

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Vyšetřování hemokultur

bakalářská práce

Autor práce: Radka Šindelářová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Magda Balejová

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2013

Abstrakt

Infekce krevního řečiště patří k nejzávažnějším patologickým stavům s často velmi těžkým, až smrtelným průběhem, a proto je mikrobiologické vyšetřování hemokultur velmi důležité. Infekce krevního řečiště způsobují různé mikroorganismy – bakterie, viry, paraziti a mykotická agens. Každý z nich v organismu vyvolává jinou reakci a klinický průběh.

Hlavními cíli této bakalářské práce bylo seznámit se s možnostmi vyšetření infekcí krevního řečiště, osvojit si techniku zpracování hemokultur v bakteriologické laboratoři Nemocnice České Budějovice, a.s., na základě výsledků stanovit procento pozitivitu za měsíce září a říjen 2012 a jaká agens a s jakou četností byla z pozitivních hemokultivačních lahvíček zachycena.

Teoretická část se zabývá vysvětlením základních pojmů, které jsou spojeny s infekcemi krevního řečiště a jejich komplikacemi. Dále jsem se zabývala možnostmi vyšetření v jiných laboratorních oborech – biochemii a hematologii, která jsou pro diagnostiku těchto infekcí velmi důležitá, a jejich význam je zejména v rychlosti získání výsledku. Hlavním vyšetřením je ale vyšetření klinické mikrobiologie, kdy kultivace agens, která tato onemocnění vyvolávají, jejich rychlá identifikace a určení citlivosti k antimikrobním látkám vede k urychlené a cílené léčbě. Poslední oddíl teoretické části jsem věnovala jednotlivým agens, která mohou infekce krevního řečiště způsobit.

V praktické části je popsán postup, jakým byly hemokultury zpracovány. Nejprve se věnuji popisu preanalytické části vyšetření vzorku, které je velmi významné. Sem je zahrnut odběr a transport vzorku do laboratoře. Zdravotní personál, který odběr provádí, by měl být řádně poučen, jak při odběru postupovat, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku a pacientovi tak nebyla zbytečně naordinována antibiotická léčba.

Samotná analytická část vyšetření se prováděla v hemokultivačním systému Bact/ALERT 3D BioMérieux, jehož princip je založen na kolorimetrické detekci CO₂,

který vzniká při množení bakterií. Pokud přístroj vyhodnotil hemokultivační lahvičku pozitivně, byla dále zpracována – vyočkována na pevná média a byl zhotoven mikroskopický preparát.

Výsledky výzkumu jsou zobrazeny pomocí jednoduché statistiky v grafech a přehledné tabulce. Ze stanovení procenta positivity, které vyobrazují grafy, je výsledek za měsíce září a říjen roku 2012 17 %. Dalším cílem bylo stanovení izolovaných agens. Tyto výsledky jsou v tabulce, kde jsem uvedla počet jejich zastoupení a jejich relativní četnost. Nejčastěji byly izolovány *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* a *Staphylococcus aureus*.

Výsledky, ke kterým jsem v této práci dospěla, jsou podobné výsledkům v zahraniční literatuře. Výskyt *Escherichia coli* a koaguláza-negativních stafylokoků se uvádí v četnostech výskytu agens izolovaných z hemokultur na prvním místě. Při izolaci koaguláza-negativních stafylokoků je ale třeba zvažovat jejich výskyt jako možnou kontaminaci kožní flórou při odběru hemokultury.

Během praktické části bakalářské práce jsem se blíže seznámila s provozem bakteriologické laboratoře a metodami její práce, včetně techniky zpracování hemokultur. Tyto činnosti jsou nezbytnou součástí diagnostiky infekčních onemocnění a léčby pacienta.

Abstract

Bloodstream infections are among the most serious pathologies with often severe or even fatal course, and therefore the microbiological testing blood cultures is very important. Bloodstream infections caused by various microorganisms – bacteria, viruses, parasites and fungal agents. Each of them in the organism induces a different response and clinical course.

The aim of this work was to ascertain the possibility of investigating bloodstream infections, appropriate the technique of treatment of blood cultures in the laboratory of bacteriology in České Budějovice Hospital, Inc. and based on the results determine the percentage of positivity for the months of September and October 2012 and which agents and with what frequency was from the positive blood cultures caught.

The theoretical part deals with the explanation of basic concepts that are associated with bloodstream infections and their complications. I also explore the possibilities of investigation in other laboratory branches – biochemistry and hematology which are also very important for the diagnostics of this infections and their importance is especially in speed of obtaining results. The main examination is the clinical microbiology one where culturing agents that cause these diseases, the rapid identification and determination of susceptibility to antimicrobial agents leads to accelerated and targeted therapy. The last section of the theoretical part I dedicated to individual agents that can cause bloodstream infections.

The practical part describes the procedure by which blood cultures were processed. At first, I describe the pre-analytical sample testing, which is very important. Here is included the sampling and sample transport to the laboratory. Medical personnel, which take the sampling, should be duly lessoned how to act during the sampling to avoid contamination of the sample, so the patient was not been needlessly prescribed antibiotics.

The actual analysis of the examination were performed in blood cultures system the Bact/ALERT 3D bioMerieux, whose principle is based on the colorimetric detection of CO₂, arising from the growth of bacteria. If the unit is assessed positively, blood cultures bottle was further processed – inoculated on solid media and microscopic specimen was taken.

The research results are displayed using simple statistics in graphs and a chart. From the assignment of the percentage of positivity, that are depicted in the graphs, the result for the months of September and October of 2012 is 17%. Another objective was to determine the isolated agent. These results are in a chart where I put the number of their representation and their relative frequency. The most common were isolated: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus aureus*.

The results, which I reached in this work, are similar to the results in the international literature. The occurrence of *Escherichia coli* and coagulase-negative staphylococci is presented in the frequency of incidence of agents isolated from the blood cultures in the first place. During the isolation of coagulase-negative staphylococci should be considered their incidence as a possible contamination of the skin flora in case of the taking of blood cultures.

During the practical part of the thesis I was closer acquaint with the operation of bacteriological laboratories and methods of its work including techniques of blood cultures processing. These activities are the necessary part of diagnostics of infectious diseases and treatment of the patient.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem 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 fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2013

.....

Radka Šindelářová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat MUDr. Magdě Balejové za vedení práce, za poskytnuté informace a čas. Dále své rodině a blízkým za podporu a pomoc při studiu.

Obsah

ÚVOD	11
1. SOUČASNÝ STAV	12
1.1 Člověk a infekce	12
1.2 Základní definice pro různá stádia rozvoje sepse	13
1.2.1 SIRS	13
1.2.2 Sepse	14
1.2.3 Těžká sepse	14
1.2.4 MODS	14
1.2.5 Sepse a mortalita	14
1.4 Nozokomiální infekce (NI)	15
1.3 Laboratorní diagnostika IKŘ	16
1.3.1 Mikrobiologické vyšetření	16
1.3.2 Biochemické vyšetření	18
1.3.3 Hematologické vyšetření	19
1. 4 Nejčastěji izolované bakteriální rody a druhy v souvislosti s IKŘ	20
1.4.1 Gram-pozitivní koky	20
1.4.1.1 Rod <i>Staphylococcus</i>	20
1.4.1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
1.4.1.1.2 Koaguláza-negativní stafylokoky	21
1.4.1.2 Rod <i>Streptococcus</i>	21
1.4.1.2.1 <i>Streptococcus pyogenes</i>	21
1.4.1.2.2 <i>Streptococcus agalactiae</i>	22
1.4.1.2.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	22
1.4.1.2.4 Ostatní streptokoky	22
1.4.1.3 Rod <i>Enterococcus</i>	23
1.4.2 Gram-negativní koky	23
1.4.2.1 <i>Neisseria meningitidis</i>	23
1.4.3 Gram-negativní tyčky	23
1.4.3.1 Rod <i>Escherichia</i>	23
1.4.3.2 Rod <i>Klebsiella</i>	24

1.4.3.3 Rod <i>Enterobacter</i>	24
1.4.3.4 Rod <i>Proteus</i>	24
1.4.3.5 Rod <i>Pseudomonas</i>	25
1.4.3.6 Rod <i>Acinetobacter</i>	25
1.4.3.7 HACEK.....	25
1.4.4 Gram-pozitivní tyčky	26
1.4.4.1 Rod <i>Bacillus</i>	26
1.4.5 Kvasinky	26
2. CÍLE PRÁCE	27
2.1 Cíle práce	27
3. METODIKA.....	28
3.1 Charakteristika souboru.....	28
3.2 Postup výzkumu	28
3.2.1 Odběr a transport vzorku	28
3.2.2 Princip a práce s přístrojem BacT/ALERT 3D	29
3.2.3 Negativní hemokultury.....	31
3.2.4 Pozitivní hemokultury	32
3.2.4.1 Zhotovení mikroskopického preparátu	32
3.2.4.2 Kultivace	33
4. VÝSLEDKY	38
4.1 Procento pozitivity	38
4.1 Izolovaná agens	40
5. DISKUZE.....	43
6. ZÁVĚR.....	45
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	46
8. KLÍČOVÁ SLOVA.....	49

Seznam použitých zkratek

ARO	anesteziologicko-resuscitační oddělení
CDC	z anglického – Centers for Disease Control and Prevention
CRP	C-reaktivní protein
CŽK	centrální žilní katétr
G-CSF	z anglického – granulocyte-colony stimulating factor
IKŘ	infekce krevního řečiště
IL	interleukin
JIP	jednotka intenzivní péče
LIS	laboratorní informační systém
MODS	z anglického – multiple organ dysfunction syndrome
MRSA	Methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NI	nozokomiální infekce
paCO ₂	parciální tlak oxidu uhličitého
SIRS	systemová zánětová odpověď organismu
TNF	z anglického – tumor necrosis factor
VRSA	Vancomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>

ÚVOD

„Zdraví – to je taková ošklivá nemoc, říkají bakterie.“

(Piet Hein)

Bakterie, viry a houbovitě organismy jsou nejčastějšími příčinami infekce v lidském organismu. Tyto infekce mohou vést v některých případech k infekcím krevního řečiště a sepsi a tím ohrožovat pacienta na životě. Incidence sepse je u pacientů stále vysoká s mortalitou až 50 %. Důležité je toto onemocnění rychle diagnostikovat, provést nezbytná vyšetření a zahájit antimikrobiální léčbu. Proto představuje diagnostika infekcí krevního řečiště a sepse jedno z nejdůležitějších vyšetření v laboratořích klinické mikrobiologie.

