněk 64.

Růst bakteriálních buněk se rozlišuje na růst jednotlivých buněk nebo celé populace. Jednotlivé buňky rostou tak, že se zvětšuje jejich objem a tím i hmotnost. Ve chvíli, kdy dosáhne bakterie určité velikosti, se rozdělí. Růst celé populace je charakterizován počtem buněk v bakteriální kultuře a přibýváním biomasy. Lze ho

znázornit růstovou křivkou, která ukazuje počet živých buněk v závislosti na stáří kultury.

Růst buňky i celé populace může probíhat dvěma způsoby. První způsob je balancovaný růst, který se uskutečňuje tehdy, jestliže všechny extenzivní vlastnosti buněk a celé populace vykazují za daný časový interval stejný vzrůst – délka buněk, obsah jejich DNA, obsah enzymů, celkový obsah bílkovin. Za určitý časový interval dojde ke zdvojení a zdvojnásobení hodnot. Rostoucí bakteriální kultura by měla být v ustáleném stavu. Pokud k tomu nedojde, uplatní se druhý způsob růstu, kterým je růst nevyvážený.<sup>(2,3,15)</sup>

### ***1.3.1.2 Růstové nároky***

K identifikaci bakterií je potřeba jejich kultivace, proto je nutné znát jejich růstové nároky. Musí být zajištěny optimální fyzikální podmínky a poskytnuty vhodné živiny.<sup>(1)</sup>

Na výživě mikroorganismů je závislý jejich růst. Jednotlivé druhy se svými nároky na výživu liší. Pro většinu patogenů se podařilo připravit recepturu umělých živných půd. Hlavními požadavky na výživu bakterií jsou prvky uhlík a dusík, dále bílkoviny, anorganické soli, růstové faktory a především zdroj energie.

Fyzikální podmínky růstu by měly zajistit dostatečnou rychlost přijímání živin bakteriemi a odstraňování jejich odpadních produktů. K zajištění správných podmínek slouží optimální teplota, atmosféra, koncentrace vodíkových iontů, osmotický tlak, oxidoredukční potenciál a sterilita prostředí.<sup>(1,3)</sup>

### ***1.3.1.3 Růstová křivka***

Ke znázornění počtu živých buněk v závislosti na stáří kultury se využívá růstové křivky. Počet živých buněk je uveden v logaritmické stupnici. Jsou dva typy růstových křivek: první je založena na zjištění celkového počtu buněk v kultuře, jak živých, tak uhynulých, druhá je zaměřena pouze na živé buňky, resp. buňky schopné množení. Živé buňky vyrostou v kultivačním mediu a vytvoří kolonie. Počet těchto buněk se stanovuje

jako colony forming unit (počet jednotek tvořících kolonie - CFU). Růstová křivka se vyznačuje čtyřmi fázemi:

#### *Lag fáze*

Buňky se zde nemnoží, roste jejich objem a mají zvýšený metabolismus. Délka je závislá na fyziologickém stavu inokula.

#### *Logaritmická (exponenciální) fáze*

Rychlost růstu buněk je konstantní a mezi časem a jejich počtem je lineární závislost. Generační dobou se rozumí délka růstového cyklu, která závisí na druhu mikroba, na teplotě a na složení kultivačního media. V uzavřeném systému se složení media postupně nepříznivě mění a to vede ke zpomalení růstu mikroorganismů.

#### *Stacionární fáze*

Růst buněk je zastaven, buňky nerostou ani nehynou. Zastavení růstu je způsobeno, buď vyčerpáním živin, nebo nahromaděním toxických odpadních produktů. V této fázi se mění morfologie buněk. Délka závisí na charakteru prostředí a na druhu mikroba.

#### *Fáze hynutí*

Buňky ztrácí schopnost množení. Rychlost odumírání buněk závisí také na druhu mikroba a na prostředí.<sup>(1,2)</sup>

### **1.3.2 Kultivační půdy**

Kultivační půdy slouží k pěstování bakterií. Historie přípravy sahá až do 19. století a zasloužili se o ni zakladatelé bakteriologie – Louis Pasteur a Robert Koch. Důležitou osobností v přípravě kultivačních pūd byl také Richard Petri, který pro pevné pūdý zavedl skleněné misky s plochým víčkem, tzv. Petriho misky (viz. příloha č.4).<sup>(2)</sup> Tyto misky se používají dodnes, ale jsou vyráběné z plastu. Pūdý pro růst mikroorganismů mají dva základní parametry: prvním je podpora růstu co největšího množství mikrobiálních druhů, druhým nízká cena a snadná příprava.

Rozdělení půd je dvojího typu, podle složení a podle konzistence. Podle chemického složení se dělí na půdy přirozené (komplexní) a syntetické (definované). V lékařské mikrobiologii se nejčastěji používají půdy přirozené, jejichž základem je většinou živný bujon, který není chemicky definován. Syntetická media obsahují chemicky definované sloučeniny.<sup>(1)</sup>

Podle konzistence se půdy dělí na tekuté a pevné. Mezi tekuté půdy patří například bujon, peptonová voda, Šulova půda atd. V těchto půdách rostou mikroby i z malého nebo starého inokula, poněvadž se snáze dostanou k vodě a živinám. Růst mikrobů v tekutých půdách se projevuje zakalením, vzácněji sedimentem nebo blankou. Ze zákalu nelze rozeznat, jestli jsou mikroby v čisté kultuře nebo se jedná o jejich směs. To ukazuje na nevýhodu tekutých půd. Pevné půdy se připravují především ztužením základu. Jedná se většinou o bujónový základ, do něhož se přidává 1 – 2 %, výjimečně 5% agaru.<sup>(3)</sup> Agar je směs polysacharidů – agarosy a agaropektinu extrahovaných z rudých mořských řas zvaných agarofyty. Agar není používán jako zdroj živin pro bakterie, slouží jako gelifikační přísada pro přípravu pevných kultivačních medií. Agarové půdy se rozpouštějí při teplotě nad 85 °C a při teplotě kolem 40 °C tuhnou. Teplota tuhnutí agaru závisí na jeho kvalitě. Dnes se agar dodává ve formě sušené, mleté nebo granulované.<sup>(31)</sup>

Podle účelu použití jsou půdy rozděleny na základní, obohacené, diagnostické, selektivní a selektivně diagnostické. Mezi základní kultivační media patří bujon, peptonová voda (media s tekutou konzistencí) a živný agar (medium s pevnou konzistencí). Tvoří základ pro přípravu dalších typů půd. Na těchto mediích lze pěstovat běžné mikroorganismy bez zvláštních nároků na výživu. Některé náročnější bakterie, především streptokoky rostou na základních půdách špatně, jiné například hemofily a neisserie vůbec. Pro kultivaci těchto typů bakterií se používají obohacené půdy. Jsou vyráběné z výživnějších základů, ke kterým se přidávají další složky, například bílkovinné koncentráty, hydrolyzáty, přípravky obsahující vitamíny, škrob k potlačení případných toxických faktorů v půdě apod. Příkladem těchto typů medií jsou Toddův-Hewitův bujon, játrový bujon nebo agarové základy Columbia.<sup>(3)</sup>

Do kultivačních základů se mohou přidávat i další látky: nejčastější obohacovadlo je krev, dále bovinní nebo koňské sérum, hydrolyzovaný bovinní albumin, chemicky definovaná obohacovadla (suplementy) obsahující směsi vitaminů a dalších růstových faktorů apod. Nejpoužívanějším typem obohacených půd je krevní agar. Dalšími půdami obohacenými krví jsou čokoládový agar, za horka zfiltrovaný čokoládový agar (tzv. Levinthalova půda) a půda Bordetova-Gengouova. Krevní agar se připravuje přidáním 5 – 10 % defibrinované ovčí nebo beraní krve k agarovému základu ochlazeném na 45 – 50 °C. Po promíchání se vlévá do Petriho misek. Je obohacen plnou krví, má vysokou výživnou hodnotu a roste na něm většina významných mikrobů.<sup>(3)</sup> Na této půdě se projeví i hemolytické vlastnosti pěstovaných mikrobů (mohou být průvodními znaky pro jejich diagnostiku) a podle nich je někdy možno bakterie přímo určit. Mikrobiologicky je hemolýza schopnost mikroba rostoucího na krevním agaru narušovat erythrocyty pod kolonií nebo v jejím okolí. Erythrocyty se mění vlivem enzymů - hemolyzinů, substancí enzymatického charakteru štěpících některý fosfolipid buněčné membrány erythrocytů. Hemolýzu rozeznáváme úplnou a neúplnou. Úplná hemolýza se projeví odbarvením a dokonalým projasněním krevního agaru kolem kolonií. Jedná se o úplný rozklad erythrocytů. Při neúplné hemolýze se ztrácí červené barvivo z erythrocytů, ale v zóně hemolýzy zůstává půda zakalená. Dochází pouze k částečnému poškození erythrocytů.<sup>(1)</sup>

Diagnostické půdy slouží k rozlišení mikrobů, které mají stejné růstové vlastnosti, ale liší se metabolicky. Tato media obsahují substrát, na nějž se nechá mikrob působit. Nedojde-li ke změně substrátu ihned, přidá se vhodný indikátor. Většinou je již součástí půdy, někdy se však přidává až po inkubaci. Součástí klasických diagnostických půd je živný základ – bujon nebo peptonová voda. Na těchto půdách se zkoumané bakterie množí. V moderních diagnostických půdách není živný základ nutný, poněvadž se dokazuje přítomnost již preformovaných enzymů v masivním inokulu vyšetřovaného mikroba. Patří mezi rychlé postupy a výsledky lze odečíst během několika hodin.<sup>(1,2,3)</sup> Příkladem této půdy pro zpracování vzorku moči je URI Select 4. Jedná se o chromogenní medium založené na principu diagnostické půdy. Výhodou tohoto media je snadnější rozpoznání smíšeného růstu kolonií, redukce množství práce pro následnou

identifikaci a vyšší rychlost detekce. Rostou na něm bakterie vyskytující se u pacientů s IMC.<sup>(12,13)</sup> Tyto patogeny se rozlišují na základě změny zbarvení. Například *Escherichia coli* se zbarví růžově až purpurově, *Proteus mirabilis* oranžovohnědě, *Enterococcus* světlomodře a enterobakterie patřící do skupiny K.E.S (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*) modře nebo zelenomodře. Pro identifikaci *E.coli* udává výrobce 99 % senzitivitu testu. Barevné rozlišení se uplatňuje i u rozlišení u rodu *Staphylococcus*: *S. aureus* - žluté kolonie, *S. epidermidis* - bílé kolonie a *S. saprophyticus* – růžové kolonie.<sup>(17)</sup>

