

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**Přínos kvantitativního zpracování sputa v diagnostice
respiračních infekcí**

bakalářská práce

Autor práce: Lucie Koubová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant
Vedoucí práce: Mgr. Markéta Hajná, PhD.

Datum odevzdání práce: 3.5.2013

Abstrakt

Infekce DCD patří celosvětově mezi jednu z hlavních příčin morbidity, a proto je velmi důležitá jejich včasná diagnostika a zahájení efektivní antibiotické terapie. Mikrobiologická diagnostika infekcí DCD je komplexní a zahrnuje podle klinických projevů nemoci, tíži celkového stavu nemocného a epidemiologických souvislostí celé spektrum vyšetření.

Nejčastěji neinvazivně odebíraným materiálem z DCD pro mikrobiologické vyšetření při podezření na infekci dolních cest dýchacích je spontánně vykašlané sputum. Základní metodou je pak jeho mikroskopické a kultivační vyšetření. K tomu, aby laboratoř a následně i ošetřující lékař dosáhli co nejpřesnější korelace mezi laboratorní interpretací nálezu a klinickým stavem pacienta, je velmi důležité zajištění klinické a technické validity vzorku, tzn. její preanalytické části. Neméně důležitý je i výběr metody kultivačního zpracování vzorku sputa.

Cílem práce je porovnání dvou metod bakteriologického zpracování sputa – klasické kultivační metody neředěného sputa a metody kvantitativní kultivace sputa kombinované s jeho homogenizací. Dalším cílem je zhodnocení, zda metoda kvantitativního zpracování sputa, kdy se zpracovávají kultivačně pouze vzorky purulentní, umožňuje klinickému mikrobiologovi kvalitnější interpretaci výsledků vyšetření.

Klinické vzorky spontánně vykašlaného sputa byly zpracovány na úseku Klinické mikrobiologie a ATB střediska (ÚKMAS), Centrálních laboratoří Nemocnice Strakonice, a.s. v období od května do října 2012. Za dobu šesti měsíců bylo na ÚKMAS přijato celkem 266 vzorků sput, z nichž 230 bylo odebráno od hospitalizovaných pacientů a 36 pocházelo od pacientů z primární a komunitní péče. Vzorky tracheálního aspirátu (TAS) a bronchoalveolární laváže (BAL) do vyšetřovaného souboru vzorků zahrnuty nebyly. Sputum pocházelo od pacientů s podezřením na respirační infekci DCD a sputa byla odebírána ve většině případů před zahájením ATB terapie.

Všechny vzorky byly zpracovány oběma porovnávanými metodami. U klasické kultivační metody se zároveň s mikroskopickým vyšetřením v Gramově barvení, očkoval neředěný vzorek sputa na vybrané pevné kultivační půdy. Při kvantitativním zpracování sputa se primárně prováděla mikroskopie, jež vyloučila kontaminované vzorky pocházející z horních cest dýchacích (HCD), a ty se již dále nezpracovávaly. Kvantitativně se pak kultivovaly pouze zánětlivé (purulentní) vzorky s nízkým podílem dlaždicových epitelů, jež se před samotnou kultivací homogenizovaly.

Výsledky obou metod byly porovnány s klinickým stavem pacienta a poté byly statisticky vyhodnoceny klinické vlastnosti obou metod, podle kterých bylo možné usuzovat na přesnost dané metody.

Všech 36 přijatých vzorků sput od pacientů z primární a komunitní péče bylo zpracováno klasickou kultivační metodou. Kvantitativní metodou bylo zpracováno 12 vzorků, 24 jich bylo vyřazeno na základě mikroskopického vyšetření dle GRAMA. Senzitivita klasické kultivační metody versus kvantitativní metody pro tyto vzorky byla 100%/100%, specificita dosáhla 69%/74%, efektivita 69%/75%, pozitivní predikční hodnota 3%/3%, negativní predikční hodnota 100%/100% a pozitivní věrohodnost laboratorní zkoušky se rovnala 3,18/3,89.