V poslední době narůstá, i v důsledku lepší sledovanosti, výskyt nozokomiálních infekcí, jejichž původci jsou často multirezistentní na antibiotika, což způsobuje i obtížnou léčbu těchto infekcí. Jednou z častých příčin jsou infekce pacientů se zavedenými intravaskulárními katétry nutnými pro aplikaci léčiv u těchto pacientů.

Rychlá diagnostika sepse využívá vyšetření tzv. markerů sepse, nejčastěji se jedná o prokalcitonin, IL-6 a CRP. Dalším důležitým úsekem je vyšetření hematologické, a tím jsou leukocytární změny, především změny v počtu leukocytů. Zásadní je mikrobiologické vyšetření, jehož cílem je stanovení původce infekcí krevního řečiště a také zdroje těchto infekcí. Klíčový je správný odběr vzorku možný jen při dostatečné edukaci zdravotnického personálu. Stanovení citlivosti na antibiotika, které se u každého kmene provádí, je nesmírně důležité pro cílenou léčbu pacienta i monitorování výskytu multirezistentních kmenů.

V práci jsou řešeny současné možnosti laboratorní diagnostiky infekcí krevního řečiště a jejich používání v mikrobiologické laboratoři. Cílem práce bylo zjištění, jaká agens a v jaké frekvenci se u infekcí krevního řečiště nejčastěji vyskytují. Součástí práce bylo osvojení si metod vyšetřování hemokultur v mikrobiologické laboratoři.

1. SOUČASNÝ STAV

1.1 Člověk a infekce

Vzájemný vztah mezi mikroorganismem a makroorganismem může mít tři základní formy:

- komenzalismus – kdy jednomu z partnerů vztah prospívá, ale druhému neškodí ani neprospívá
- symbioza – kdy oba partneři mají ze soužití prospěch
- parazitismus – kdy jednomu z partnerů vztah prospívá, ale druhému škodí

Klinická mikrobiologie se zabývá především mikroby vyvolávající onemocnění člověka, tedy pro člověka patogenními. Termínem patogenita rozumíme schopnost poškozovat hostitele a vyvolat u něho onemocnění, to se označuje jako infekce. Infekci můžeme tedy považovat jako přítomnost mikroorganismu u hostitele, na kterého působí nepříznivě (26).

Přítomnost životaschopných bakterií v krvi, se označuje jako bakteriémie. Pokud je bakteriémie krátkodobá, nemusí se u člověka ani klinicky projevit. Nejčastěji se s ní setkáváme u drobných chirurgických výkonů, např. při chirurgických zákrocích v dutině ústní, při katetrizaci močového měchýře, gastrokopii apod., ale i při běžném čištění zubů. Obvykle jsou tyto bakterie rychle zachyceny buňkami imunitního systému. (17, 21, 26).

Jestliže je průnik mikroorganismů do krevního řečiště provázen klinickými příznaky, jedná se o infekce krevního řečiště (IKŘ). Tento stav je klinicky velmi vážný a může ohrožovat pacienta na životě. Zdroj IKŘ se může nacházet přímo v krevním řečišti nebo mimo něj.

Pokud je zdroj IKŘ přímo v krevním řečišti, jedná se o IKŘ primární. Mezi tyto infekce řadíme infekce cévních katétrů a infekční endokarditidu.

Při sekundárních IKŘ je zdroj infekce mimo krevní řečiště. Z tohoto ložiska pak mikroorganismy migrují do krve.

Přítomnost bakterií v krevním řečišti se u pacienta projeví horečkou/hypotermií, změnami v bílém krevním obraze atd. (11, 26).

1.2 Základní definice pro různá stádia rozvoje sepse

V roce 1991 navrhla konsensuální konference intenzivistů a plicních specialistů v Chicagu nové definice a novou koncepci pro různá stádia rozvoje sepse. Bylo tak učiněno vzhledem k tomu, že pro různé stavy při IKŘ se používala ne vždy ve stejných případech řada názvů. Například sepse, bakteriémie, septikémie a septický syndrom. Nyní je stanovena definice SIRS, sepse, těžká sepse a MODS (MOF), která popisují jednotlivá stádia jednoho patofyziologického stavu.

1.2.1 SIRS

SIRS je syndrom systémové zánětlivé odpovědi organismu. Může být vyvolán infekčním i neinfekčním podnětem. SIRS je zánětlivá reakce organismu bez přítomnosti infekce. Aby mohla být SIRS pacientovi diagnostikována, musí splňovat dvě ze čtyř těchto stanovených kritérií:

- teplota nad 38°C nebo pod 36°C
- srdeční frekvence nad 90 tepů/min
- tachypnoe s frekvencí nad 20/min nebo projevující se $\text{paCO}_2 < 4,3 \text{ kPa}$ (32 mmHg)
- leukocytóza $> 12 \times 10^9/l$ nebo $< 4 \times 10^9/l$ nebo více než 10 % nezralých neutrofilů (tyček)

Podle většiny expertů jsou kritéria této definice příliš mírná a splní je téměř každý pacient na oddělení JIP či ARO, a proto je definice SIRS nejvíce kritizována (18, 19, 22).

1.2.2 Seps

Jedná se o podskupinu SIRS. Pod pojmem seps rozumíme systémovou zánětlivou reakci organismu na přítomnost infekce s cílem eliminace zdroje infekce. Kritéria pro diagnostiku seps jsou stejná jako u SIRS (18, 19).

1.2.3 Těžká seps

Těžká seps je spojena s orgánovou dysfunkcí (podle některých autorů stačí dysfunkce jednoho orgánu, podle jiných je potřeba dysfunkce dvou a více orgánů), známky hypoperfúze (laktátová acidóza, oligurie, pokles trombocytů) nebo sekundární hypotenze (musí být následkem seps).

Těžká seps může vyústit v septický šok, charakteristický hypotenzí, hypoperfúzí a orgánovou dysfunkcí, která přetrvává i přes adekvátní infúzní terapii (19).

1.2.4 MODS

Syndrom multiorgánové dysfunkce je stav, při kterém činnost pro život důležitých orgánů (např. ledvin, jater) nebo orgánového systému není schopna zajistit homeostázu organismu bez terapie. MODS můžeme rozdělit na primární a sekundární.

Primární MODS vzniká do 48 hodin jako přímý důsledek vyvolávajícího inzultu. Většinou vede k místní zánětové odpovědi v postiženém orgánu.

Sekundární MODS se vyvíjí následkem SIRS, který je odezvou organismu na inzult. Vzniká tedy po určité latentní fázi – po 48 hodinách (18, 19, 28).

1.2.5 Seps a mortalita

Udává se, že mortalita u pacientů se známkami SIRS je 6–27 %, u seps je to až 36 %, u těžké seps až 52 % a u septického šoku až 82 %.

Mnoho pacientů ale trpí současně ještě další chorobou (např. rakovina, zápal plic), a jelikož je úmrtí přisuzována těmto chorobám, může být skutečný počet zemřelých až o 50 % vyšší (6, 27).

1.4 Nozokomiální infekce (NI)

Definice CDC charakterizují NI jako lokalizovanou nebo systémovou reakci organismu na přítomnost infekčního původce nebo jeho toxinu, která nebyla přítomna nebo nebyla v inkubační době v čase přijetí do nemocniční péče. Za inkubační dobu u bakteriální infekce je považováno právě 48 hodin.

Většina IKŘ vzniká v souvislosti s hospitalizací pacienta, jsou to tedy infekce nozokomiální. Za bakteriémie nozokomiálního původu jsou považovány ty, ke kterým došlo v časovém rozmezí delším než 48 hodin od hospitalizace pacienta nebo pokud byl pacient hospitalizován v předchozích deseti dnech před vznikem bakteriémie (7). Opakem NI jsou komunitní infekce, vznikající bez souvislosti s hospitalizací.

Od pojmu infekce je třeba odlišit kolonizaci. Kolonizace je definována jako přítomnost potenciálně patogenních mikroorganismů na kůži, sliznicích, v ráně nebo sekretech, která ovšem nevede k rozvoji a projevům infekce. Opakem NI jsou komunitní infekce.

NI se ve velké míře podílejí na vzniku sepse a MODS. Nejvíce se tyto infekce objevují na oddělení JIP, a to o 5–10krát více než na ostatních odděleních. I mortalita na NI je na odděleních JIP velmi vysoká. Záleží na mnoha okolnostech a pohybuje se od 20 do 100 %. Nejčastěji pacienti umírají na multiorgánové selhání, které je až v 70 % spuštěno NI.

Podle původu můžeme rozdělit NI na exogenní, kdy se infekční agens dostane do organismu zvenčí (kontaminované předměty, jiní pacienti, personál); a na endogenní, kdy nemocniční nákazu vyvolává vlastní mikroflóra pacienta (agens je z místa kolonizace zavléčeno jinam). NI mohou vznikat i důsledkem lékařského výkonu, kdy přechází k přenosu infekčního agens na pacienta.

NI jsou vyvolány často multirezistentními nemocničními kmeny. K šíření NI v rámci nemocničního oddělení dochází většinou prostřednictvím rukou personálu. Šíření multirezistentních kmenů mezi jednotlivými odděleními i nemocnicemi je působeno většinou personálem nebo pacientem, přeloženým z jiného oddělení nebo zařízení.