Selektivní půdy podporují růst hledaného mikroba a potlačují růst mikrobů ostatních.<sup>(27)</sup> Skládají se z živného základu a z inhibitoru růstu nežádoucích mikrobů. Jako inhibitory se používají sloučeniny telluru, selenu, vizmutu, lithia, látky snižující povrchové napětí (žluč nebo deoxycholát sodný) atd. Inhibovat nežádoucí mikroflóru lze kyselým či alkalickým charakterem media nebo zvýšením osmolality pomocí solí nebo sacharidů.<sup>(1,2,3)</sup> Mezi selektivní půdy používající se k identifikaci bakterií vyvolávajících IMC patří CLED agar. Na CLED agaru (Cystein–Lactose–Elektrolyte-Deficient Agar) rostou jak Gram-pozitivní, tak Gram-negativní bakterie. *E.coli* a *Enterococcus sp.* rostou ve žlutých koloniích, *Klebsiella sp.* a *Proteus sp.* v modrých koloniích, *Pseudomonas aeruginosa* v zelených koloniích a *Staphylococcus aureus* v tmavě žlutých koloniích. CLED agar je medium pro izolaci jednotlivých kmenů, ale nemá takovou rozlišovací kapacitu k odlišení patogenů vyskytujících se ve směsi.<sup>(12,13)</sup>

Selektivně-diagnostické půdy využívají principy selektivních a diagnostických půd. Většinou se jedná o tuhé půdy, na které se očkuje materiál s přítomností hledaného mikroba. Tento patogen se většinou vyskytuje ve směsi s množstvím průvodní nepatogenní mikroflóry. Selektivní diagnostické půdy obsahují živný základ (většinou agarový), inhibitor růstu nežádoucích mikrobů, vhodný substrát a indikátor jeho změn. Jejich funkce je dvojitá, jak selektivní, tak diagnostická. To znamená, že zmiňované kultivační medium podpoří růst hledaného mikroba a potlačí růst nežádoucích mikrobů. Některé patogeny mohou změnit přítomný substrát a pak rostou v charakteristických koloniích. Princip tohoto způsobu růstu na půdě je diagnostický.<sup>(1,2,3)</sup>

### 1.3.3 Disperzní systémy – nefelometrie

Metoda, která využívá rozptylu záření na heterogenních částicích v koloidních roztocích se nazývá nefelometrie. Slouží ke stanovení koncentrace disperzí v kapalinách, jejíž principem je měření absorpance rozptýleného záření. Měření se provádí v jiném směru než je směr šíření procházejícího světla, a to pod úhlem 90° nebo 45°. Jako zdroj světla se používá laser.<sup>(11,24)</sup>

Disperzními systémy, kterými jsou například krev, moč, extracelulární a intracelulární prostředí, jsou soustavami obsahující alespoň 2 fáze nebo složky.<sup>(23)</sup> Jedna nespojitá fáze či složka zvaná disperzní podíl je rozptýlena v druhé spojitě fázi/složce/zvané disperzní prostředí. Rozlišují se 2 typy disperzních systémů. První je systém heterogenní, kdy soustava obsahuje 2 fáze, mezi kterými vznikla určitá hranice. Druhý systém je homogenní. V tomto systému je disperzní podíl v malých částicích rozptýlený ve složce tvořící disperzní prostředí.<sup>(24)</sup>

Disperzní systémy jsou rozděleny podle různých kritérií, buď podle skupenství nebo podle velikosti částic. Stupeň disperzity je převrácená hodnota průměru částice s kulovým tvarem (rozměr je  $m^{-1}$ ). Jemnější rozptýlení disperzního podílu je známkou vyššího stupně disperzity. Monodisperzní systém obsahuje částice se stejnou velikostí a v polydisperzním systému se vyskytují částice o různé velikosti. Podle velikosti částic rozlišujeme disperze analytické (do 1 nm), koloidní (1 nm – 1  $\mu$ m) a hrubé (1  $\mu$ m – 1 mm). Rozdělení disperzních systémů podle skupenství disperzního prostředí a disperzního podílu s ohledem na velikost částic uvádí tabulka 2.<sup>(22)</sup>

Koloidní disperze jsou tvořeny makromolekulami nebo micelami. Makromolekuly jsou molekuly vysokomolekulárních polymerů.<sup>(21)</sup> Micely jsou shluky částic, které nejsou navzájem chemicky vázány. Oba typy částic se rozpouštějí přímo a patří tak mezi rovnovážné systémy. Svými vlastnostmi, způsobem vzniku a stabilitou se podobají pravým roztokům. Nazývají se koloidní roztoky. Lze je podle vztahu k rozpouštědлу dělit na lyofilní a lyofobní. Lyofilní koloidní roztoky se vyznačují tím, že si samostatně vytváří elektrickou dvojvrstvu a jsou obaleny molekulami disperzního prostředí. Částice koloidních roztoků nesou na svém povrchu elektrické náboje, které jsou původcem

jejich specifických vlastností. Kolem nabité koloidní částice se seskupují malé ionty opačného znaménka, a tak vznikají na povrchu dvě nabitě vrstvy. Jednu vrstvu tvoří náboje na povrchu částice, druhou u ní nahromaděné ionty opačného znaménka. Lyofobní koloidy jsou uměle připravené koloidní disperze částic, které nemají afinitu k molekulám rozpouštědla. Nejsou schopny delší samostatné existence a pro praktické použití se musí stabilizovat. <sup>(22)</sup>

Tabulka 2: Rozdělení disperzních systémů

Disperzní prostředí	Disperzní podíl	Disperze hrubé	Disperze koloidní	Disperze analytické
plynné	plynný			směsi plynů
	kapalný	děšť, mlha, aerosoly	aerosoly	páry kapaliny v plynu
	pevný	kouř, dým, aerosoly	aerosoly	páry tuhé látky v plynu
kapalné	plynný	bubliny, pěny	pěny	roztoky plynů v kapalinách
	kapalný	emulze	lysoly	směsi kapalin
	pevný	suspenze	lysoly, koloidní roztoky	pravé roztoky
pevné	plynný	tuhé pěny, bubliny plynů v pevných látkách	tuhé pěny	plyny rozpuštěné v pevných látkách
	kapalný	pevné látky s uzavřenými kapičkami	tuhé pěny	krystalická voda
	pevný	tuhé směsi	tuhé soli	tuhé roztoky, směsné krystaly

Zdroj: (22)

Koloidní disperze mají speciální optické vlastnosti. Po průchodu záření těmito roztoky jeví opalescenci, při níž dochází k rozptylu světla zahrnující jeho lom, ohyb i odraz. Světlo je pozorovatelné po průchodu koloidním roztokem i v jiném směru než je směr šíření. Tento fenomén se nazývá Tyndallův jev. Rozptýlené záření má stejnou vlnovou délku jako záření dopadající a jeho intenzita ( $I$ ) klesá se čtvrtou mocninou



vlnové délky  $\lambda$  ( $I = c/\lambda^4$ , kde „c“ je koncentrace).<sup>(22)</sup> Měření intenzity rozptýleného světla může být použito při stálé velikosti částic ke stanovení koncentrace roztoku nebo při stálé koncentraci ke stanovení velikosti částic.<sup>(11)</sup>

## **2. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY**

### **2.1 Cíl práce**

Cílem mé práce je porovnání dvou metod pro bakteriologické vyšetření moči - kultivační a nefelometrické - na základě kultivačních principů a s pomocí přístrojové techniky. Zhodnotím, jaký vliv má přítomnost erytrocytů nebo leukocytů ve vzorku na výsledky těchto metod a je-li automatický systém přínosem pro mikrobiologickou laboratoř.

### **2.2 Předpokládané hypotézy**

Předpokládám, že vyšetření moči pomocí nefelometrie je vhodné použít jako screeningovou metodu. Je pro laboratoř přesnější a v pracovním postupu jednodušší než vyšetření pomocí kultivační techniky.

### **3. METODIKA**

#### **3.1 Charakteristika zkoumaného souboru**

Zkoumala jsem soubor 50 vzorků v rozsahu 4 měsíců. Vzorky moči byly většinou odebrány standardním způsobem tj. moč ze středního proudu. Jeden vzorek byl odebrán cévkováním. Každý z 50 vzorků jsem zpracovala na analyzátoru URO-QUICK, kultivační metodou postupného ředění a kultivační metodou s použitím filtračního papírku. Získaná data jsem zpracovala pomocí tabulkového procesoru Microsoft Office EXCEL 2003 a SW Medicalc.

#### **3.2 Automatický systém URO-QUICK**

Pomůcky:     stojan pro inokulaci vzorku  
                  mikropipeta o objemu 500  $\mu$ l  
                  skleněné lahvičky na jedno použití naplněné 2 ml eugenic bujónu  
                  pipetovací špičky  
                  papírové proužky

Princip metody:

Skrz skleněnou lahvičku obsahující eugenic bujón s inokulovaným vzorkem moči prochází laserový paprsek. Signály, vzniklé rozptýlením laserového paprsku na koloidních částicích, jsou detekovány, vypočteny a zobrazeny jako růstové křivky, jejichž pomocí lze sledovat průběh měření a množství rostoucích bakterií (nefelometrie).

Postup:

Na bílý štítek na URO-QUICK<sup>TM</sup> lahvičku vyznačíme číslo měřeného vzorku moči a vložíme ji do inokulačního stojanu. Vzorek moči o objemu 0,5 ml napipetujeme do připravené lahvičky a ihned vložíme do analyzátoru, kde se nastaví příslušný program.

Během měření probíhá inkubace při 37 °C a zároveň promíchávání vzorku pomocí magnetické tyčinky k zajištění homogenity kultury. V pravidelných pětiminutových intervalech prochází vzorkem laserový paprsek. Rozptýlené záření se detekuje pod dvěma různými úhly.

Daný program zpracovává signál snímaný detektory a převádí ho na obrazovku v podobě růstové křivky. Z jejího průběhu se pomocí algoritmu odvodí počáteční koncentrace mikroorganismů ve vzorku.<sup>(33)</sup>

Technické a analytické vlastnosti systému URO-QUICK:

*Objem vzorku* – pro tuto metodu je 0,5 ml měřeného vzorku srovnatelný objem s původním neředěným biologickým materiálem

*Rychlost stanovení* - je daná hodnotou bakteriurie, která je již předurčená jako prahová hodnota. Analyzátor URO-QUICK umožňuje detekovat bakteriální počet  $\geq 1000$  CFU/ml a maximální doba stanovení je čtyři hodiny. Koncentrace vyšší než prahové jsou detekovatelné.