Z celkového počtu 230 přijatých vzorků sput od hospitalizovaných pacientů bylo na základě mikroskopického vyšetření v Gramově barvení zpracováno kvantitativní metodou 130 vzorků (57%). Senzitivita klasické kultivační metody versus kvantitativní metody pro tyto vzorky byla 62%/72%, specificita 54%/67%, efektivita 56%/68%, pozitivní predikční hodnota 12%/14%, negativní predikční hodnota 84%/90% a pozitivní věrohodnost laboratorní zkoušky se rovnala 1,13/2,16.

Na základě výsledků práce lze metodu kvantitativního zpracování sputa doporučit jako metodu zkvalitňující interpretaci výsledků v diagnostice infekcí DCD u pacientů hospitalizovaných i u pacientů z primární a komunitní péče. Vyřazením materiálu nevhodného pro kvantitativní zpracování se nejen zkracuje doba nutná pro interpretaci výsledku, ale ušetří se i spotřební materiál v laboratoři. Vzorky sput však nelze vyřazovat pouze na základě mikroskopického vyšetření. Na zřetel se musí vzít i diagnóza pacienta. Kvantitativní zpracování vzorku, u mikroskopicky validních sput,

umožní mikrobiologovi přesněji předpovědět kolonizující suspektní patogeny a kmeny skutečně patogenní. Celkovou interpretaci vyšetření sputa zpřesňuje i klinická a technická validita vzorku.

Abstract

Lower tract respiratory infections (LRTI) remains worldwide among one of the most common causes of morbidity and therefore the early diagnosis and timely onset of effective antibiotic therapy is very important. Microbiological diagnosis of LRTI is complex and covers according to clinical presentation of the disease, severity of general patient condition and epidemiological context the full range of analysis.

The most often non-invasive material from LRT sent for microbiological analysis in suspected infections of LRT is spontaneously expectorated sputum. Basic method for its processing is then microscopy and cultivation analysis. For laboratory and consequently for the attending doctor to obtain the most exact correlation between the laboratory interpretation of the result and the clinical status of the patient is to assure clinical as well as technical validity of the sample, meaning its preanalytical phase. Equally important is the selection of the cultivation method for processing the sputum sample.

The purpose of this work is the comparison of two bacteriological methods for processing the sputum samples – classic cultivation method of undiluted sputum samples and quantitative sputum culture combined with its homogenisation. Another aim is to evaluate whether the quantitative sputum culture when only purulent samples are cultivated allows microbiologist higher quality interpretation of the analysis result.

Clinical samples of spontaneously expectorated sputum were processed at the Department of Clinical Microbiology and Antibiotic Station (KMAS), Central Laboratories, Strakonice Hospital from April to October 2012. During the six months period KMAS received in total 266 samples of sputum, out of which 230 came from the hospitalized patients and 36 came from primary and outpatients. Samples of tracheal aspirates (TAS) and bronchoalveolar lavage (BAL) were not included in the study. Sputum samples were received from the patients suspected of LTRI and in most of the cases sputum was collected prior to antibiotic therapy.

All the samples were analysed by both compared methods. In classic cultivation method simultaneously with the microscopic Gram analysis the sample was inoculated on selected culture media. During the quantitative sputum culture the microscopic Gram

analysis was performed first and contaminated sputa coming from URT were excluded from further analysis. Quantitative sputum culture was then performed only on purulent sputum samples with low rate of squamous epithelial cells. Those were homogenised prior the cultivation itself.

The results of both methods were compared with the clinical status of the patient and then clinical characteristics of the methods were statistically analysed. They allowed the assessment of the precision of a particular method.