NI jsou rovněž rozdělovány podle postiženého orgánu nebo systému. Hovoříme o infekcích urogenitálních, gastrointestinálních, respiračních atd. Ve vyspělých zemích se rozdělují NI do čtyř skupin: NI močového traktu (20–40 %), chirurgické ranné infekce (20–30 %), IKŘ (10–20 %), nozokomiální pneumonie (10 %) a na zbývající NI připadá 10–20 %.

Podle projevů onemocnění rozdělujeme NI na manifestní, kdy se infekce projeví klinickými příznaky a na tzv. nosičství, kdy je pacient kolonizovaný nemocničným kmenem a nemá projevy infekce. (11, 14, 21, 26)

1.3 Laboratorní diagnostika IKŘ

1.3.1 Mikrobiologické vyšetření

Přítomnost infekce v těle je nezbytným předpokladem pro vznik sepse. Nejvíce případů sepse (90 %) je způsobeno bakteriemi. Proto je za jedno z nejdůležitějších diagnostických postupů při podezření na sepsi považováno mikrobiologické vyšetření, jehož cílem je zjistit původce infekce a jeho citlivost k antibiokním látkám. Podstatné je včas zahájit antimikrobiální léčbu, jelikož pacienti, kterým je náležitá léčba zahájena, mají větší šanci na přežití než ti, u kterých tomu tak není (6).

Zjištění původce onemocnění se provádí v případě diagnostiky IKŘ hemokultivačním vyšetřením a vyšetřením dalších vzorků ze zdroje infekce. Při hemokultivačním vyšetření se krev odebírá do hemokultivačních lahvíček. Při pátrání po zdroji infekce se odebírá moč, likvor, hnis, sputum a další tělesné vzorky. Tekuté vzorky lze rovněž někdy odebrat do hemokultivačních lahvíček.

Mikroorganismy se prokazují mikroskopicky, izolací na kultivačních půdách s následnou identifikací izolátu, příp. průkazem antigenu nebo průkazem nukleových kyselin (26).

Mikroskopické vyšetření:

Mikroskopie je při vyšetření média pozitivní hemokultury nezbytná, jelikož umožní vyslovit orientační informaci o původci IKŘ.

Lékař při mikroskopii hodnotí tvar bakterií, které se obecně dělí na koky a tyčky. Koky mohou zůstat po buněčném dělení pasivně spojeny do různých řetízků, shluků připomínajících hrozny, do dvojic nebo do čtveřic. Zejména u diplokoků může být kulovitý tvar deformován, takže jsou koky zploštělé a připomínají tvar kávového zrna. Dalším, protáhlým tvarem bakterií, jsou tyčky. Velmi krátké tyčinky se nazývají kokobacily (kokobakterie), delším se říká bacily a dlouhé, vláknité formy, označujeme jako vlákna. Tyčinky, stejně jako koky, mohou být spojeny do řetízků nebo do shluků, kterým se říká palisády. Dlouhé tyčinky mohou být různě ohnuté a tvořit spirály.

Pod mikroskopem se sledují nejen takové vlastnosti bakterií, jako je velikost, tvar a uspořádání, ale hlavně se bakterie rozdělí na dvě základní taxonomické skupiny: bakterie gram-pozitivní a gram-negativní. K tomuto zařazení bakterií do správné skupiny je nutné obarvit preparát základní technikou dle Grama, výsledné gram-pozitivní bakterie zůstanou po obarvení tmavomodré; a gram-negativní bakterie budou po obarvení červené (24, 26).

Kultivace:

Kultivace je nejdůležitější diagnostickou metodou přímého průkazu v bakteriologii. Cílem kultivace je získání tzv. čisté kultury bakterií, které obsahují bakterie jednoho rodu a druhu. Bakterie kultivujeme v tekutých nebo na tuhých půdách. Tekuté půdy slouží hlavně jako pomnožovací médium pro bakterie. Tuhé půdy se používají při diagnostice nejčastěji. Bakterie zde rostou v tzv. koloniích, podle kterých může lékař orientačně určit rod bakterií. U kolonií posuzuje jejich velikost, tvar, povrch, profil, barvu, zápach, plazivý růst. Důležité je sledovat i okolí kolonií, kde může vzniknout hemolýza. Ta se uplatňuje při diagnostice streptokoků a podle změn na krevním agaru rozlišujeme hemolýzu beta, alfa a delta:

a) Beta-hemolýza je na krevním agaru způsobena narušením membrány erytrocytů, což se projeví odbarvením erytrocytů. Zde můžeme ještě rozdělit hemolýzu na úplnou a neúplnou. Pokud je hemolýza v okolí kolonie projasněná, jde o hemolýzu úplnou. Pokud je půda v zóně hemolýzy zakalená, jde o hemolýzu neúplnou.

b) Streptokoky alfa-hemolytické (viridující) mění krevní barvivo hemoglobin na zelený verdoglobin. Projevuje se tak, že je krevní agar pod kolonií nebo v jejím okolí zbarven do hnědo-zelena.

c) Gama-hemolytické (nehemolytické) streptokoky vzhled agaru nemění.

Průkaz antigenu:

Jde o serologickou reakci, kdy se ve vzorku prokazuje přítomnost neznámého antigenu pomocí známé protilátky. Metoda, která se pro tento průkaz používá, v případě, že protilátky jsou navázány na nosiči, se nazývá aglutinace na nosičích. Jsou-li nosičem latexové částice, jde o latexovou aglutinaci (24, 25).

1.3.2 Biochemické vyšetření

Dalším nezbytným vyšetřením je biochemické vyšetření, které je přínosné v diagnostice infekčních onemocnění včetně sepse. V rámci SIRS dochází v organismu k různým změnám, stoupá tvorba prozánětlivých i protizánětlivých mediátorů (IL-16, IL-2, IL-6, TNF α ; IL-10, G-CSF), dále se mění imunologická reaktivita (HLA-DR), syntéza proteinů a funkčních proteinů (prokalcitonin, CRP a jiné proteiny akutní fáze) a je indukována apoptóza.

Sledování hladiny prokalcitoninu (PCT), který je prekurzorem hormonu kalcitonin, je při podezření na sepsi velmi významné. U zdravých jedinců je koncentrace PCT < 0,1 ng/ml, ale při těžké sepsi se může zvýšit 5 000–10 000krát. Nejvíce stimuluje tvorbu PCT bakteriální a mykotické infekce, virové infekce nikoliv. PCT stoupá u bakteriálních infekcí v krvi již za dvě hodiny.

Dalším důležitým markerem je C-reaktivní protein (CRP), který patří mezi proteiny akutní fáze zánětu a u zdravého člověka ho nelze prokázat. Syntéza v játrech je vyvolána zejména IL-6 a IL-1. V současné době jde o nejčastěji používaný marker přítomnosti zánětlivé reakce a její závažnosti. Jeho koncentrace začíná růst za 6–9 hodin po začátku zánětu a maxima dosahuje asi za 48 hodin, což je delší doba než u

PCT. Rovněž jeho pokles při zlepšení klinického stavu pacienta není tak rychlý jako pokles PCT. CRP se navíc může zvyšovat i u jiných neinfekčních patologických stavů.

IL-6 je prozánětlivý cytokin, jehož zvýšená sekrece je vyvolána uvolňováním endotoxinu při septických stavech, může vyústit v závažnou komplikaci a k MODS. Plazmatické koncentrace IL-6 mohou být u pacientů se sepsí zvýšeny až tisíckrát a souvisí se závažností onemocnění. Má význam i v neonatální diagnostice infekce a sepse (4, 6,14, 29).

1.3.3 Hematologické vyšetření

Jedním z nejzákladnějších vyšetření je vyšetření leukocytů. U sepse se můžeme setkat se zvýšeným počtem neutrofilů, ovšem tento ukazatel není specifický pouze pro sepsi, bývá totiž běžným příznakem infekce, objevuje se i po chirurgickém výkonu, úrazu nebo při krvácení. Velmi důležité je také vyšetřování diferenciálu leukocytů, zejména provádí-li ho zkušený hematolog. Pokud se potvrdí přítomnost nezralých forem neutrofilů tj. tyče, event. metamyelocyty, známky jejich aktivace – zvětšení granul a současná absence eozinofilů, tvoří to triádu, která je poměrně spolehlivým ukazatelem závažné bakteriální infekce. Celková koncentrace leukocytů v krvi přitom nemusí být významná. Důležitá je ale skutečnost, že tyto změny v krevním obraze nastávají velmi rychle, a to v průběhu několika hodin. Významnost této metody je tedy srovnatelná s měřením PCT, ovšem pacient nesmí trpět hematologickou chorobou.

Dalším ukazatelem při sepsi je aktivace koagulace, kdy je sepse nejčastější příčinou diseminované intravaskulární koagulopatie. Již v počátečních stádiích sepse se objevuje pokles hladin inhibitorů koagulace. Nejčastěji se vyšetřuje hladina antitrombinu III, dále je významný pokles proteinu C, jeho vyšetření se ale běžně nevyužívá. Přestože jsou změny koagulačních parametrů u sepse velmi významné, nejsou vždy pro diagnostiku sepse využívány (4, 19).

1. 4 Nejčastěji izolované bakteriální rody a druhy v souvislosti s IKŘ

1.4.1 Gram-pozitivní koky

1.4.1.1 Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky se řadí mezi gram-pozitivní koky, mají průměr asi 1 μm . Jsou uspořádány jednotlivě nebo v párech. Především se nacházejí v nepravidelných shlucích, které můžeme přirovnat k tvaru hroznů. Dobře snáší nepříznivé zevní podmínky a patří mezi nejodolnější nesporeující bakterie.

Stafylokoky dělíme do dvou skupin podle schopnosti koagulovat plasmu na koaguláza-pozitivní a koaguláza-negativní (25).