*Další využití obohaceného vzorku* - k vyočkování na pevné kultivační půdy k identifikaci a určení citlivosti na antibiotika

*Program systému URO-QUICK*

Umožňuje souběžně s měřením sledovat grafický i číselný vývoj pozitivních vzorků. Do přístroje lze vkládat vzorky postupně. Jejich maximální počet pro současné měření je 120. Data lze zadávat před analýzou, během analýzy nebo po jejím ukončení.

### 3.3 Kultivační vyšetření

#### 3.3.1 Metoda postupného ředění

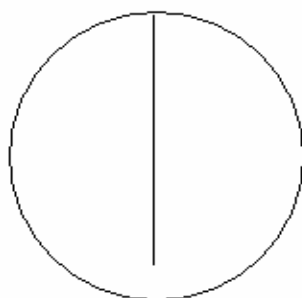
Pomůcky:     kultivační půdy COS a URI  
              sterilní zkumavky  
              mikropipety  
              mikrobiologické kličky  
              fyziologický roztok

Princip:

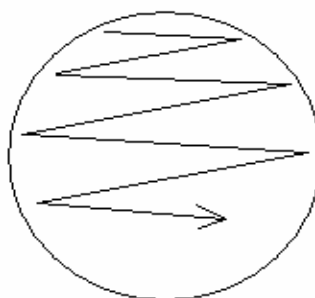
Moč ředíme podle stanoveného postupu a kultivujeme. Podle počtu narostlých kolonií pak můžeme stanovit původní koncentraci bakterií v moči podle převodní tabulky.

Postup

Do třech zkumavek si napipetujeme po 1 ml fyziologického roztoku. Do první zkumavky napipetujeme 10  $\mu$ l vzorku moči, z ní po promíchání odebereme 10  $\mu$ l do druhé zkumavky a stejně tak z druhé zkumavky do třetí. Na COS a URI půdu po označení vyočkujeme neředěný vzorek moči a na další COS a URI vzorek ze třetí zkumavky. Inokulace vzorku se provádí postupem uvedeném na obrázku č.1 a č.2 a po inkubaci se hodnotí počet narostlých kolonií.



obr. č.1



obr. č.2

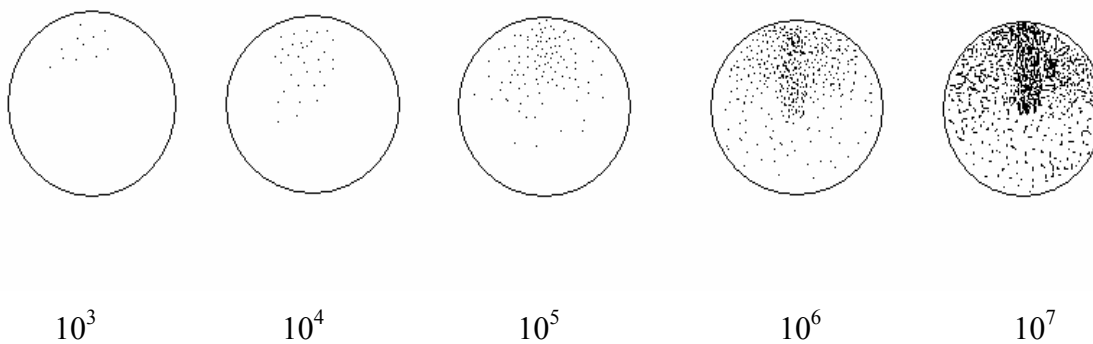
#### Inkubace:

Kultivační medium s naočkovaným vzorkem inkubujeme při 37°C po dobu 18 – 24 hodin.<sup>(17)</sup>

#### Interpretace výsledků:

Po inkubaci porovnáváme narostlé kolonie s množstvím kolonií zobrazených na obrázku č.3. Hodnoty jsou vztaženy na 1 ml vzorku moči, která je neředěná.<sup>(17)</sup>

Obrázek č.3



10<sup>3</sup>

10<sup>4</sup>

10<sup>5</sup>

10<sup>6</sup>

10<sup>7</sup>

Na plotnách s ředěnou močí se řídíme podle následující tabulky:

Tabulka 3 – převodní tabulka

Počet kolonií	Koncentrace bakterií v 1 ml moči [CFU/ml]
1 – 9	$10^6$
10 – 99	$10^7$
>100	$10^8$

Následná identifikace mikroorganismů se provede pomocí zbarvení jednotlivých kolonií např. *E.coli* má růžové zbarvení, *Enterococcus* modré barvení, *Proteus* hnědé atd.<sup>(17)</sup>

### 3.3.2 Kultivace pomocí filtračního papíru

Pomůcky:      kultivační půdy COS a URI  
                 proužky filtračního papíru  
                 mikrobiologické kličky  
                 pinzeta  
                 vatové tampony

Princip:

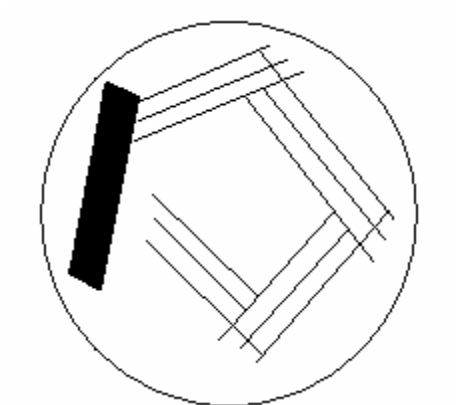
Na povrchu filtračního papíru ulpí po ponoření do moči bakterie, které se v ní nacházejí. Počet narostlých kolonií po otisku papíru na kult. půdu odpovídá počtu bakterií, které byly na ploše filtračního papíru po jeho nasycení vzorkem moči a přepočet na koncentraci v moči se provádí porovnáním podle obrázků, které jsou k dispozici v laboratoři.

Postup

Filtrační papír o rozměru 0,5 x 4 cm ponoříme pomocí vysterilizované pinzety do zkumavky se vzorkem moči a obtiskneme na COS plotnu. Po sejmutí filtračního papíru

se inokulum rozočkuje (obr. č.4). Pinzeta se musí při každé manipulaci sterilizovat v plameni pro zamezení kontaminace jinými bakteriemi. Na kultivační půdu URI se inokulum vytvoří pomocí vatového tamponu a dále rozočkuje podle obr. č.4.

Obrázek č.4



Inkubace:

Kultivační medium s naočkovaným vzorkem inkubujeme při 37°C po dobu 18 – 24 hodin.<sup>(17)</sup>

Interpretace výsledků:

Hodnotí se počet vyrostlých kolonií v inokulu po přiloženém filtračním papíru na COS plotně.<sup>(17)</sup>

*Složení kultivačních půd*

URI Select 4

Agarové medium dodávané v Petriho miskách, které umožňuje:

- izolaci nejběžnějších patogenů močových cest na základě jejich enzymatické aktivity
- diagnostiku ostatních patogenů močových cest



Složení:

Jedná se o neselektivní chromogenní medium, které obsahuje:

- bohatý nutriční základ se třemi peptony podporujícími růst všech patogenů způsobující IMC
- dva chromogenní substráty k detekci bakteriálních enzymů  $\beta$ -galaktosidázy a  $\beta$ -glukosidázy
- tryptofan pro stanovení tryptofanázové aktivity (tvorba indolu) a tryptofan deaminázové aktivity (TDA)

Příprava:

Před použitím se prášek zhomogenizuje. Do 1 l destilované vody se přidá 56,8 g prášku a směs se promíchává do získání homogenní suspenze. Tento roztok se za častého míchání přivede k varu až do optimálního rozpuštění agaru. Jestliže je to nutné, upraví se pH na 7,3. Poté se roztok sterilizuje v autoklávu při 120°C po dobu 15 minut a ihned se vlije do Petriho misky.<sup>(17)</sup>

Columbia agar

Jedná se o izolační medium navrhnuté pro usnadnění růstu vybraných mikroorganismů. Používá se buď bez obohacení, s přidavkem krve nebo s krví a dalším obohacením. Slouží k:

- izolaci vybraných mikroorganismů
- detekci hemolýzy

*Columbia agar bez obohacení* – pro *Brucella abortus*, *Yersinia pestis*, *Clostridium perfringens*

*Columbia agar s 5 – 10 % sterilní ovčí/koňské krve* – pro vybrané druhy bakterií. Lze detekovat jejich hemolytické reakce

*Columbia agar s 5 – 10 % ovčí krve a s CNA* – pro selektivní izolaci Gram-pozitivních koků [CNA = Colistin (10 mg/l) + Nalixid Acid (15 mg/l)]

*Columbia agar s 10 % vařené krve a s PVS* – čokoládový agar pro *Haemophilus a Neisseria spp.* [PVS = polyvitamic supplement (100 ml/SQF)]<sup>(17)</sup>

Ve své bakalářské práci jsem použila půdu Columbia agar s obsahem 5 – 10 % ovčí krve, jehož základem je krevní agar sloužící k usnadnění růstu vybraných mikroorganismů. Půda obsahuje směs peptonů zvláště podporující kultivaci bakterií (*Streptococcus, Listeria, ...*). Přítomnost krve umožňuje určit hemolýzu, která je základním kritériem pro bakteriální identifikaci.