All 36 samples from outpatients and primary care patients were processed by classic cultivation method. Quantitative sputum culture was performed on 12 samples, 24 samples were excluded on the basis of microscopic Gram analysis. Sensitivity of classic cultivation method versus quantitative culture method reached 100%/ 100%, respectively, specificity reached 69%/74%, effectivity 69%/75%, positive predictive value 3%/3%, negative predictive value 100%/100% and positive credibility of laboratory analysis equaled 3,18/ 3,89.

Out of the total 266 received samples from hospitalized patients 130 samples (57%) were processed by quantitative sputum culture on the basis of microscopic Gram analysis. Sensitivity of classic cultivation method versus quantitative culture method for these samples reached 62%/ 72%, respectively, specificity reached 54%/67%, effectivity 56%/68%, positive predictive value 12%/14%, negative predictive value 54%/67% and positive credibility of laboratory analysis equaled 1,13/ 2,16.

On the basis of the obtained results it is possible to recommend the quantitative sputum culture as the method which improves the interpretation in the diagnostic of LRTI in all hospitalized, outpatient and primary patients. By excluding the material which is not suitable for quantitative sputum culture is not only shortened the time for the result interpretation but also consumer material is saved in the laboratory. The sputum samples cannot be excluded exclusively on the basis of microscopy analysis. Diagnosis of the patient must to be taken into account as well. Quantitative sputum culture in microscopically valid samples allows microbiologist predict with greater accuracy colonising suspect pathogens and isolates truly pathogenic. Finally the overall interpretation of the sputum analysis refines clinical and technical sample validity.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) 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 (datum)

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala PharmDr. Evě Šimečkové, primářce CL Nemocnice Strakonice, a.s. za umožnění realizace této práce v laboratořích Úseku klinické mikrobiologie a ATB střediska, Centrální laboratoře, Nemocnice Strakonice, a.s.. Dále bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Markétě Hajné PhD. za odbornou pomoc, cenné rady a čas věnovaný při zpracování této práce.

Obsah

Úvod.....	14
1 Současný stav.....	15
1.1 Respirační infekce.....	15
1.1.1 Infekce horních cest dýchacích.....	15
1.1.2 Infekce dolních cest dýchacích.....	15
1.2 Diagnostika infekcí DCD.....	17
1.2.1 Mikrobiologická diagnostika infekcí DCD.....	18
1.2.2 Mikrobiologické vyšetření sekretů DCD.....	19
1.2.2.1 Preanalytická fáze bakteriologického vyšetření sekretů DCD.....	20
1.2.2.2 Preanalytická fáze mimo laboratoř.....	20
1.2.2.2.1 Neinvazivní techniky odběru.....	20
1.2.2.2.2 Invazivní techniky odběru.....	21
1.2.2.3 Preanalytická fáze v laboratoři.....	22
1.2.3 Analytická fáze.....	22
1.2.3.1 Bakteriologické vyšetření vzorků sputa.....	22
1.2.4 Post-analytická fáze.....	23
2 Cíle práce.....	24
3 Metodika.....	25
3.1 Charakteristika zpracovaného souboru.....	25
3.2 Mikrobiologické vyšetření vzorků sputa.....	25
3.2.1 Klasická kultivační metoda.....	26
3.2.2 Kvantitativní zpracování sputa.....	26
3.2.3 Mikroskopický preparát – diagnostické barvení dle Grama.....	29
3.2.4 Použité kultivační půdy.....	29
3.2.5 Používané biochemické testy k identifikaci izolovaných bakteriálních kmenů.....	29
3.2.6 Vlastnosti laboratorní metody.....	30
4 Výsledky.....	33