1.4.1.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus patří mezi koaguláza-pozitivní stafylokoky. Běžně se mu říká zlatý stafylokok a je to jeden z nejčastějších lidských patogenů. Asi u třetiny zdravých osob se vyskytuje na kůži a na sliznicích a nevyvolává žádné potíže. Pokud ovšem dojde k porušení integrity kůže nebo sliznice a k překonání obranných bariér, projeví se jako patogen. Nejčastější predispozicí může být chirurgický zákrok, úraz, umělá náhrada nebo zavedený katétr., rána. Ze vstupní brány infekce se stafylokoky dostávají do oblastních mízních uzlin a z nich mohou proniknout až do krevního oběhu. Někdy se do krevního oběhu dostávají i přímo. Vznikají infekce krevního řečiště. Krví může být *S. aureus* zanesen do vnitřních orgánů a míst, kde mohou vznikat abscesy.

Léčba infekcí se provádí nejdříve antibiotiky, někdy i chirurgicky. Dnes je přes 90 % stafylokoků rezistentních na penicilin, proto se musí používat jiná antibiotika, především oxacilin. Stejně jako v případě klasického penicilinu se objevily kmeny *S. aureus* rezistentních k oxacilinu. Označují se zkratkou MRSA (z angl. *methicillin-resistant S. aureus*). MRSA je častým původcem nozokomiálních infekcí. MRSA často jeví sdruženou rezistenci i na další antibiotika. V roce 2002 se dokonce objevil kmen MRSA, který byl současně rezistentní i k vankomycinu. Tento kmen se označuje jako VRSA (z angl. *vancomycin-resistant S. aureus*) (2, 25).

1.4.1.1.2 Koaguláza-negativní stafylokoky

Patří k nejčastějším bakteriím izolovaným z hemokultur. Převážně izolujeme *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* a *S. hominis*. Tyto koaguláza-negativní stafylokoky se běžně vyskytují u člověka nejčastěji na kůži. Jejich patogenita je nízká, ale může se uplatnit u oslabených jedinců. Častý je jejich výskyt u infekcí spojených se zavedenými cizorodými materiály, především intravaskulárními katétry nebo umělými kloubními implantáty. Rovněž se mohou vzácněji vyskytnout jako původci infekcí ran a jiných. Proto opakovaný záchyt stejného kmene může mít klinický význam.

Často se ale stává, že záchyt tohoto mikroba je jen pouhou kontaminací z kůže při odběru hemokultury v důsledku nedostatečně provedené dezinfekce, proto opakovaný záchyt stejného kmene může mít klinický význam. Proto je záchyt těchto stafylokoků nutné posuzovat obezřetně. Tyto stafylokoky jsou často multirezistentní k antibiotikům (2).

1.4.1.2 Rod *Streptococcus*

Tento rod patří mezi kataláza-negativní gram-pozitivní koky. Tyto fakultativně anaerobní bakterie se řadí do dvojic až řetězků. Některé streptokoky jsou pro člověka patogenní (*S. pyogenes*), některé jsou příslušníky normální mikroflóry sliznic u lidí. Nacházejí se v dutině ústní, horních dýchacích cestách nebo v zažívacím traktu.

1.4.1.2.1 *Streptococcus pyogenes*

Tato bakterie patří do beta-hemolytických streptokoků. Je původcem angíny, některé kmeny mohou vyvolávat spálu. Jako komplikace těchto infekcí může být i seps. Dále jsou původci infekcí hlubokých ran a defektů.

1.4.1.2.2 *Streptococcus agalactiae*

Patří rovněž mezi beta-hemolytické streptokoky. Můžeme jej najít na tonsilách, v respiračním traktu a ve vagině jako běžnou kolonizující floru. Nebezpečné je nosičství u těhotných, může totiž ohrozit novorozence. Ten se může nakazit během porodu (poraněním, polknutím kontaminovaného vaginálního sekretu). Onemocnění jsou dvojího typu: časná a pozdní. Časné infekce vznikají během porodu ještě in utero a projevuje se během prvních hodin nebo dní po narození. Onemocnění se projevuje jako bakteriémie, pneumonie, meningitida a septický šok, mortalita je kolem 5 % a na životě jsou nejvíce ohroženi nedonošenci. Pozdní infekce se dostavují obvykle koncem 1. měsíce života a v polovině případů se dítě nakazí až po porodu. Onemocnění probíhá jako sepsis a meningitida, úmrtnost je přes 10 %. U větších dětí a u dospělých vznikají infekce spíše u imunokompromitovaných jedinců.

1.4.1.2.3 *Streptococcus pneumoniae*

Řadí se do alfa-hemolytických streptokoků a říká se mu pneumokok. Mikroskopicky jde o gram-pozitivní koky v řetězcích a ve dvojicích protáhlého, lancetovitého tvaru. Kolonizuje sliznici horních cest dýchacích. Je nejčastějším původcem komunitní pneumonie. Pneumokokový zánět plic může postihnout celý plicní lalok nebo proběhnout jako bronchopneumonie. U kojenců a starých osob často končí smrtí. Pneumokok je dále nejčastější příčinou purulentní meningitidy u osob nad 60 let. Častý je také pneumokokový zánět mozkových blan po úrazech hlavy, dále se podílí na akutním zánětu středního ucha, který může přejít v zánět bradavčitého výběžku. Sekundárně infikuje *S. pneumoniae* vedlejší dutiny nosní. Infekce vyvolané *S. pneumoniae* jsou často spojeny s bakteriemií.

1.4.1.2.4 *Ostatní streptokoky*

Ostatní streptokoky izolované z hemokultur bývají většinou viridující nebo gama-hemolytické. Patří mezi ně například *S. mitis* a *S. salivarius*, které mohou mj. vyvolat i infekční endokarditidu.

1.4.1.3 Rod *Enterococcus*

Jsou to gram-pozitivní, fakultativně anaerobní, oválné až lehce protáhlé koky uspořádané do dvojic nebo krátkých řetízků. Tvoří nezbytnou a prospěšnou součást naší mikroflóry v tlustém střevě, mohou se objevit i v tenkém střevě nebo v genitálním traktu, zřídka i v horních cestách dýchacích. Infekce těmito patogeny jsou vyvolané v 90 % *Enterococcus faecalis* a v 7 % *Enterococcus faecium*. Patří mezi závažné podmíněné patogeny. Infekce mohou být endogenní nebo exogenní. Infekce jsou časté u dlouhodobě hospitalizovaných pacientů se zavedenými močovými a intravaskulárními katétry. Pokud enterokoky proniknou do krve (intravaskulárními katétry, injekční aplikací drog) nebo sekundárně, může se objevit enterokoková sepe. Dále mohou vyvolat endokarditidu, infekce nitrobršišní, močové, ran, gynekologické záněty, vzácně meningitidu.

1.4.2 Gram-negativní koky

1.4.2.1 *Neisseria meningitidis*

Tzv. meningokok je závažným původcem sepe a meningitidy. Průběh tohoto onemocnění bývá rychlý a nejohroženější skupinou jsou děti a mladí dospělí. V dnešní době se výskyt tohoto onemocnění snížil v důsledku očkování proti meningokokovým nákazám.

1.4.3 Gram-negativní tyčky

1.4.3.1 Rod *Escherichia*

Nejznámějším druhem je *Escherichia coli*, která tvoří běžnou součást střevní mikroflóry. Její patogenita vyvolává 2 typy onemocnění:

- intestinální - infekce provázené průjmy
- extraintestinální - zejména infekce močových cest – je jejich nejčastějším vyvolatelem. Ty mohou přejít v urosepsi. Urosepse tvoří asi 1/3 sepsí. Dále

bývá původcem infekcí nitrobřišních, infekcí ran, pneumonií, které mají často nozokomiální charakter.

1.4.3.2 Rod *Klebsiella*

Jsou opouzdřené nepohyblivé gram-negativní fakultativně anaerobní tyčky. Běžně se vyskytují v lidském střevě, ale dobře přežívají i v jiném prostředí, kde mohou být zdrojem infekcí. Způsobují močové infekce, nitrobřišní aj., pneumonie, u novorozenců způsobují sepsy a meningitidy. Jsou častými původci NI. Nejznámějšími zástupci jsou *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca*. Kmeny mohou být velmi rezistentní k antibiotikům.

1.4.3.3 Rod *Enterobacter*

Je to opouzdřená gram-negativní fakultativně anaerobní tyčka. Vyskytuje se v půdě a ve vodě. U člověka osidluje střevo. Jejich patogenita není vysoká, ale jsou nebezpečné svou rezistencí, až možnou multirezistencí. Nejčastěji způsobují infekce ranné, infekce močových cest, infekce nitrobřišní, infekce respiračního traktu aj., většinou nozokomiálního původu. Nejvýznamnější druh je *Enterobacter cloacae*.

1.4.3.4 Rod *Proteus*

Nejznámější druhy, *Proteus mirabilis* a *Proteus vulgaris*, jsou typické svým plazivým růstem v podobě mořských vln na pevných půdách, kde netvoří ohraničené kolonie. Nachází se hlavně ve střevě. Nejčastěji vyvolávají močové infekce, při kterých tvorbou amoniaku dráždí sliznice a tím poškozují ledvinný epitel. Jako sekundární infekce se také objevuje v ranách či dekubitech, v ušních zánětech atd.; ohroženou skupinou jsou novorozenci, imunosuprimovaní a onkologičtí pacienti.

1.4.3.5 Rod *Pseudomonas*

Bakterie z tohoto rodu jsou striktně aerobní, nesporulující gram-negativní tyčky. Běžně se vyskytují v přírodě, v odpadních vodách, ve střevním traktu zvířat i člověka. Nejčastěji izolovaný kmen je *Pseudomonas aeruginosa*. Často kontaminuje katétrů, a tak je obávaným původcem IKŘ, především na oddělení JIP, resuscitačních a novorozeneckých odděleních. Rovněž působí infekce ran, plicní a další. Je obávaným nozokomiálním patogenem, nebezpečným svou multirezistencí.