### 3.4 Vlastnosti laboratorní metody

Vyšetřovaná populace z laboratorního hlediska může patřit do jedné ze dvou skupin: k nemocným nebo zdravým. Vlastnosti metody, které jsou uvedené níže, mi pomohou zjistit, zda vyšetřované osoby jsou nemocné či zdravé. Většinou jsou rozděleny do čtyř skupin, poněvadž i v pozitivních hodnotách se mohou vyskytovat zdravé osoby a v negativních hodnotách osoby nemocné. Pomocí těchto výpočtů získám přehled o jednotlivých metodách z hlediska jejich měření.<sup>(16)</sup>

SP – nemocní s pozitivním testem (správná pozitivita)

FN – nemocní s negativním testem (falešná negativita)

SN – zdraví s negativním testem (správná negativita)

FP – zdraví s pozitivním testem (falešná pozitivita)

#### Senzitivita

Je definována jako podíl počtu nemocných s pozitivním testem a celkového počtu testovaných nemocných. Jedná se o ukazatel odhalující nemoc. Senzitivita udává, s jakou pravděpodobností bude mít nemocná osoba test pozitivní.

$$\text{Senzitivita} = SP/(SP+FN)$$

### Specificita

Je definována jako podíl počtu zdravých osob s negativním výsledkem a celkového počtu testovaných zdravých jedinců. Tímto výpočtem je možno zjistit schopnost metody vyloučit přítomnost nemoci. Vyjadřuje pravděpodobnost negativního výsledku u zdravé osoby.

$$\textit{Specificita} = SN/(SN+FP)$$

### Efektivita (účinnost)

Je definována jako podíl počtu všech správně zařazených jedinců a všech vyšetřených pacientů. Je ukazatelem schopnosti metody správně zařadit zdravé i nemocné jedince. Udává pravděpodobnost výskytu pozitivních výsledků u nemocných a negativních výsledků u zdravých osob.

$$\textit{Efektivita} = (SP+SN)/(SN+SP+FN+FP)$$

### Pozitivní predikční hodnota (PPH)

Určuje schopnost metody najít nemocné mezi všemi jedinci s pozitivním testem.

$$\textit{PPH} = SP/(SP+FP)$$

### Negativní predikční hodnota (NPH)

Udává schopnost metody najít zdravé mezi všemi jedinci s negativním testem.

$$\textit{NPH} = SN/(SN+FN)$$

### Prevalence

Tento výpočet udává výskyt zkoumaného onemocnění v daném časovém okamžiku a v určité vyšetřované populaci. Hodnoty PPH a NPH jsou ovlivněny frekvencí výskytu nemoci ve vyšetřovaných skupinách populace.

$$\textit{Prevalence} = (SP+FN)/SP+FN+SN+FP)$$

### Pozitivní věrohodnost laboratorní zkoušky (LR)

Je definována jako podíl senzitivity a specificity. Ukazuje na schopnost laboratorní zkoušky zachytit přítomnost nemoci při výsledku vyšším než je hraniční hodnota (cut-off). Čím vyšší je LR+, tím vyšší je schopnost metody zachytit nemoc s co nejmenší chybou. Za použitelné se považují hodnoty  $LR+ > 2,0$ .

$$LR+ = \text{senzitivita} / (1 - \text{specificita})$$

### Regresní analýza

Slouží k porovnání dvou metod, které stanovují stejný vzorek. Soubor vzorků se stanovuje původní i novou metodou a výsledky se zanesou do grafu. Původní metoda leží na ose x a nová metoda na ose y. Nejideálnější výsledek je, když se obě metody shodují a  $y = x$ , tzn. že všechny body leží na přímce. Ve skutečnosti tento jev nenastane a vztah mezi výsledky obou metod lze popsat rovnicí regresní přímky:  $y = ax + b$  kde  $a$  je směrnici přímky a vyjadřuje proporcionální složku systematické chyby a  $b$  označuje místo, které přímka protíná na ose y a je mírou konstantní složky systematické chyby.<sup>(34)</sup> Speciálně pro porovnávání 2 metod (kde se předem neví, která je lepší resp. referenční) byla vyvinuta regrese, u které nezáleží, zda je na ose x nebo na ose y nezávislá či závislá veličina. Říká se jí Passing & Bablok.

Korelační koeficient je vyjádřen jako míra rozptylu bodů kolem regresní přímky. Může nabývat maximálně hodnoty rovné 1,0. Jeho hodnota klesá, pokud se zvyšuje rozptyl bodů.

Tento způsob posuzuje pouze míru závislosti mezi metodami, není kritériem pro posouzení shody.<sup>(16)</sup>

### Rozdílový graf (Bland-Altmanův graf)

K porovnání jsem ještě využila postup s použitím rozdílového grafu. Tento způsob také slouží k porovnání metod při stanovení stejného vzorku. Z tohoto grafu jsou patrné významné skutečnosti, např. zda jsou rozdíly přibližně symetricky rozdělené, nachází-li se mezi metodami významný rozdíl nebo zda je nebo není v rozdílech trend.<sup>(32)</sup>

*Výpočty pro zpracování grafů:*

$$\text{Průměr rozdílů} = \sum(x_i - y_i) / n$$

$$\text{Směrodatná odchylka rozdílů (SD)} = \sqrt{\sum (x_i - y_i - (\sum(x_i - y_i)/n))^2 / (n-1)}$$

$$\text{Směrodatná odchylka průměru rozdílů (SEM)} = \text{SD} / \sqrt{n}$$

$$\text{Interval spolehlivosti průměrů rozdílů (IS)} = (\sum(x_i - y_i)/n) \pm 2 * \text{SEM}$$

$$\text{Limity shody (LS)} = (\sum(x_i - y_i)/n) \pm 2 * \text{SD}$$

$$\text{Průměr rozdílů logaritmů} = \sum(\log(x_i) - \log(y_i)) / n$$

$$\text{Směrodatná odchylka rozdílů logaritmů (SD)} = \sqrt{\sum(\log(x_i) - \log(y_i) - (\sum(\log(x_i) - \log(y_i))/n))^2 / (n-1)}$$

$$\text{Směrodatná odchylka průměru rozdílů logaritmů (SEM)} = \text{SD} / \sqrt{n}$$

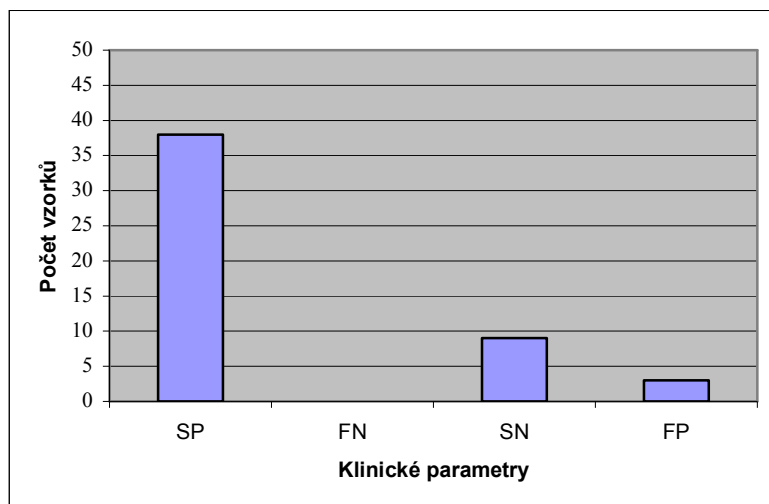
$$\text{Interval spolehlivosti průměru rozdílů logaritmů (IS)} = (\sum(\log(x_i) - \log(y_i))/n) \pm 2 * \text{SEM}$$

$$\text{Limity shody logaritmů (LS)} = (\sum(\log(x_i) - \log(y_i))/n) \pm 2 * \text{SD}$$

## 4. VÝSLEDKY

*Hodnoty získané pomocí analyzátoru URO-QUICK:*

Graf č.1



Graf číslo 1 ukazuje, že jsem u 38 vzorků zjistila správnou pozitivitu, u 9 vzorků správnou negativitu a u 3 vzorků falešnou pozitivitu (falešná negativita zjištěna nebyla).

Tabulka 4 – Četnost jednotlivých zjištěných hodnot

SP		FN		SN		FP	
$10^7$	26	$10^4$	0	$10^4$	6	$10^7$	1
$10^6$	6	$10^3$	0	$10^3$	0	$10^6$	1
$10^5$	6	$10^2$	0	$10^2$	3	$10^5$	1
<b>Součet</b>	<b>38</b>	<b>0</b>		<b>9</b>		<b>3</b>	

Tabulka 4 znázorňuje četnost naměřených hodnot a zároveň označuje, jaké hodnoty jsou označovány za pozitivní a jaké za negativní. Hodnoty jsou změřeny analyzátořem, podle nichž jsem se řídila v následném srovnávání výsledků u dalších dvou metod.

$$\text{Senzitivita} = 38/(38+0)$$

$$\text{Senzitivita} = 1 = 1 \times 100 = 100 \%$$

$$\text{Specificita} = 9/(9+3)$$

$$\text{Specificita} = 0,75 = 0,75 \times 100 = 75 \%$$

$$\text{Efektivita} = 38+9/(38+0+9+3)$$

$$\text{Efektivita} = 0,94 = 94 \%$$

$$\text{PPH} = 38/(38+3)$$

$$\text{PPH} = 0,927 = 92,7 \%$$

$$\text{NPH} = 9/9$$

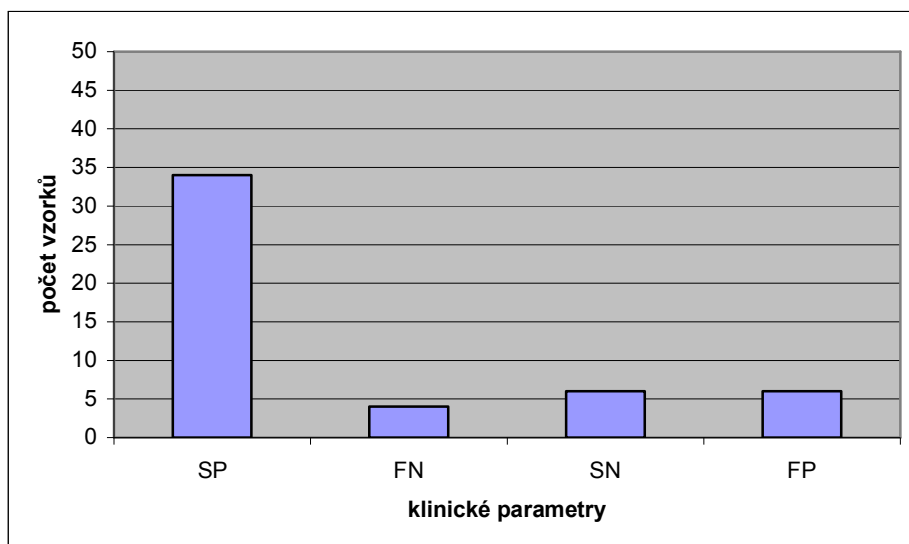
$$\text{NPH} = 1 = 100 \%$$

$$\text{LR+} = 100/(100-75)$$

$$\text{LR+} = 4$$

*Hodnoty získané pomocí metody postupného ředění:*

Graf č. 2



U této metody jsem zjistila 34 vzorků správně pozitivních, 4 vzorky falešně negativních, 6 vzorků správně negativních a 6 vzorků falešně pozitivních.