5	Diskuse.....	42
6	Závěr	46
7	Seznam informačních zdrojů	47
8	Klíčová slova	51
9	Přílohy.....	52

Seznam zkratk

Ab	Protilátka
Ag	Antigen
ATB	Antibiotika
ATB středisko	antibiotické středisko
BAL	Bronchoalveolární laváž
BOZP	Bezpečnost a ochrana zdraví při práci
CAMP test	Biochemický test k průkazu <i>Streptococcus agalactiae</i>
CAN2	Chrom kvasinky agar
CAP	Komunitní pneumonie (community acquired pneumonia)
CCM4223	<i>Staphylococcus aureus</i> – Česká sbírka mikroorganismů (CCM)predikční
CO ₂	Oxid uhličitý
COLSB	Krevní agar
CRP	C-reaktivní protein
DCD (LRT)	Dolní cesty dýchací (Lower respiratory tract)
EPI	Epitelie
ESCMID	European Society for Clinical Microbiology
CHOPN	Chronická obstrukční plicní nemoc
H	Vzorek od hospitalizovaných pacientů
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
HAP	Nozokomiální pneumonie (hospital acquired pneumonia)
HAEM	Haemophilus selektivní agar (bacitracin)
HCD	Horní cesty dýchací
LEU	Leukocyty
LR+	Pozitivní věrohodnost laboratorní zkoušky
MALDI TOF MS	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NPH	Negativní predikční hodnota

OF test	Biochemický test k průkazu gramnegativních nefermentujících tyček
PBS	Chráněný kartáčkový stěr (Protected specimen brush)
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PPH	Pozitivní predikční hodnota
PIIH	Pneumonie u imunokompromitovaných jedinců (pneumonia in immunokompromised hosts)
T	Vzorek pocházející od pacientů z komunity
TAS	Tracheální aspirát
ÚKMAS-CL	Úsek klinické mikrobiologie a antibiotického střediska – Centrální laboratoře, Nemocnice Strakonice, a.s.
UTI	Chrom gram negativní tyčky agar
VAP	Ventilátorová pneumonie (ventilator-associated pneumonia)

Úvod

V diagnostice infekcí dolních cest dýchacích (DCD) je základní metodou mikroskopické a kulturační vyšetření spontánně vykašlaného sputa. V České republice, kde zatím neexistují národní mikrobiologické standardy, se v mikrobiologických laboratořích používají většinou dvě metody kulturačního zpracování sekretu DCD. Jedná se o klasickou kulturační metodu neředěného sputa a o metodu kvantitativní kultivace sputa kombinované s jeho homogenizací.

Při použití klasické kulturační metody se zároveň s mikroskopickým vyšetřením v Gramově barvení, očkuje neředěný vzorek sputa na vybrané pevné kulturační půdy. Při kvantitativním zpracování sputa se primárně provádí mikroskopie, jež vyloučí kontaminované vzorky pocházející z horních cest dýchacích (HCD), a ty se již dále nezpracovávají. Kvantitativně se pak kultivují pouze purulentní vzorky s nízkým podílem dlaždicových epitelů, jež se před samotnou kultivací homogenizují.

Na úseku klinické mikrobiologie a ATB střediska (ÚKMAS) v Centrálních laboratořích Nemocnice Strakonice, a.s. se používá s mikroskopickým vyšetřením sputa dle GRAMA klasická kulturační metoda. Cílem mé práce bude zhodnocení přínosu kvantitativního zpracování sputa v diagnostice infekcí DCD, popř. jeho implementace do rutinního provozu laboratoře.

Ačkoliv infekce DCD jsou jednou z hlavních příčin morbidit a mortalit, diagnostika těchto infekcí a správná interpretace výsledků bakteriologického vyšetření je velmi často komplikovaná kontaminací odebíraných vzorků fyziologickou flórou HCD. HCD jsou často kolonizovány potenciálními patogeny, které nezpůsobují infekce DCD a tak laboratoř hraje důležitou úlohu v zajištění správného zpracování pouze validních vzorků a správné interpretaci kulturačních nálezů. Zároveň je však nutné zejména u hospitalizovaných a imunokompromitovaných pacientů pomýšlet na skutečnost, že infekční komplikace mohou být často vyvolány podmíněnými patogeny a to díky ztrátě přirozené obranyschopnosti organismu, způsobené základním onemocněním, invazivitou diagnostických a léčebných postupů, přítomností cizorodého materiálu či imunosupresivní léčbou.