1.4.3.6 Rod *Acinetobacter*

Jde o krátké opouzdřené gram-negativní koky a kokobacily. Tento rod se nejvíce objevuje ve vodě, v půdě a v potravinách; u člověka se může nacházet na sliznicích respiračního traktu i na kůži. Některé druhy rodu *Acinetobacter*, zejména *A. baumannii* jsou často multirezistentní na antimikrobní látky a jsou obávanými nozokomiálními patogeny. Nejčastěji jsou izolovány ze sputa, z popálenin, z hemokultur a z likvoru (2, 10, 24, 25)

1.4.3.7 HACEK

Jde o označení vzniklé ze zkratk názvů bakterií zařazených do této skupiny (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*). Tyto gram-negativní tyčky se z hemokultur izolují vzácně, ale mohou být vyvolavateli infekční endokarditidy. V případě hemofila jde o *Haemophilus aphrophillus*, ostatní hemofilie vyvolávají především respirační infekce a meningitidy, provázené většinou bakteriemií, záněty středouší a očí (13).

1.4.4 Gram-pozitivní tyčky

1.4.4.1 Rod *Bacillus*

Bacily jsou gram-pozitivní sporulující aerobní nebo fakultativně anaerobní tyčinky. Někdy se vyskytují jako kontaminanty hemokultur, zejména při nedostatečné dezinfekci zátek hemokultivačních lahvíček.

1.4.5 Kvasinky

Kvasinky řadíme do říše hub. Tyto houby mikroskopických rozměrů nazýváme mikromycety. Kvasinky mají podobu kulatých, oválných nebo protáhlých buněk, obecně značené jako blastokonidie. Jsou větší než bakterie, mají průměr asi 3–15 μm. Z jejich povrchu charakteristicky pučí dceřinné buňky, které se mohou ihned oddělovat, nebo mohou být naopak dlouho ve spojení s mateřskou buňkou a tvořit tzv. pseudomycelie.

Kvasinková infekce se nejčastěji rozvine u imunodeficitních pacientů. Mohou vyvolat jak onemocnění kožní a slizniční, kdy napadají kůži a její adnexa, tak i onemocnění orgánová a systémová, kdy pronikají do krevního oběhu a mohou vyvolat i sepsi. Nejznámějším zástupcem je *Candida albicans* (2, 10, 25).

2. CÍLE PRÁCE

2.1 Cíle práce

Cíl 1: Osvojení si techniky zpracování hemokultur

Cíl 2: Zhodnocení kultivačních nálezů - procento positivity

Cíl 3: Zhodnocení kultivačních nálezů - izolovaná agens

3. METODIKA

3.1 Charakteristika souboru

Vyšetřovaným materiálem byly všechny hemokultury odebrané od pacientů z oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. za období dvou měsíců; od 1. 9. – 31. 10. 2012. Přijatý materiál byl vyšetřován systémem BacT/ALERT 3D BioMérieux. Pozitivní hemokultury byly vyočkovány na pevná kultivační media a zhotoven mikroskopický preparát dle Grama. Byl proveden orientační test citlivosti k antimikrobním látkám. Z narostlých bakteriálních kultur na pevných médiích byla provedena jejich identifikace dle jejich makroskopické a mikroskopické morfologie, nejčastěji za použití hmotnostní spektrofotometrie (technologie MALDI-TOF) VITEK-MS BioMérieux. Stanovení kvantitativní citlivosti bylo provedeno systémem VITEK 2 BioMérieux.

3.2 Postup výzkumu

3.2.1 Odběr a transport vzorku

Odběr a transport vzorku je pro výsledek vyšetření nejdůležitější. Odběr krve na hemokultivaci, který provádí sestra či lékař při podezření na bakteriémií nebo na sepsi se musí provádět asepticky.

Postup odběru:

Odběr musí být proveden za podmínek asepse. Po palpaci žíly je pacientovi místo odběru očištěno 70% izopropylalkoholem. Po zaschnutí je místo dezinfikováno 1–2% jódovou tinkturou. Po zaschnutí této dezinfekce se již nesmí palpat a provede se odběr. Krev je aplikována do hemokultivačních lahviček, jejichž zátky jsou předem také dezinfikovány 70% izopropylalkoholem. Pokud se odběr provádí injekční stříkačkou, jako první se inokuluje anaerobní a posléze aerobní lahvička. Pokud se použije odběrový systém Vacutainer, je inokulace lahviček opačná.

Pokud je u pacienta podezření na katérovou infekci krevního řečiště nebo pokud je nemožná venepunkce, odběr se provádí z žilních katétrů. I zde se musí odběrový vstup nejdříve očistit 70% izopropylalkoholem a po zaschnutí dezinfikovat jódovou tinkturou. První odběr 2–3 ml krve, který se provede, se do hemokultivačních lahviček nepoužije. Pro inokulaci je potřeba odebrat další vzorek jednorázovou injekční stříkačkou. Hemokultivační lahvičky se plní stejným postupem jako u venepunkce.

Klíčová je také doba odběru. Ta by měla být nejlépe před nasazením antibiotické léčby. Pokud již pacient antibiotickou léčbu podstupuje, měl by být odběr proveden těsně před další pravidelnou dávkou léku, tedy v době jeho nejnižší hladiny. Dále by se mělo odebírat hned při prvních klinických projevech bakteriémie, tedy co nejdříve při vzestupu teploty nebo lépe při třesavce. Odběr by měl být opakován (2–3krát za den) pro větší pravděpodobnost záchytu bakterií (3, 11, 20).

Transport vzorků do laboratoře musí být co nejdříve po odběru. Pokud se nemůže transportovat lahvička s krví hned, musí zůstat při pokojové teplotě, nesmí se dávat do ledničky. Pokud je ovšem prodleva mezi odběrem vzorku a vložením hemokultivační lahvičky do přístroje delší než 4 hodiny, může být výsledek vyšetření negativně ovlivněn. Důležité je psát na žádanku o vyšetření datum a čas odběru (20, 24).

Nezbytnou součástí vzorku je správně a úplně vyplněná žádanka o vyšetření, kde musí být všechny údaje o pacientovi (jméno, rodné číslo, diagnóza, zdravotní pojišťovna, datum a čas odběru, jméno lékaře, který vyšetření požadoval a jméno odebírající osoby).

3.2.2 Princip a práce s přístrojem BacT/ALERT 3D

Hemokultury se odebírají do hemokultivačních nádobek firmy BioMérieux. V těchto nádobkách je podtlak, který usnadňuje inokulaci krve do lahvičky. K hemokultivačnímu přístroji BacT/ALERT 3D se vyrábí 5 druhů hemokultivačních nádobek:

- nádobka Bact/ALERT FA - Je určena pro odběr krve na aerobní agens od pacienta, který je již při podezření na sepsi léčen antibiotiky. Složení těchto lahviček částečně eliminuje účinek některých antibiotik, ale antibiotická terapie může vést k falešně negativním výsledkům. Lahvička je označena zelenou barvou.
- nádobka Bact/ALERT FN - Určena pro odběr krve od pacienta na fakultativně anaerobní a anaerobní agens, který je již při podezření na sepsi léčen antibiotiky. Lahvička je označena oranžovou barvou.
- nádobka Bact/ALERT SA - Určena pro odběr krve od pacienta na aerobní agens, který ještě není léčen antibiotiky. Lahvička je označena modrou barvou.
- nádobka Bact/ALERT SN - Určena pro odběr krve od pacienta na fakultativně anaerobní a anaerobní agens, který ještě není léčen antibiotiky. Lahvička je označena fialovou barvou.
- nádobka Bact/ALERT PF - Určena pro odběr od pacientů na pediatrickém oddělení nebo od pacientů, kteří jsou v těžkém stavu, a je obtížné jim odebrat větší množství krve. Lahvička je označena žlutou barvou. Tato nádobka je určena pro odběr do 4 ml.

Ostatní nádoby jsou určeny pro odběr krve do 10ml (3).

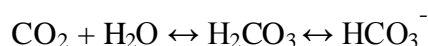
Optimální množství krve odebrané na 1 odběr je u dospělých pacientů 20–30 ml krve. Proto se většinou odebírá do aerobní i anaerobní lahvičky současně. Rovněž se tím zvyšuje pravděpodobnost záchytu agens.

Když jsou hemokultivační lahvičky s materiálem transportovány do laboratoře, laborantka, která materiál přijímá, musí zkontrolovat, zda je vše v pořádku. Zkontroluje žádanku a lahvičky, zda jsou správně označené, zda žádanka obsahuje všechny potřebné údaje, zda je materiálu dostatečné množství, nebo jestli naopak není lahvička přeplněna. Tyto nevyhovující podmínky nejsou důvodem k odmítnutí vzorku, ale skutečnost je zapsána do laboratorního protokolu a je součástí výsledku. Pokud je ovšem vzorek znehodnocen (lahvička neobsahuje materiál, je rozbitá...), vyšetření se neprovádí.

Po přijetí vzorků jsou žádanky, hemokultivační lahvičky označeny shodnými laboratorními čísly a lahvičky jsou vloženy do hemokultivačního přístroje Bact/ALERT 3D. Údaje z žádanek jsou zapsány do LIS.

Zjišťování přítomnosti bakterií v médiu hemokultivačních lahviček je založeno na principu kolorimetrické detekce CO₂ vznikající při množení bakterií. Přístroj se skládá z obslužného a kultivačního modulu. Obslužný modul sestává z dotykové obrazovky, čtečky čárových kódů a klávesnice. Kultivační modul je složen ze 4 boxů a každý box má 60 buněk. Do každé buňky, která je číselně označena, se vejde jedna hemokultivační lahvička. Za každou buňkou se nachází dioda, která emituje paprsek červeného světla a měřicí fotodioda.