Tabulka 5 – Četnost jednotlivých zjištěných hodnot

SP		FN		SN		FP	
10 <sup>8</sup>	4	10 <sup>4</sup>	4	10 <sup>4</sup>	1	10 <sup>8</sup>	0
10 <sup>7</sup>	13	10 <sup>3</sup>	0	10 <sup>3</sup>	1	10 <sup>7</sup>	0
10 <sup>6</sup>	13	10 <sup>2</sup>	0	10 <sup>2</sup>	1	10 <sup>6</sup>	2
10 <sup>5</sup>	4			0	3	10 <sup>5</sup>	4
<b>Součet</b>	<b>34</b>	<b>4</b>		<b>6</b>		<b>6</b>	

V tabulce 5 jsou zapsány hodnoty vzorků, které jsem porovnávala s výsledky naměřenými přístrojem URO-QUICK. Mezi správně negativní výsledky jsou zahrnuty 3 vzorky, které neobsahovaly žádné bakterie, ale pouze byly kontaminovány leukocyty a erytrocyty.

$$\text{Senzitivita} = 34/(34+4)$$

$$\text{Senzitivita} = 0,895 = 1 \times 0,895 = 89,5 \%$$

$$\text{Specificita} = 6/(6+6)$$

$$\text{Specificita} = 0,5 = 0,5 \times 100 = 50 \%$$

$$\text{Efektivita} = 34+6/(34+4+6+6)$$

$$\text{Efektivita} = 0,80 = 80 \%$$

$$\text{PPH} = 34/(34+6)$$

$$\text{PPH} = 0,85 = 85 \%$$

$$\text{NPH} = 6/(6+4)$$

$$\text{NPH} = 0,60 = 60 \%$$

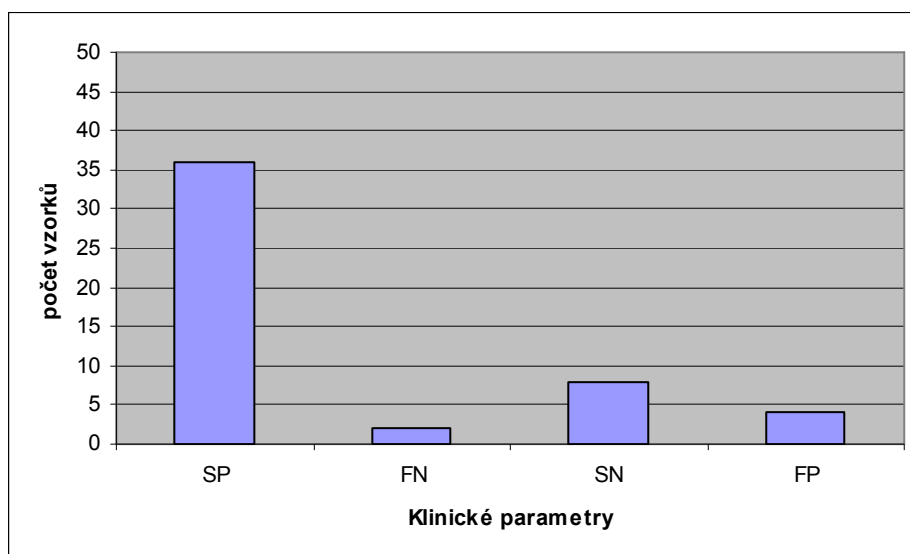


$$LR+ = 89,5/(100-50)$$

$$LR+ = 1,79$$

*Hodnoty získané kultivační metodou za použití filtračního papírku:*

Graf č. 3



Metodou s filtračním papírkem jsem zjistila následující: správně pozitivních vzorků bylo 36, falešně negativních 2, správně negativních 8 a 4 falešně pozitivní vzorky.

Tabulka 6 – Četnost jednotlivých zjištěných hodnot

SP		FN		SN		FP	
$10^7$	31	$10^4$	1	$10^4$	3	$10^7$	0
$10^6$	5	$10^3$	1	$10^3$	0	$10^6$	1
$10^5$	0	$10^2$	0	$10^2$	2	$10^5$	3
				0	3		
<b>Součet</b>	<b>36</b>	<b>2</b>		<b>8</b>		<b>4</b>	

Hodnoty uvedené v tabulce 6 jsou porovnány s výsledky z analyzátoru URO-QUICK, podle nichž jsem také určila jednotlivé klinické parametry.

$$\text{Senzitivita} = 36/(36+2)$$

$$\text{Senzitivita} = 0,947 = 1 \times 0,947 = 94,7 \%$$

$$\text{Specificita} = 8/(8+4)$$

$$\text{Specificita} = 0,667 = 0,667 \times 100 = 66,7 \%$$

$$\text{Efektivita} = 36+8/(36+2+8+4)$$

$$\text{Efektivita} = 0,88 = 88 \%$$

$$\text{PPH} = 36/(36+4)$$

$$\text{PPH} = 0,90 = 90 \%$$

$$\text{NPH} = 8/10$$

$$\text{NPH} = 0,80 = 80 \%$$

$$\text{LR+} = 94,7/(100-66,7)$$

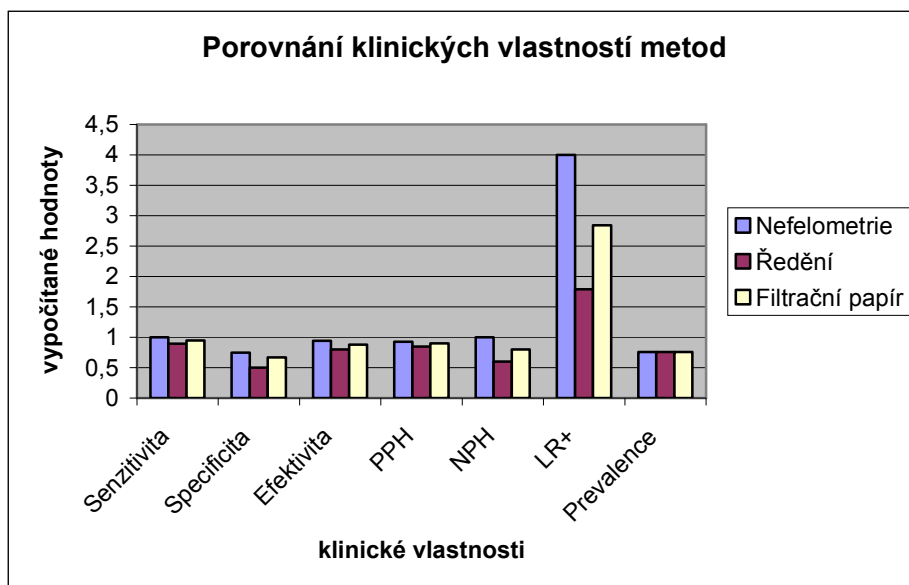
$$\text{LR+} = 2,84$$

Prevalence tohoto onemocnění u uvedené skupiny pacientů je:

$$\text{Prevalence} = 38/50$$

$$\text{Prevalence} = 0,76 = 76\%$$

Graf č. 4



V grafu č. 4 jsou porovnány všechny vypočítané parametry, které slouží k posouzení správnosti měření každé laboratorní metody.

Všechny uvedené údaje jsou shrnuty pro přehlednost do následující tabulky (Tab. 7)

Tabulka 7

	NEFELOMETRIE	ŘEDĚNÍ	FILTRAČNÍ PAPÍR
Senzitivita	100 %	89,5 %	94,7 %
Specifická	75 %	50 %	66,7 %
Efektivita	94 %	80 %	88 %
PPH	92,7 %	85 %	90 %
NPH	100 %	60 %	80 %
LR+	4	1,79	2,84
Prevalence	76 %	76 %	76 %

Tabulka 7 představuje číselné porovnání výsledků jednotlivých vypočítaných hodnot.

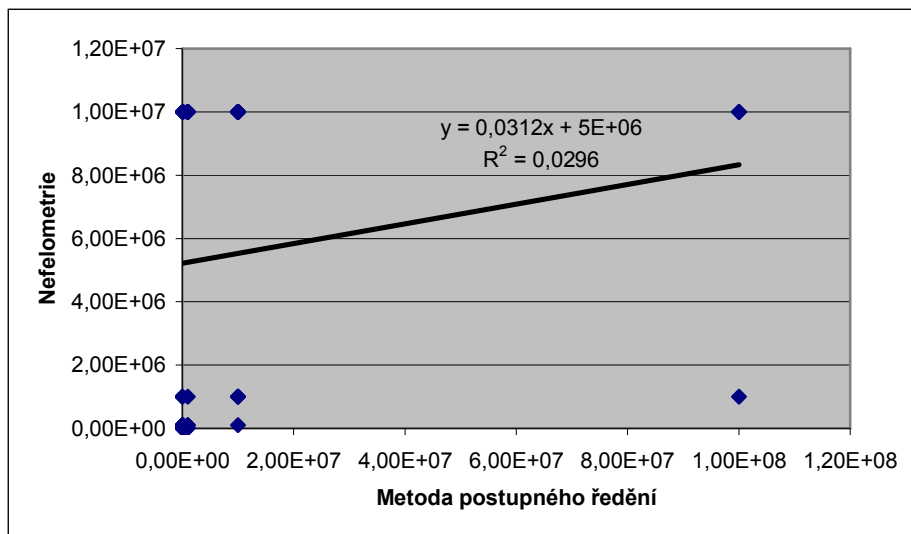
Tabulka 8 - Základní statistika

	Nefelometrie	Ředění	Filtrační papír
počet vzorků	50	50	50
průměr	$5,56 \cdot 10^6$	$1,09 \cdot 10^7$	$6,33 \cdot 10^6$
směrodatná odchylka	$4,83 \cdot 10^6$	$2,66 \cdot 10^7$	$4,70 \cdot 10^6$
rozptyl	$2,33 \cdot 10^{13}$	$7,07 \cdot 10^{14}$	$2,21 \cdot 10^{13}$
median	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^7$
variační koeficient	$8,69 \cdot 10^1$	$2,44 \cdot 10^2$	$7,43 \cdot 10^1$
minimální hodnota	$1 \cdot 10^2$	0	0
maximální hodnota	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^7$
rozpětí	$9,99 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^7$
dolní kvartil	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$3,25 \cdot 10^5$
horní kvartil	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$
šikmost	-0,18	3,06	-0,52
špičatost	-2,04	7,99	-1,79

V tabulce 8 jsou uvedeny základní statistické údaje všech třech použitých metod.