1 Současný stav

1.1 Respirační infekce

Respirační infekce, akutní i chronické, představují v celosvětovém měřítku jednu z hlavních příčin morbidity ve všech věkových skupinách. Jsou způsobovány velmi širokým spektrem agens – od virů přes bakterie až po parazity a patogenní houby. (3)

Patogenní respirační agens mohou napadnout všechny části dýchacího ústrojí, běžné bývá současné postižení více partií najednou, a příznaky onemocnění tak mohou do značné míry splývat a překrývat se, což v klinické praxi často přináší diferenciálně-diagnostické problémy. (7,13)

Z praktického hlediska bývá u respiračních infekcí oddělována problematika horních a dolních cest dýchacích. (3, 4, 5, 13, 35)

1.1.1 Infekce horních cest dýchacích

Infekce horních cest dýchacích (HCD) zahrnují postižení dutiny nosní a hltanu včetně epiglotis, a dále jsou k nim přiřazeny infekce paranazálních dutin a středního ucha (3). Většina těchto infekcí je virového původu a průkaz etiologického agens se neprovádí (10). Z pohledu laboratoře validním vzorkem pro průkaz bakteriální infekce HCD je kultivace výtěru z krku pro akutní tonzylofaringitidy, popř. kultivační vyšetření tekutiny z paranazálních dutin u akutní sinusitidy. (13)

1.1.2 Infekce dolních cest dýchacích

Infekce dolních cest dýchacích (DCD) zahrnují postižení hrtanu, trachey, průdušek a průdušinek až po alveoly. (3). Jde o velmi široký pojem zahrnující akutní bronchitidu, pneumonii a exacerbace chronických plicních onemocnění (CHOPN, cystická fibróza). (7) Nesourodá problematika infekcí DCD je navíc odlišná u dětí a mladistvých, u osob v takzvaném produktivním věku a u osob starších. Samostatnou skupinu infekcí DCD tvoří infekce spojené s nemocniční péčí a infekce u pacientů s poruchou imunity (36).

Podle Evropské společnosti pro klinickou mikrobiologii a infekční nemoci (7) se infekce DCD manifestují z klinicko-epidemiologického hlediska v pěti základních skupinách:

- komunitní respirační infekce – typické i atypické
- nemocniční (nozokomiální infekce)
- infekce imunokompromitovaných jedinců
- infekce u exacerbací chronické bronchitidy (CHOPN)
- infekce u pacientů s cystickou fibrózou

Z respiračních infekcí DCD jsou pneumonie nejzávažnější a často život ohrožující infekce. (36)

Z klinického hlediska je nejdůležitější u pneumonií jejich epidemiologické dělení, tzn. podle prostředí vzniku pneumonie a pacienta. Toto dělení umožňuje předpovědět typ vyvolávajícího patogenu a podle toho u těžkých pneumonií vybrat vhodné antibiotikum k empirické léčbě pneumonie (15)

- komunitní pneumonie (CAP – community acquired pneumonia) – typické i atypické
- nozokomiální pneumonie (HAP – hospital acquired pneumonia)
- ventilátorová pneumonie (VAP- ventilator-associated pneumonia)
- pneumonie u imunokompromitovaných jedinců (PIIH – pneumonia in immunocompromised hosts)

V současné době se také přehodnocuje náhled na pneumonie u pacientů, které byly dříve klasifikované jako komunitní pneumonie (CAP), ale kdy se pacient před onemocněním dostával do rizika spojeného se zdravotnickými výkony (dřívější hospitalizace, dialýza, pečovatelské domy). Skupina Micek et al (2007) navrhuje, že by tyto případy „CAP“ měly být správněji zařazovány do skupiny pneumonií asociovaných se zdravotní péčí -HCAP (health-care associated pneumonia).