Pokud je mikroorganismus v lahvičce s odebraným materiálem přítomen, produkuje CO₂, který se šíří přes iontově nepropustnou membránu na dno lahvičky, kde se nachází kolorimetrický senzor. Tam dochází k této chemické reakci:



Zde přichází CO₂ do styku s indikátorem pH. Změna pH způsobí změnu barvy z tmavě zelené na jasně žlutou. Toto zabarvení je úměrné přítomnému množství CO₂. Senzor na dně lahvičky je paprskem světla kontrolován každých 10 minut. Světlo, které senzor odráží, pak dopadá na měřicí fotodiodu. Výsledky jsou přeneseny do počítače a zhodnoceny počítačovým programem. U každé lahvičky s hemokulturou se sledují tři parametry: počáteční hodnota CO₂, rychlost produkce CO₂ a zvýšení rychlosti CO₂. Lahvičky se kultivují při 35–37°C 7 dní; většina pozitivních hemokultur je však pozitivních do dvou dnů (1, 5, 9, 12).

3.2.3 Negativní hemokultury

Přístroj hodnotí hemokulturu jako negativní, pokud se po sedmi dnech kultivace senzor na dně lahvičky nijak nezměnil. Výsledek je přenesen do LIS a po kontrole

lékařem je výsledek odeslán lékaři, který vyšetření indikoval. Negativní lahvičky se na půdy nevyočkávají.

3.2.4 Pozitivní hemokultury

Pokud přístroj hlásí pozitivitu, objeví se oznámení na displeji, které může být doplněno i zvukovým signálem. Pozitivní hemokultivační lahvičky jsou vyndány ze systému a v laboratoři se s nimi dále pracuje, aby se pozitivita hemokultur potvrdila, aby se určil kmen bakterie a stanovila citlivost na antibiotika.

3.2.4.1 Zhotovení mikroskopického preparátu

Mikroskopický preparát, který se řadí do diagnostiky přímého průkazu, nám umožňuje získat informace o morfologii a uspořádání bakterií, jejich velikosti a některých buněčných strukturách (pouzdra, spóry). S hemokulturami musíme pracovat v laminárním boxu, abychom ochránili vzorek před kontaminací, ale i sebe před infekcí. Gumovou zátku na hemokultivační lahvičce nejdříve dezinfikujeme stříknutím dezinfekčního přípravku, který necháme řádně zaschnout. Mezitím si připravíme čisté, odmaštěné sklíčko, které si označíme stejným číslem jako je u vyšetřované hemokultury. Sterilní jehlu (zatím bez stříkačky) ze shora zakryjeme sterilním čtverečkem buničiny a zapíchneme do gumové zátky lahvičky. Toto děláme pro odvzdušnění. Nyní můžeme na jehlu nasadit injekční stříkačku a po převrácení lahvičky můžeme odsát trochu materiálu do stříkačky. Nyní na připravené a popsané sklíčko kápneme větší kapku materiálu a pomocí hrany druhého podložního skla kapku po sklíčku rozetřeme. Materiál se musí nechat na sklíčku zaschnout. Následným krokem je fixování teplem, které usmrtí bakterie, aniž by došlo k jejich hrubšímu poškození jejich struktur, bakterie se tím také pevně přichytí na podložní sklo a během barvení se neodplaví. Sklíčko tedy několikrát protáhneme plamenem. Abychom v mikroskopu mohli bakterie rozlišit na gram-pozitivní a gram-negativní, musíme preparát obarvit podle Grama.

Postup a princip barvení dle Grama:

a) Fixovaný preparát se převrství krystal-violetí, která se po 20 sekundách slije. Bazické barvivo krystal-violet, které se naváže na kyselé skupiny gram-pozitivních i gram-negativních bakterií.

b) Preparát se přelije na 20 sekund Lugolovým roztokem, poté se opláchně vodou. Jód se váže s barvivem a vytvoří precipitát.

c) Preparát se odbarvuje acetonem nebo alkoholem 20–30 sekund a poté se důkladně opláchně vodou. Odbarvovací prostředek dobře proniká plazmatickou membránou gram-negativních bakterií, rozpouští komplex barviva jódu a vyplavuje ho. Naopak u gram-pozitivních bakterií proniká aceton do buněk mnohem pomaleji a pomalu také rozpouští komplex barviva jódu. Gram-pozitivní bakterie tak zůstávají obarvené, ale gram-negativní se odbarví.

d) Preparát se dobarví 30–60 sekund desetkrát ředěným karbol-fuchsinem a nakonec se opláchně vodou a osuší. Tímto se obarví gram-negativní bakterie.

Důležité je, abychom preparáty přelivali barvivem a oplachovali vodou stále stejným směrem, jinak se tvoří sraženiny.

V laboratoři bakteriologie je k barvení preparátů automatický systém.

Hotový preparát prohlíží lékař mikroskopem pod imerzním objektivem. Lékař hodnotí přítomnost a morfologii bakterií, nejčastěji jde o gram-pozitivní koky v hlučcích (stafylokoky) nebo v řetízích (streptokoky nebo enterokoky nebo gram-negativní tyčky).

Pokud je preparát pozitivní, lékař laboratoře bakteriologie telefonicky informuje ošetřujícího lékaře.

3.2.4.2 Kultivace

Kultivace je nejdůležitější diagnostickou metodou přímého průkazu bakterií. Kultivací zjistíme, zda se v materiálu nachází jeden, či více druhů nebo rodů bakterií. Cílem této metody je získat čisté kultury složené z bakterií jednoho rodu i druhu, které se využijí k jejich bližšímu určení dalšími diagnostickými metodami. Jelikož mají různé

bakterie různý metabolismus, mají i rozdílné nároky na kultivaci, které jsou pro růst na půdách důležité. Při volbě podmínek pro kultivaci se snažíme simulovat takové podmínky, které mají bakterie u svého hostitele. Mezi tyto nejdůležitější patří:

- dostatek vhodných živin - některé půdy jsou obohaceny např. masovými extrakty, peptony, růstové faktory atd.
- vlhkost půdy
- optimální pH půdy - u většiny 7,2–7,4
- kultivační teplota - většina lidských patogenů nebo podmíněných patogenů se kultivuje při 35–37°C
- délka kultivace - většina běžných bakterií vyroste za 16–20 hodin
- atmosféra pro kultivaci
 - aerobní a fakultativně anaerobní bakterie - za přístupu vzduchu
 - anaerobní bakterie - rostou bez přístupu vzduchu
 - mikroaerofilní bakterie - vyžadují sníženou nebo zvýšenou tenzi CO₂

Pro kultivaci pozitivních hemokultur se používají tyto půdy:

Krevní agar: Je základní půda v mikrobiologii. Obsahuje 5 % beraních erytrocytů a můžeme na ní pozorovat, zda bakterie tvoří hemolýzu. Pro zhotovení kápneme na kraj krevního agaru kapku média hemokultury, ze kterého uděláme inokulum, které potom klasickým způsobem rozočkujeme. Plotnu posléze dáme do CO₂ inkubátoru, ve kterém se za zvýšené tenze CO₂ při 35°C inkubuje do druhého dne. Na této půdě vyroste většina běžných bakterií.

MacConkey agar: Je to selektivní půda pro gram-negativní bakterie. Inokulujeme stejně jako krevní agar. Laktóza pozitivní kolonie zde rostou v červených koloniích, laktóza negativní ve světlých koloniích. Bakterie tvořící sirovodík zde rostou v koloniích s černým středem.

Masopeptonový bujon: Jedná se o tekutou pomnožovací půdu, která je složena z masového extraktu, peptonu, 0,5 % NaCl, její pH je 7,3. Injekční stříkačkou s materiálem z hemokultivační lahvičky (kterou jsme dávali materiál na sklíčko) kápneme asi 2 kapky do této půdy. Bujon se používá k pomnožení bakterií pro stanovení orientačního předběžného testu citlivosti k antimikrobním látkám.

Mueller-Hintonovo medium: Tato půda se používá k testu pro stanovení citlivosti k antibiotikům pomocí difuzního diskového testu. Mueller-Hinton agar bez krve použijeme pro zhotovení orientačního diskového difuzního testu k citlivosti gram-negativních tyčků a gram-pozitivních koků v hloučcích (suspektní stafylokoky). Pro stanovení citlivosti gram-pozitivních koků v řetězcích (suspektní streptokoky nebo enterokoky) používáme Mueller-Hinton–F agar s koňskou krví. Pro zhotovení kápneme asi 2 kapky z bujónku inokulovaného médiem s bakteriemi z pozitivní hemokultury. Snažíme se o zhotovení zákalu 0,5 stupně McFarlanda. Rozočkujeme po celé ploše půdy. Na plotnu pomocí raznice umístíme požadované sestavy antibiotik. Plotna se inkubuje do druhého dne při 37°C v normální atmosféře.

Schaedler agar: Tato výživná neselektivní půda se používá pro kultivaci anaerobních bakterií. Půda obsahuje vitamínem K₁. Půdu inokulujeme a rozočkujeme klasickým způsobem a ihned ji vložíme inkubovat do anaerobního boxu na 24–48 hodin.

Čokoládový agar: Na tuto půdu očkujeme materiál pouze tehdy, pokud se jedná o hemokultivaci likvoru. Tato půda vzniká zahřátím krve při přípravě na 80–85°C, kdy erythrocyty hemolyzují a agar získává hnědou barvu. Vyplavené růstové faktory z erythrocytů umožňují nárůst patogenních neiserií a hemofilů. Půda používaná v laboratoři bakteriologie obsahuje antibiotika pro selektivní kultivaci hemoofilů.

Po vyočkování odstraníme stříkačku s materiálem do nádoby s infekčním odpadem a hemokultivační lahvičky, ze kterých jsme odsávali materiál, uchovááme 7 dní v termostatu při 36°C.

Druhý den jsou půdy hodnoceny vysokoškolským pracovníkem, který izolované kultury identifikuje podle typu agens a rozhodne o dalším postupu při identifikaci bakterií - mikroskopie, kultivace, biochemické testy, serologické metody nebo metoda hmotnostní spektrofotometrie.