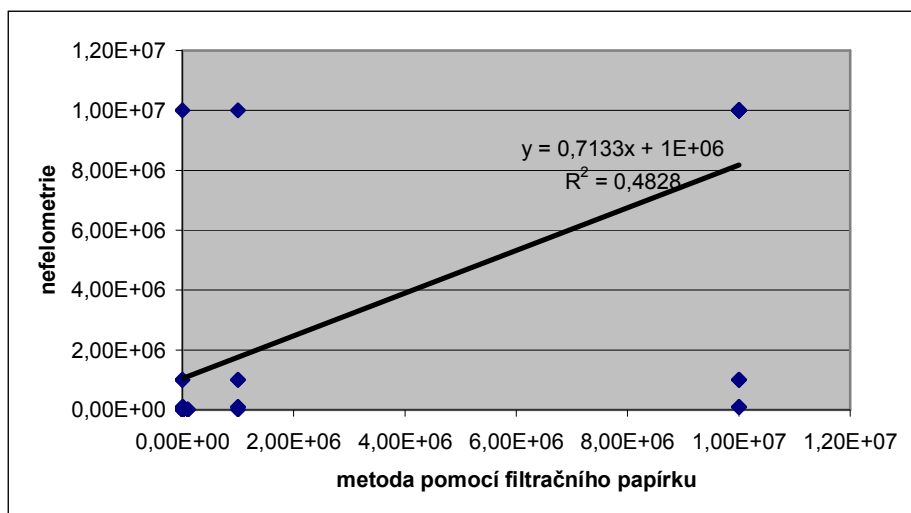
Soubor vzorků analyzovaných jak nefelometricky, tak kultivačně jsem zanesla do grafů a provedla srovnání nefelometrické metody s oběma kultivačními metodami pomocí *regresní analýzy* (graf č.5 a č.6).

Graf č. 5



Graf č. 5 předkládá porovnání výsledků z analyzátoru a metody postupného ředění. Korelační koeficient je roven 0,17.

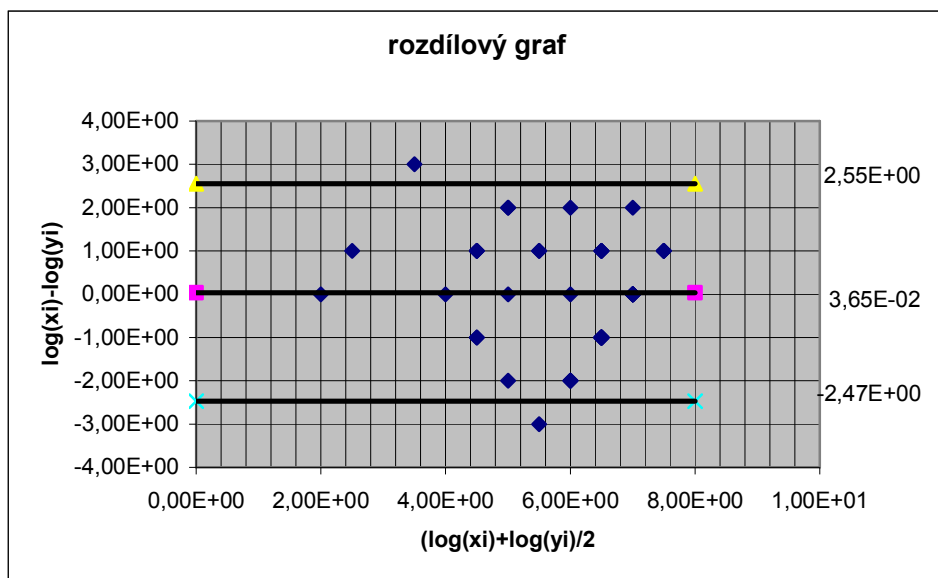
Graf č. 6



Graf č. 6 porovnává výsledky získané nefelometrickým měřením a kultivační metodou za použití filtračního papírku s hodnotou korelačního koeficientu 0,69.

Pomocí rozdílového grafu dle Bland - Altmana jsem znovu porovnála výsledky použitých metod.

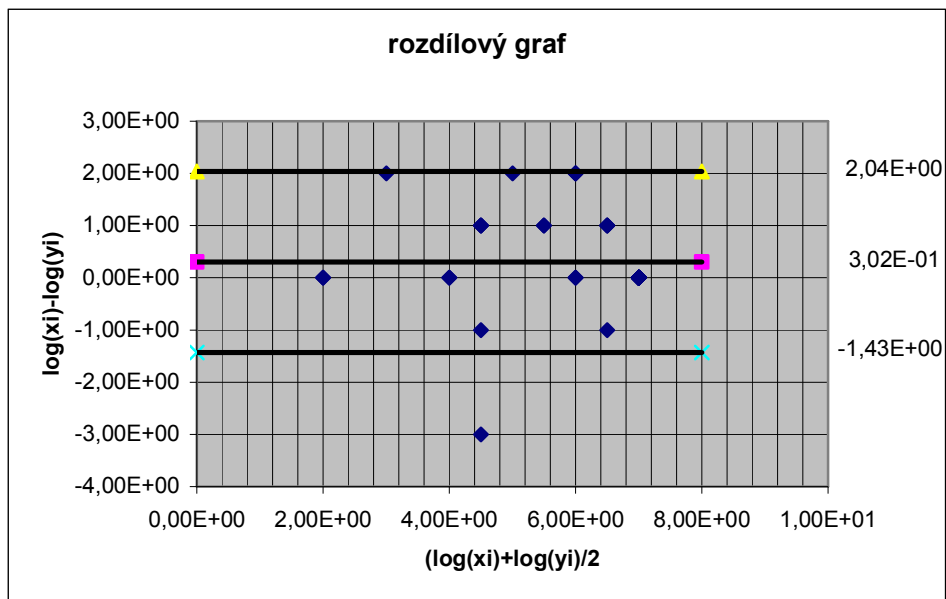
Graf č. 7 - Rozdílový graf logaritmů



V grafu č. 7 jsou porovnány výsledky získané analyzátořem URO-QUICK a metodou postupného ředění. Na hodnotě průměru se nachází 27,66 % hodnot. Mezi hodnotami  $3,65 \cdot 10^{-2}$  a 2,55 se nachází celkem 34,04 % hodnot. Nad hodnotou 2,55 se nachází 2,13 % hodnot. Mezi hodnotami  $3,65 \cdot 10^{-2}$  a -2,47 se nachází dohromady 34,04 % hodnot a pod hodnotou -2,47 se nachází 2,13 % hodnot.

Na ose x jsou vždy vyneseny průměry hodnot získaných metodou postupného ředění (A) a nefelometrickou metodou (B). V grafu č. 7 jsou průměry zlogaritmovaných hodnot ve formě  $(\log(x_i) + \log(y_i))/2$ . Na ose y jsou rozdíly hodnot po zlogaritmování. Hodnota  $3,65 \cdot 10^{-2}$  vyjadřuje průměr rozdílů  $\log(x_i) - \log(y_i)$  a dvě znázorněné odlehlé přímky s hodnotami 2,55 a -2,47 vyjadřují limity shody.

Graf č. 8 - Rozdílový graf logaritmů

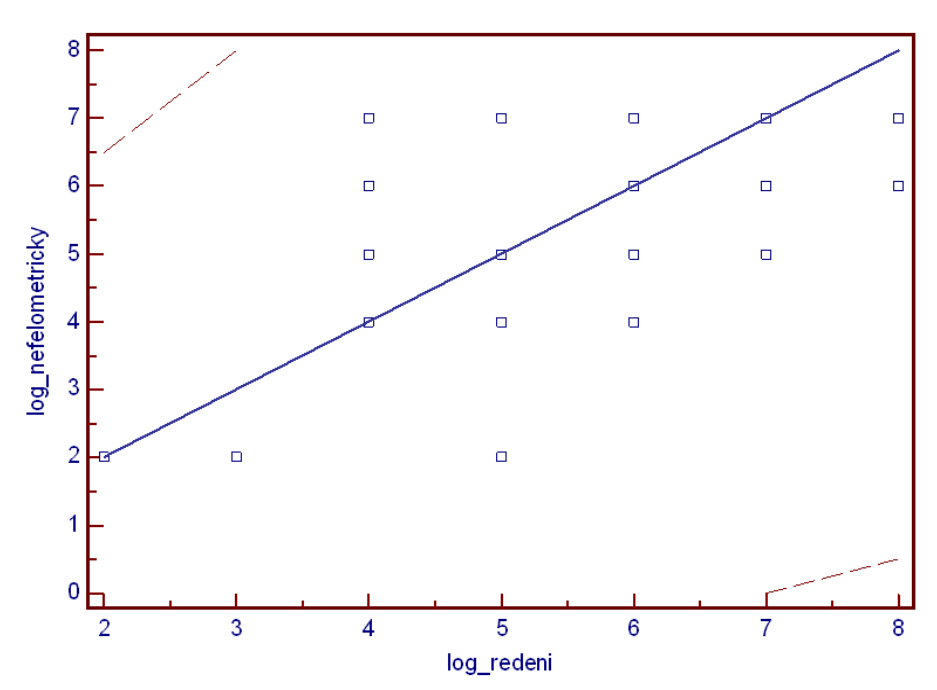


Graf č. 8 zaznamenává hodnoty získané pomocí analyzátoru URO-QUICK a metodou za použití filtračního papírku. V rozmezí hodnot -1,43 a 2,04 se nachází 97,87 % hodnot z toho 27,66 % jich je v kladných a 70,21 % v záporných hodnotách limitu shody. 2,13 % hodnot se nachází mimo.

Na ose x jsou vždy vyneseny průměry hodnot získaných metodou s filtračním papírkem (A) a nefelometrickou metodou (B). V grafu č. 8 jsou průměry zlogaritmovaných hodnot ve formě  $(\log(x_i) + \log(y_i))/2$ . Na ose y jsou rozdíly hodnot po zlogaritmování. Hodnota  $3,02 \cdot 10^{-1}$  vyjadřuje průměr rozdílů  $x_i - y_i$  a dvě znázorněné odlehle přímky s hodnotami 2,04 a -1,43 vyjadřují limity shody.