Odhaduje se, že ročně v ČR onemocní pneumonií 100 000 až 150 000 osob, z nichž více než 20 000 je třeba hospitalizovat. Mortalita pneumonií v ČR činí kolem 20-30/100 000 obyvatel ročně. Letalita závisí na věku pacienta, závažnosti nemoci,

etiologii a přítomnosti komorbidit. Pohybuje se v rozsahu 4-30 %. Dominujícími patogeny jsou bakterie a viry. (3)

Nejčastějšími bakteriálními původci CAP v našich podmínkách jsou *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*. Mohou to však být i *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*. Z ostatních agens jsou to pak *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* a také různé viry, včetně viru chřipky. U starších osob a u osob s přidruženými nemocemi jsou záněty plic častěji vyvolané i dalšími gramnegativními bakteriemi jako *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, vzácněji pak *Pseudomonas aeruginosa*. Zvláštní problematiku mají pneumonie aspirační, kdy jsou patogeny anaerobní a mikroaerofilní bakterie z dutiny ústní, enterobakterie nebo i *Staphylococcus aureus* a tuberkulózní. (15)

V evropských zemích patří mezi nejčastější izolovaná patogenní agens s klinickou prezentací respiračních pneumopatií jsou u pacientů z komunity také: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* a *Klebsiella pneumoniae*. U pacientů hospitalizovaných se nejčastěji prokazují kromě druhů výše zmíněných u CAP pneumonií i gramnegativní nefermentující tyčky jako *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter sp.* U pacientů s cystickou fibrózou jsou to pak izolace komplexu druhů *Burkholderia cepacia*. (7)

1.2 Diagnostika infekcí DCD

Diagnostika infekcí DCD se opírá kromě mikrobiologických vyšetření i o další základní klinická vyšetření pacienta. (3, 13, 28) Jsou to především podrobná anamnéza, fyzikální vyšetření, CRP v séru, krevní obraz, skiagram hrudníku močovina, kreatinin, jaterní cesty (15). Pacienti se suspektní pneumonií vykazují většinou následující znaky a symptomy – dyspnoea, tachypnoea, puls >100, horečka > 39°C, hladina CRP >100 mg/l, nález na rentgenovém snímku. (13, 7)

1.2.1 Mikrobiologická diagnostika infekcí DCD

Podle klinických projevů nemoci, tíži celkového stavu nemocného a epidemiologických souvislostí z mikrobiologických vyšetření připadá v úvahu zejména mikroskopické a kulturační vyšetření sputa (při expektoraci), hemokultivace, detekce antigenů legionel a pneumokoků v moči, vyšetření pleurálního výpotku, vyšetření bronchoalveolární tekutiny nebo plicní tkáně, sérologická vyšetření (při podezření na špatně kultivovatelné patogeny jako příčinu nemoci, popř. i molekulární i genetické metody. (15)

Tabulka č. 1 (3) uvádí přehled mikrobiologických vyšetření používaných k určení původce pneumonie. Je z ní patrné, že nejčastěji indikovaným vzorkem od pacientů při podezření na infekci DCD je spontánně vykašlané sputum. (1, 13) Má však smysl hlavně u nemocných se zřetelnou expektorací. (15)

Tabulka č. 1

Klinická diagnóza	Vyšetřovaný materiál	Metoda
Pneumokoková pneumonie	sputum	mikroskopie, kultivace
	krev	hemokultivace
	moč	průkaz pneumokokového Ag
Stafylokoková pneumonie	sputum	mikroskopie, kultivace
	krev	hemokultivace
Mykoplasmová nebo chlamydiová pneumonie	sražená krev	sérokonverze nebo vzestup specifických Ab proti těmto bakteriím, průkaz chladových aglutininů
Virová pneumonie	sražená krev	sérokonverze nebo vzestup specifických Ab proti danému viru
Legionelová pneumonie	moč	průkaz legionelového Ag
	BAL, TAS	kultivace, PCR
	sražená krev	vzestup Ab od 3. - 4. týdne
Plicní tuberkulóza	sputum, TAS	mikroskopie, kultivace, PCR
	heparizovaná krev	vyšetření senzibilizace lymfocytů