Pokud se stane, že je výsledek kultivace negativní, kultivace musí být prodloužena do dalšího dne.

Přihodí-li se, že je mikroskopický preparát z pozitivní lahvičky negativní, lahvičku dále kultivujeme v termostatu při 36°C. Pokud je negativní i výsledek kultivace, provede se na krevní agar čára kmenem *Staphylococcus aureus*, abychom mohli potvrdit/vyloučit přítomnost rodu *Haemophilus*, jelikož hemofily běžně na krevním agaru nerostou. Rostou pouze za přítomnosti kmene *Staphylococcus aureus* v drobných lesklých bezbarvých koloniích; tomuto jevu říkáme satelitový fenomén. Jestliže je výsledek i po 48 hodinách negativní, provedeme z lahvičky znovu mikroskopický preparát a krev vyočkujeme na krevní, čokoládový a Schaedlerův agar. Další den znovu kultivaci odečteme. Jestliže:

- Při prohlížení preparátu zjistíme pozitivitu, musíme počkat na výsledky kultivace do druhého dne. Ty mohou být buď pozitivní, nebo negativní a v tom případě ještě dobu kultivace prodlužujeme.
- Při opakované negativitě jak preparátu, tak kultivace, prodlužujeme kultivaci médií na 7 dnů. Je-li i po 2. vyočkování a 7 dnech kultivace pevných médií nález negativní, je výsledek hodnocen jako falešná pozitivita.

Je-li mikroskopický preparát z pozitivní lahvičky pozitivní, ale kultivace po 24 hodinách negativní, provede se na krevní agar čára kmenem *Staphylococcus aureus* a při další negativě po 48 hodinách se znovu provede mikroskopický preparát a kultivace na krevní, čokoládový a Schaedlerův agar. Tyto naočkované půdy kultivujeme nejméně 10 dní.

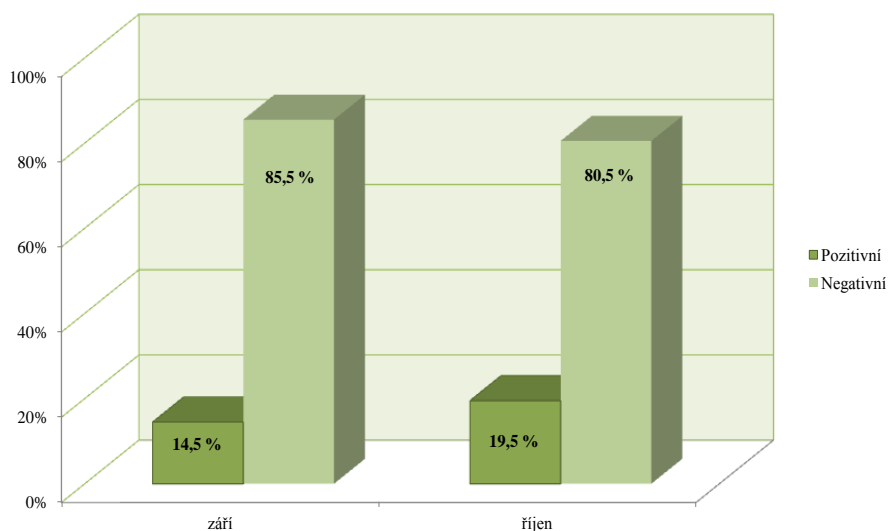
4. VÝSLEDKY

V období od 1. 9. 2012 do 31. 10. 2012 bylo pacientům na odděleních Nemocnice České Budějovice, a.s. odebráno celkem 2 254 vzorků na vyšetření hemokultur.

4.1 Procento pozitivity

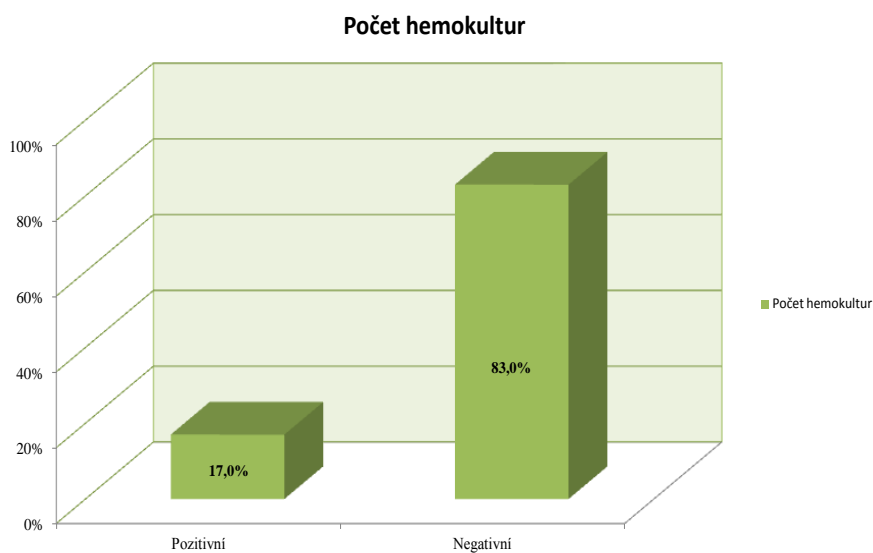
Prvním cílem bylo zjistit procento pozitivity hemokultur, jež jsem zhodnotila v následujících grafech.

Graf 1: Procento pozitivity hemokultur v měsících září a říjen



Tento graf zobrazuje srovnání pozitivit v měsících září a říjen. V září bylo vyšetřeno celkem 1 114 hemokultur. Procento pozitivity vzorků bylo 14,5 % (161 pozitivních vzorků) a negativních bylo 85,5 % (953 vzorků). V říjnu můžeme pozorovat lehké navýšení procenta pozitivity, které činí 19,5 % (222 pozitivních vzorků) a negativních je 80,5 % (917 vzorků), z celkového počtu 1 139 hemokultur.

Graf 2: Procento pozitivity hemokultur v obou měsících



Za dvouměsíční období bylo dohromady vyšetřeno 2 254 hemokultur. Z tohoto celkového počtu bylo pozitivních 383 vzorků, což činí 17 %. Negativních vzorků bylo celkem 1 870 a představuje tak 83 %.

4.1 Izolovaná agens

Druhým cílem bylo zjistit, jaká agens byla z pozitivních hemokultur izolována. V následující tabulce č.1 můžeme vidět přehled izolovaných agens z pozitivních hemokultur, počet, kolikrát se bakterie objevila a její procentuelní zastoupení.

Tabulka 1: Izolovaná agens

Rod	Druh	Počet	Relativní četnost
<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii komplex</i>	3	0,8 %
	<i>junii</i>	3	0,8 %
	<i>species</i>	4	1 %
Anaerobní G+ tyčky blíže neurčené.		1	0,3 %
<i>Bacillus</i>	<i>pumilis</i>	1	0,3 %
<i>Bacteroides</i>	<i>thetaiotaomicron</i>	1	0,3 %
	<i>vulgatus</i>	1	0,3 %
<i>Burkholderia</i>	<i>multivorans</i>	1	0,3 %
<i>Campylobacter</i>	<i>rectus</i>	3	0,8 %
<i>Cardiobacterium</i>	<i>hominis</i>	5	1,3 %
<i>Clostridium</i>	<i>species</i>	1	0,3 %
<i>Corynebacterium</i>	<i>pseudodiphtheriticum</i>	1	0,3 %
	<i>species</i>	2	0,5 %
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	7	1,8 %
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	12	3,1 %
	<i>faecium</i>	2	0,5 %
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	56	14,6 %
G+ tyčky blíže		1	0,3 %

neurčené.			
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	6	1,6 %
	<i>pneumoniae</i>	23	6,0 %
Kvasinky		3	0,8 %
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	1	0,3 %
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	1	0,3 %
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>	9	2,3 %
<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i>	4	1,0 %
<i>Parvimonas</i>	<i>micra</i>	6	1,6 %
<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>	1	0,3 %
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	11	2,9 %
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	7	1,8 %
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	4	1,0 %
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	31	8,1 %
	<i>capitis</i>	8	2,1 %
	<i>cohnii subsp. urealyticum</i>	2	0,5 %
	<i>epidermidis</i>	48	12,5 %
	<i>haemolyticus</i>	16	4,2 %
	<i>hominis subsp. hominis</i>	45	11,7 %
	<i>intermedius</i>	1	0,3 %
	Methicilin/Oxacilin rezistentní <i>Staph.aureus-MRSA</i>	31	8,1 %
	<i>species koaguláza negativní</i>	4	1,0 %
	<i>warneri</i>	3	0,8 %
	<i>xylosus</i>	1	0,3 %
<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	1	0,3 %
	<i>gallolyticus</i>	3	0,8 %
	<i>mitis</i>	1	0,3 %
	<i>pneumoniae</i>	4	1,0 %

<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	1	0,3 %
Viridující streptokoky		2	0,5 %
Celkem pozitivních		383	100 %

V další tabulce č. 2 uvedu pro lepší přehled 10 nejčastěji izolovaných agens, seřazené sestupně podle počtu.

Tabulka 2: 10 nejčastěji izolovaných agens

Bakterie	Počet	Zastoupení v %
<i>Escherichia coli</i>	56	14,6 %
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	48	12,5 %
<i>Staphylococcus hominis subsp. hominis</i>	45	11,7 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	31	8,1 %
Methicilin/Oxacilin rezistentní <i>Staph.aureus</i> -MRSA	31	8,1 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23	6,0 %
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	16	4,2 %
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	3,1 %
<i>Proteus mirabilis</i>	11	2,9 %
<i>Morganella morganii</i>	9	2,3 %

5. DISKUZE

Z celkového počtu 2 254 hemokultur bylo Bact/ALERT 3D systémem označeno 383 vzorků jako pozitivních. Toto číslo tvoří 17 %. Rozdíl pozitivit vzorků se v měsících září a říjen lišil přesně o 5 %. Toto procento positivity ale označuje pozitivní lahvičky z celkového počtu odebraných. Vzhledem k tomu, že od každého pacienta je odebrán obvykle více než 1 vzorek hemokultury a u některých pacientů se pozitivní nálezy stejného agens opakují, bylo by procento positivity vztažené k rodnému číslu a jednomu druhu izolátu nižší. Søggaard (17) ve své studii prokázal, že z celkového počtu hemokultur 29 273 bylo pozitivních 9 % (2 648 vzorků).