## Regrese dle Passinga & Babloka

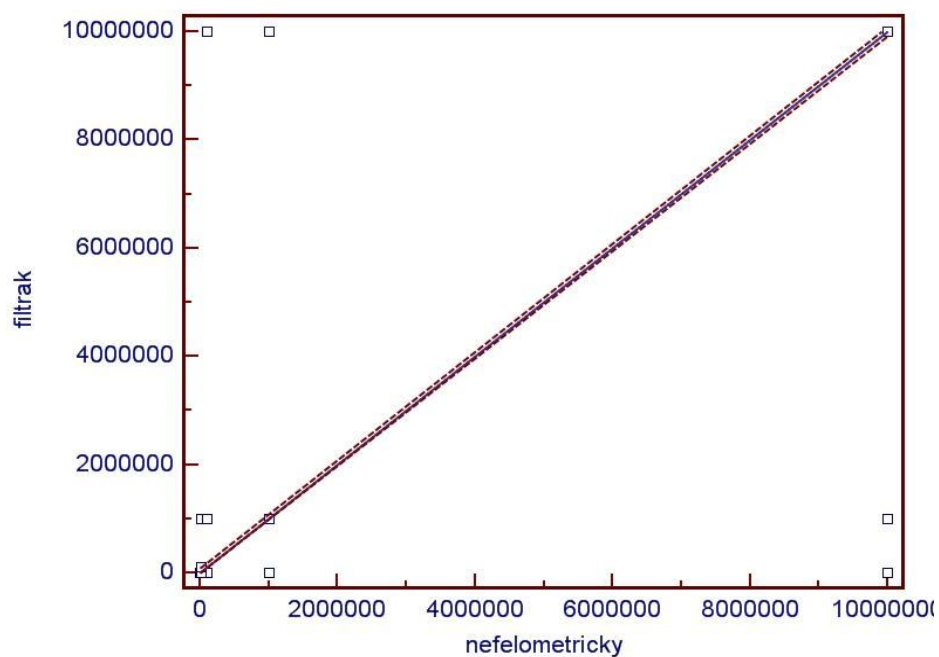
Graf č. 9



Graf č. 9 porovnává výsledky metod získaných měření na analyzátoru a postupným ředěním. Hodnoty jsou uvedeny po zlogaritmování. Plná modrá čára označuje regresní přímku a 2 čárkované hnědé čáry vymezují 95% interval spolehlivosti regresní přímky.



Graf č. 10



Graf č. 10 porovnává hodnoty získané analyzátořem s hodnotami získanými kultivační metodou za použití filtračního papírku. Plnou modrou čarou je označena regresní přímka, jemně tečkovaná hnědá čára je přímkou shody, tj. kudy by regrese probíhala, poskytovali-li by obě metody shodné výsledky) a 2 čárkované hnědé čáry vymezují 95% interval spolehlivosti regresní přímky.

## 5. DISKUZE

Jak již bylo zmíněno na začátku této práce, vyskytují se infekce močových cest na předních příčkách mezi infekčními onemocněními. Je proto nutné věnovat se této problematice jak z hlediska klinického, tak i laboratorního. V mikrobiologické laboratoři je provedena značná část práce vedoucí k průkazu infekčního agens a v případě prokázání infekce i k určení antibiotik, která se nasadí k cílené léčbě pacienta. Při průkazu bakterií v moči nezáleží pouze na dané laboratoři a její správné laboratorní praxi. Musí se především předcházet nejčastějším chybám resp. preanalytickým vlivům, které způsobují, že je poté výsledek nesprávně zhodnocený klinickým mikrobiologem. Osoby – zdravotní sestry odebírající moč a také sami pacienti by měli být poučeni o správném odběru, transportu a také uchování tohoto biologického materiálu (v případě, že není možnost odebraný materiál ihned předat do mikrobiologické laboratoře).

Porovnávala jsem mezi sebou 50 vzorků moči, které jsem statisticky zpracovala. Vlastnosti laboratorní metody jsem spočítala u každého z použitých postupů. Hodnoty, podle kterých jsem určila správnou pozitivitu/negativitu a falešnou pozitivitu/negativitu, jsem porovnávala podle výsledků naměřených na analyzátoru URO-QUICK. Toto měření jsem zvolila jako referenční způsob. Ve třech vzorcích analyzátor ukázal nález, ale jednalo se pouze o kontaminaci leukocyty a erytrocyty. Obě kultivační metody nález neprokázaly. Z tohoto důvodu jsem musela při zpracování logaritmických grafů počítat jen se 47 vzorky.

U měření vzorků pomocí analyzátoru URO-QUICK jsem zjistila, že se jedná o metodu se 100 % senzitivitou, 75 % specificitou a 94 % efektivitou, PPH 92,7 %, NPH 100 % a LR+ 4. Metoda postupného ředění má senzitivitu 89,5 %, specificitu 50 % a efektivitu 80 %, PPH 85 %, NPH 60 %, LR+ 1,79. Druhý kultivační postup - s filtračním papírkem má senzitivitu 94,7 %, specificitu 66,7 % a efektivitu 88 %, PPH 90 %, NPH 80 % a LR+ 2,84. To je šest základních parametrů, podle kterých je možno usuzovat s jakou přesností daná metoda pracuje.

Srovnání metod jsem provedla pomocí regresní analýzy. Při porovnání výsledků získaných analyzátozem a metodou postupného ředění se rovnice regresní přímky rovná:  $y = 0,0312x + 5 \cdot 10^6$ . Hodnota korelačního koeficientu je 0,17. Jednotlivé body jsou velmi odlehlé od přímky regrese. Při srovnání měření analyzátoru a metody s filtračním papírkem se rovnice regrese rovná:  $y = 0,7133x + 1 \cdot 10^6$  s hodnotou korelačního koeficientu 0,69. U porovnání těchto metod se jednotlivé body blíží k přímce regrese. Tímto způsobem se posuzuje pouze míra závislosti mezi zkoumanými metodami. Nejedná se o způsob k posouzení shody. Druhým způsobem regresní analýzy je regrese podle Passinga & Babloka. U porovnání analyzátoru a metody s postupným ředěním je vymezen 95 % interval spolehlivosti regresní přímky. Hodnoty jsou uvedeny po zlogaritmování. Z grafu č.9 je patrné, že se všechny hodnoty vešly mezi dvě přímky vymežující 95 % interval spolehlivosti. Obě metody jsou srovnatelné (významně se od sebe neliší). U automatického systému a metody s filtračním papírkem jsou hodnoty porovnány bez zlogaritmování. Podle grafu č. 10 lze získat přehled o shodě jednotlivých měření. Regresní přímka se téměř překrývá s přímkou shody. Přímka shody představuje, kudy by regrese probíhala, kdyby obě metody poskytovaly shodné výsledky. V grafu jsou označeny přímky vymežující 95 % interval spolehlivosti. U těchto metod se také vyskytuje srovnatelnost (významně se od sebe neliší). U obou porovnání se překrývá přímka shody s regresní přímkou.

Výsledky jsem ještě porovнала pomocí rozdílového grafu podle Bland – Altmana po zlogaritmování. Musela jsem pracovat pouze se 47 hodnotami (poněvadž tři výsledky obsahovaly 0). Ale oba grafy vycházely příznivěji. V prvním případě porovnání, tj. automatický systém vs. metoda postupného ředění se průměr rozdílů  $x_i$  a  $y_i$  pohybuje na hodnotě  $3,65 \cdot 10^{-2}$  a limity shody se nacházejí na hodnotách 2,55 a -2,47. Dané porovnání popisuje graf č.7. Počet výsledků, který se nachází v rozmezí hodnot vyjadřujících limity shody je 95,74 %. V druhém případě porovnání, tj. automatický systém vs. metoda s filtračním papírkem je průměr rozdílů  $x_i$  a  $y_i$   $3,02 \cdot 10^{-1}$  a hodnoty 2,04 a -1,43 vyjadřují limity shody. To je znázorněno v grafu č. 8. Mezi těmito dvěma hodnotami se vyskytuje 97,87 % výsledků. Abych zjistila, jestli je měření na analyzátoru přesnější, bych porovнала součet SP a SN výsledků u každé metody. U

analyzátoru jsem zjistila 47 správně naměřených výsledů, u metody postupného ředění 40 správně naměřených výsledků a metody s filtračním papírkem 44 správně naměřených výsledků.

## 6. ZÁVĚR

Zpracovala jsem vzorky moči popsaným způsobem (kap.3.2 a 3.3). Porovnávala jsem výsledky každé metody a statisticky zhodnotila. Cílem mé práce bylo porovnat tři různé metody pro bakteriologické vyšetření moči a tím zjistit, která z metod je pro laboratoř vhodnější. Analyzátor URO-QUICK bych se 100 % senzitivitou (zachycení všech osob s pozitivním testem) hodnotila jako metodu vhodnou pro screeningové vyšetření. Použití populačního screeningu při vyhledávání určité choroby předpokládá, že nemoc je častá, závažná a léčitelná. Infekce močových cest do těchto kritérií zapadají. Při screeningovém testu je žádoucí, aby byl vysoce senzitivní a vysoce specifický. Bohužel v praxi nelze tento výsledek testu očekávat. Obvykle stačí, aby byla metoda 100 % senzitivní a specifická se nacházela ve vyhovujících hodnotách (jen malé procento dávalo falešně pozitivní výsledky). U analyzátoru jsem zjistila 6 %, u kultivační metody postupného ředění 12 % a metody s použitím filtračního papírku 8 % falešně pozitivních výsledků.

Podle výsledků z automatického systému jsem porovnávala hodnoty z obou kultivačních metod, zvolila jsem tuto metodu jako referenční. Pracovní postup pro analýzu moči je u analyzátoru snadnější, protože by mělo být od výrobce vše sterilní, a jediné, na co se musí dbát, je správné pipetování a správné vložení lahvičky do přístroje, tak aby laserový paprsek mohl procházet přes čisté a neosahané sklo. Jinak by mohly být výsledky zkreslené. Při kultivaci postupným ředěním se vyskytuje u pracovního postupu více negativních vlivů, které ovlivňují výsledný počet bakterií ve vzorku. Je nutné používat sterilní zkumavky, fyziologický roztok i mikrobiologické kličky, pipetovat správným způsobem a správně promíchávat každý obsah zkumavky. Největší chyba může nastat při přenášení 10  $\mu$ l z jedné zkumavky do druhé. U třetího způsobu vyšetření moči může dojít ke kontaminaci vlivem špatné sterilizace použitých materiálů – pinzety a mikrobiologické kličky.

Závěrem lze říci, že automatický systém je metoda vhodná pro screeningové vyšetření. Je to metoda přesnější a v pracovním postupu jednodušší než kultivační

metody. Je rychlejší, poněvadž se na kultivační půdy vyočkují jen ty vzorky moči, které vykazují pozitivní nález. Automatický systém bych považovala za metodu, která je přínosem pro mikrobiologickou laboratoř. Kultivační metodu s použitím filtračního papírku bych zařadila hned za automatický systém URO-QUICK. Není tak přesná jako metoda přístrojová, ale její výsledky se nejvíce shodovaly s výsledky z analyzátoru. Metoda postupného ředění je hodně náročná na přesnost, že ji nelze doporučit. Ale po statistickém zpracování nelze říci, že by se výsledky obou kultivačních metod výrazně lišily od výsledků naměřených na analyzátoru. Předpokládané hypotézy se tak potvrdily.

## **7. KLÍČOVÁ SLOVA**

Bakteriurie

Infekce močových cest

Kultivace bakterií

Kultivační media

Nefelometrie

Key words

Bacteriuria

Urinary tract infections

Cultivation of bacteria

Culture medium

Nephelometry

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. GREENWOOD, D. - SLACK, R.C.B. et al. Lékařská mikrobiologie, Praha, Grada Publishing, 1999, pp. 39-47. ISBN 80-7169-365-0
2. VOTAVA, M. Lékařská mikrobiologie obecná, 2.vydání, Brno, Neptun, 2005, pp. 328,334-336. ISBN 80-86850-00-5
3. VOTAVA, M. Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii, Brno, Hortus, 1999, pp.408
4. TEPLAN, V. Infekce ledvin a močových cest v dospělém a dětském věku, 1. vydání, Praha, Grada Publishing, 2004, pp. 31-114, ISBN 80-247-0566-4
5. MATUŠOVIČ, K. Infekce močových cest [online]. 2001. [15.1.2009].  
Dostupné z < <http://www.cls.cz/dokumenty2/postupy/r114.rtf> >
6. BÉBROVÁ, E. Infekce močových cest-mikrobiologická diagnostika [online]. 2002. [15.1.2009].  
Dostupné z < <http://www.cls.cz/dokumenty2/postupy/t155.rtf> >
7. ČERMÁK, P. - FÖRSTL, M. Zásady odběru a zasílání biologického materiálu k bakteriologickému vyšetření u dětí [online]. 2.4 2003. [15.1.2009].  
Dostupné z < <http://www.solen.cz/pdfs/ped/2003/04/02.pdf> >
8. KOLSKÝ, A. et al. Terapie infekce močových cest u dětí [online]. 8.5 2003. [16.1.2009].  
Dostupné z < <http://www.solen.cz/pdfs/ped/2003/05/08.pdf> >
9. BARTONÍČKOVÁ, K. Infekce dolních močových cest [online]. 2001. [16.1.2009].  
Dostupné z < <http://www.cls.cz/dokumenty2/postupy/r158.rtf> >



10. MILLER, J. M. A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology, Washington, American Society for Microbiology, 1999, ISBN 1-55581-138-8
11. DOLEŽALOVÁ, V. et al. Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii, 4. vydání, Brno, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, pp.76-77, ISBN 80-7013-198-5
12. RETELJ, M.J. – HARLANDER, T. Chromogenic media for urine cultures can be cost-effective [online]. 2.7.2007. [20.2.2009].  
Dostupné z < <http://vestnik.szcd.si/st07-3/145-149.pdf> >
13. PERRY, J.D. – BUTTERWORTH, L.A. et al. Evaluation of a new chromogenic medium, Uriselect 4, for the isolation and identification of urinary tract pathogens [online]. 20.2.2003. [20.2.2009].  
Dostupné z < <http://jcp.bmjournals.com/cgi/content/abstract/56/7/528> >
14. PACÍK, D. Urologie pro sestry, 1. vydání, Brno, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996, pp. 17-19, ISBN 80-7013-235-3
15. KLABAN, V. Ilustrovaný mikrobiologický slovník, 1. vydání, Praha, Galén, 2005 pp 654, ISBN 80-7262-341-9
16. RACEK, J. et al. Klinická biochemie, 2. vydání, Praha, Galén, 2006, pp. 33-45 ISBN 80-7262-324-9.
17. KULTIVAČNÍ PŮDY [online]. 2009. [27.1.2009].  
Dostupné z < <http://www.biorad.com> >
18. BARTONÍČKOVÁ, K. Infekce močových cest [online]. 13.5 2003. [18.1.2009].  
Dostupné z < <http://www.remedia.cz/pdf/20060425022417farmak3-5-03.pdf> >

19. MATOUŠKOVÁ, M. Terapie infekcí močových cest [online]. 15.4 2005. [18.1.2009].  
Dostupné z < [http://www.remedia.cz/pdf/20060516035520mocove\\_infekce.pdf](http://www.remedia.cz/pdf/20060516035520mocove_infekce.pdf) >
20. KOLÁŘ, M. – LOCHMANNOVÁ, J. et al. Nozokomiální infekce močového traktu, mikrobiologická diagnostika a léčebné možnosti [online]. 5/2005. [18.1.2009].  
Dostupné z < <http://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2005/05/04.pdf> >
21. BENEŠ, J. – STRÁNSKÝ, P. et al. Základy lékařské biofyziky, Praha, Univerzita Karlova v Praze, 2005, pp. 196. ISBN 80-246-1009-4
22. NAVRÁTIL, L. – ROSINA, J. et al., Medicínská biofyzika, Praha, Grada Publishing,a.s., 2005, pp. 524. ISBN 80-247-1152-4
23. ROSINA, J. – KOLÁŘOVÁ, H. et al. Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů, Praha, Grada Publishing,a.s., 2006, pp. 232. ISBN 80-247-1383-7
24. NAVRÁTIL, L. – ROSINA, J. Lékařská biofyzika, Praha, Manus, 2000, pp. 357. ISBN 80-902318-5-3
25. HAVLÍK, J. et al. Infekční nemoci (Příručka pro praktické lékaře), Praha, Galén, 1998, pp. 123-128. ISBN 80-85824-90-6
26. ISENBERG, H. D. Essential Procedures for Clinical Microbiology, Washington, American Society for Microbiology, 1998, pp. ISBN 1-55581-125-6
27. BARROW, G.I. – FELTHAN, R.K.A. Cowan and Steel's, Manual for the Identification of Medical Bacteria, Cambridge, Press Syndicate of the University Cambridge, 1993, pp. 212-213, ISBN 0-521-32611-7

28. BOYD, R.F. – MARR, J.J. Medical Microbiology, Boston, Little, Brown and Company, 1980, pp.702-705, ISBN 0-316-10432-9
29. MAREK, J. et al. Farmakoterapie vnitřních nemocí, Praha, Grada Publishing, 2005, pp. 127-129. ISBN 80-247-0839-6
30. ODDĚLENÍ MEDICÍNSKÉ INFORMATIKY [online].2006. [9.4.2009].  
Dostupné z < <http://ucebnice.euromise.cz> >
31. AGAR [online]. 2009. [10.3.2009].  
Dostupné z < <http://en.wikipedia.org/wiki/Agar> >
32. UČEBNÍ TEXT [online]. 20.11.2008. [5.4.2009].  
Dostupné z < <http://www1.lfl.cuni.cz/~ldohna/publik.htm> >
33. URO-QUICK<sup>TM</sup> – návod k použití
34. UČEBNÍ TEXT [online]. 2009. [13.4.2009].  
Dostupné z < [fzp.ujep.cz/~synek/statistika/prednasky/LESS7COR2.DOC](http://fzp.ujep.cz/~synek/statistika/prednasky/LESS7COR2.DOC) >

## **9. PŘÍLOHY**

Příloha č. 1: Naměřené výsledky

Příloha č. 2: Schéma screeningové metody

Příloha č. 1: Naměřené výsledky

Číslo vzorku	Analyzátor URO-QUICK	Metoda postupného ředění	Metoda s filtračním papírkem
1	$10^6$	$10^7$	$10^7$
2	$10^7$	$10^7$	$10^7$
3	$10^6$	$10^6$	$10^6$
4	$10^2$	$10^4$	$10^4$
5	$10^4$	$10^4$	$10^4$
6	$10^7$	$10^5$	$10^7$
7	$10^7$	$10^5$	$10^7$
8	$10^7$	$10^6$	$10^7$
9	$10^7$	-	-
10	$10^4$	$10^5$	$10^5$
11	$10^5$	$10^4$	$10^4$
12	$10^5$	$10^5$	$10^5$
13	$10^7$	$10^5$	$10^7$
14	$10^7$	$10^7$	$10^7$
15	$10^7$	$10^6$	$10^7$
16	$10^4$	$10^4$	$10^5$
17	$10^7$	$10^5$	$10^7$
18	$10^7$	$10^5$	$10^7$
19	$10^7$	$10^5$	$10^7$
20	$10^7$	$10^5$	$10^7$
21	$10^7$	$10^5$	$10^7$
22	$10^2$	$10^2$	$10^2$
23	$10^4$	$10^5$	$10^5$
24	$10^6$	-	-

25	$10^6$	$10^6$	$10^7$
26	$10^7$	$10^7$	$10^7$
27	$10^6$	$10^5$	$10^6$
28	$10^7$	$10^6$	$10^7$
29	$10^7$	$10^6$	$10^7$
30	$10^7$	$10^6$	$10^7$
31	$10^7$	$10^5$	$10^6$
32	$10^5$	$10^6$	$10^6$
33	$10^6$	$10^6$	$10^7$
34	$10^7$	$10^5$	$10^7$
35	$10^6$	$10^3$	$10^3$
36	$10^7$	$10^6$	$10^7$
37	$10^7$	$10^6$	$10^7$
38	$10^7$	$10^6$	$10^7$
39	$10^5$	-	-
40	$10^2$	$10^2$	$10^2$
41	$10^5$	$10^5$	$10^6$
42	$10^4$	$10^3$	$10^4$
43	$10^7$	$10^6$	$10^7$
44	$10^5$	$10^3$	$10^7$
45	$10^7$	$10^4$	$10^7$
46	$10^7$	$10^4$	$10^7$
47	$10^7$	$10^4$	$10^7$
48	$10^5$	$10^3$	$10^7$
49	$10^4$	$10^4$	$10^5$
50	$10^7$	$10^3$	$10^7$

Zdroj: vlastní výzkum

Příloha č. 2: Screeningová metoda