Nejčastějším izolovaným agens v mém souboru byla *Escherichia coli* z čeledi *Enterobacteriaceae*. Tato gram-negativní tyčka byla zachycena celkem 56krát (14,6 %). Tato bakterie se nachází v hojném počtu ve střevě, kde působí saprofytický. V případě, že se bakterie dostane do jiné části těla, může působit negativně a tím vyvolávat závažné infekce, včetně infekcí krevního řečiště.

Další nejčastěji zachycené bakterie jsou *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus hominis* ze skupiny koaguláza-negativních stafylokoků. Častější byl *Staphylococcus epidermidis*, kterého jsme vykultivovali 48krát. Jelikož se tato bakterie nachází u člověka na povrchu kůže, může se snadno stát kontaminantou při odběru hemokultury. V lahvičce se vzorkem se tedy sice bakterie objeví, ale v těle pacienta přítomny nejsou. Kontaminace vzorků může vést k nevhodné antibiotické léčbě, k prodloužení hospitalizace a tím i k celkovému zvýšení nákladů zdravotní péče na pacienta (8). Stafylokoky koaguláza-negativní mohou ale být častým etiologickým agens katérových IKŘ, mohou se uchytit na površích umělých náhrad a jiných cizorodých materiálů. Pokud z odebraných lahviček bude obsahovat pouze jedna tuto bakterii, bude se s nejvyšší pravděpodobností jednat o kontaminaci z kůže pacienta. Proto je velmi důležité dodržovat přísné zásady asepse při odběrech. Odběr by neměl být proveden z centrálního žilního katétru (CŽK) kvůli možnému pozitivnímu nálezu při jeho kontaminaci, ale měl by být proveden z periferní žíly. Proto by se měl odběr z CŽK dělat pouze v případech, kdy nelze odebrat krev ze žíly. Uvádí se, že větší počet

kontaminací (6,11 %) se vyskytlo u hemokultur odebraných přes katétr, kdežto přes žíly bylo procento kontaminace jen 3,15 %. Odebírání hemokultur přes katétr je sice pohodlnější a bezpečnější pro zdravotní pracovníky a méně bolestivé pro pacienty, ale představuje vyšší riziko kontaminace ve srovnání s kulturami odebrané z čerstvé periferní krve (16, 20). Odběr z katétru by se měl provádět jen při podezření na katérovou infekci, kdy se porovnává nález v hemokultuře odebrané z periférie a z katétru. Stejný nález svědčí pro katérovou infekci.

Staphylococcus aureus byl zachycen 62krát, z čehož přesně polovinu zaujímá MRSA. V literatuře (23) se uvádí, že co se týče situace výskytu MRSA v ČR, odpovídá výskyt 10–25 % všech izolovaných kmenů *Staphylococcus aureus*. V našem případě to bylo 50 %, což opět dáno neodlišením opakovaných výskytů u téhož pacienta. Nákaza MRSA se šíří ve velkých nemocnicích, u pacientů, kteří v nemocnici stráví delší dobu a mají zejména otevřené rány či dekubity. Zdravotnickí pracovníci v současné době provádějí opatření k omezení výskytu této infekce tak, aby nedocházelo k jejímu dalšímu šíření.

6. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá vyšetřováním hemokultur. Jedním z cílů mé práce bylo seznámit se s tématem infekce krevního řečiště a zpracovat na toto téma rešerši. Další dva cíle se týkaly praktické části, a to seznámit se s metodou vyšetřování hemokultur v bakteriologické laboratoři a postupem jejich zpracování v případě positivity. Výsledky jsem potom zhodnotila podle procenta positivity a podle nálezů izolovaných agens.

Ve dvouměsíčním období (září a říjen roku 2012) bylo celkem vyšetřeno 2 254 hemokultur, z nichž pozitivních bylo 383 (17 %); procento positivity v září bylo 14,5 % a procento positivity v říjnu bylo 19,5 %.

Nejčastěji způsobovaly infekce krevního řečiště rod *Escherichia coli*, jehož vysoký výskyt se dal předpokládat a koaguláza-negativní stafylokoky, které jsou uváděny jako izoláty z hemokultur ve většině literatury na prvním místě. Jde však většinou o kontaminanty.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. BacT/ALERT® 3D Range. *BioMérieux* [online]. 2013 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL_CLN_PRD_G_PRD_CLN_48
2. BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
3. BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009, 651 s. ISBN 978-807-2626-441.
4. BRUNKHORST, Frank M. Markery sepse – klinický význam. *Medicína po promoci: časopis postgraduálního vzdělávání lékařů* [online]. Praha: Richard P. Mills, 2009, č. 2 [cit. 2013-04-14]. ISSN 1212-9445. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/13793>
5. ČERMÁK, Pavel. *Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště*. Praha: Maxdorf, 2008, 182 s. ISBN 978-807-3451-424.
6. ČERNÝ, Vladimír, Karel CVACHOVEC a Ivan NOVÁK. *Sepse v intenzivní péči: vybraná doporučení v diagnostice a terapii*. Praha: Maxdorf, 2002, 211 s. ISBN 80-859-1274-0.
7. FAVRE B, et al. (2005) Nosocomial bacteremia: Clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative staphylococci. *Infection Control And Hospital Epidemiology* 26, 697-702
8. GE Y, et al. (2011) Blood collection procedures influence contamination rates in blood culture: a prospective study. *Chinese Medical Journal* 124, 4002-4006
9. JIRSA, Roman. Provádění, možnosti a interpretace mikrobiologických vyšetření: Hemokultivace. *Klaudiánova nemocnice* [online]. 2012 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.klaudianovanemocnice.cz/files/oddeleni/klinicka-mikrobiologie/hemokultivace.pdf>
10. JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006, 404 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-1270-4.

11. JURÁNKOVÁ, Jana. *Klinická mikrobiologie v laboratorní praxi: bakalářský obor Zdravotní laborant*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2011, 73 s. ISBN 978-802-1056-572.
12. KENNEDY GT, BARR JG, GOLDSMITH C. (1995) Detection of bacteremia by the continuously monitoring BacT/Alert system. *Journal Of Clinical Pathology* 48, 912-914
13. NYČ, Otakar. Antibiotická terapie infekční endokarditidy. *Postgraduální medicína-příloha* [online]. 2010, č. 1 [cit. 2013-05-02]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/antibioticka-terapie-infekcni-endokarditidy-451391>
14. RACEK, Jaroslav et al. *Klinická biochemie*. 1. vyd. Praha: Galén, 1999, 317 s. ISBN 80-718-4971-5.
15. SAS, Igor. Nozokomiální infekce a infekce multirezistentními organismy v podmínkách intenzivní péče. *Postgraduální medicína* [online]. 2010, č. 9 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/nozokomialni-infekce-a-infekce-multirezistentnimi-organismy-v-podminkach-intenzivni-pece-455567>
16. SELF WH, et al. (2011) The risk of blood culture contamination associated with specimen collection through peripheral intravenous catheters. *Annals of Emergency Medicine* 58, S220-S221
17. SØGAARD M, et al. (2011) Blood culture status and mortality among patients with suspected community-acquired bacteremia: a population-based cohort study. *BMC Infectious Diseases* 11, 139
18. STREITOVÁ, Dana et al. Prevence sepse. Standardní operační postup. *Nozokomiálne nákazy*, 2009, roč. 8, č. 1, s. 39-50. ISSN: 1336-3859.
19. SVOBODA, Petr. *Sepse v traumatologii a chirurgii*. 1. vyd. Praha: Triton, 2004, 199 s. ISBN 80-725-4550-7.
20. ŠENKÝŘOVÁ, Vladislava. Hemokultura. *Urologie pro praxi* [online]. 2012, č. 3 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2012/03/10.pdf>

21. ŠEVČÍK, Pavel. *Sepse v intenzivní medicíně*. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1997, 155 s. ISBN 80-701-3250-7.
22. THUIS, LG a J-F DHAINAUT. Definitions and epidemiology. *Septic shock*. London [etc.]: W.B.Saunders, 2000. ISBN 0-7020-1773-6.
23. VESELÝ, Dan et al. MRSA na zdravotnickém pracovišti. *Lékařské listy* [online]. 2009, č. 8 [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/mrsa-na-zdravotnickem-pracovisti-419315>
24. VOTAVA, Miroslav et al. *Lékařská mikrobiologie II: Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 309 s. ISBN 80-210-2272-8.
25. VOTAVA, Miroslav et al. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
26. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2001, 247 s. ISBN 80-902-8962-2.
27. ZÁHOREC, R. Co je to sepsi?. *Česko-Slovenské fórum pro sepsi* [online]. [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: http://www.csfps.cz/otazky_a_odpovedi_sepsi.html
28. ZÁVADA, Josef. *Syndrom multiorgánové dysfunkce*. 1. vyd. Praha: Grada, 2001, 254 s. ISBN 80-716-9781-8.
29. PETROVÁ, Pavla a Marija ŠVÁBOVÁ. IL-6, PCT, CRP - pomocné markery vdiagnostice septických stavů. *Roche* [online]. 2010 [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0110/Sepse.pdf>

8. KLÍČOVÁ SLOVA

Infekce krevního řečiště

Původci infekcí krevního řečiště

Sepse

Vyšetřování hemokultur