Pneumocystová pneumonie	BAL, TAS, indukované sputum	mikroskopie, průkaz pomocí značených Ab, PCR
Mykotická pneumonie	sputum, indukované sputum, BAL, TAS	mikroskopie, kultivace, průkaz mananu nebo galaktomanamu, průkaz agens pomocí značených Ab, PCR

Zdroj: Beneš, J., 2009

Velmi důležitá je klinická (správná klinická indikace vyšetření lékařem) a technická (technika odběru a transport, popř. uchování materiálu) validita vzorků, který pomůže prokázat infekci. Nejvhodnější jsou proto vzorky nekontaminované flórou HCD. (13, 32, 33)

Ideálně je nejlepší odebírat vzorky z primárně sterilních míst, to znamená krev ke kultivačnímu vyšetření (u těžších forem se septickým průběhem), pleurální výpotky (je-li možná punkce a to vždy před zahájením antibiotické terapie), u zaintubovaných pacientů je přínosnější vyšetření tracheálního aspirátu (TAS) nebo materiálu získaného při bronchoskopii (BAL, nebo chráněný kartáčkový stěr). (3, 7, 13) Ve většině případů jsou však k dispozici pouze vzorky získané neinvazivně – vykašlané sputum a TAS u intubovaných pacientů.

Vyšetření sputa je dobře dostupné u akutních exacerbací chronických bronchitid. Horší je situace u komunitních pneumonií, kde nebývá vždy přítomen produktivní kašel.

Pro potvrzení diagnózy pneumonie mají hemokultury nízkou senzitivitu, ale jejich specificita je vysoká. U pacientů se suspektní pneumonií se doporučuje odebrání dvou hemokultur (4 lahviček – 2 aerobní a 2 anaerobní) co nejdříve před empirickou léčbou. (3, 7, 13)

1.2.2 Mikrobiologické vyšetření sekretů DCD

Mikrobiologické vyšetření sekretů DCD je komplikovaný proces, který se skládá z několika hlavních fází.

1.2.2.1 Preanalytická fáze bakteriologického vyšetření sekretů DCD

Preanalytická fáze je období před vlastním laboratorním vyšetřením, jejíž podstatou je **správná klinická indikace vyšetření lékařem, dodržení zásad správného odběru indikovaných vzorků včetně správné přípravy pacienta před odběrem**, které zajišťuje zdravotní sestra či fyzioterapeut a **transport biologického materiálu do laboratoře**, jehož nedílnou součástí je správné označení odběrového materiálu se vzorkem a správné vyplnění průvodky. (13, 29)

Vyšetření má diagnostický přínos jen při správném odběru a včasném zpracování vzorku. (3, 13, 15, 32, 35).

1.2.2.2 Preanalytická fáze mimo laboratoř

1.2.2.2.1 Neinvazivní techniky odběru

TAS (endotracheální aspirát) – odsátí sekretů DCD s použitím endotracheální trubice je alternativní metodou, když jsou invazivní metody kontraindikovány. Není nutná bronchoskopie, vzorek se odebírá náhodně, hrozí zde však velké riziko kontaminace orofaryngeální flórou. (7)

Nejčastěji přijímaným vzorkem pro potvrzení infekce DCD odebíraným neinvazivně je vykašlané sputum. Správný odběr sputa je velmi důležitý pro jeho další zpracování. (2, 7, 9, 13, 33) Při odběru sputa se klade velký důraz na dodržování BOZP, protože jejich nedodržování může hrozit přenos respiračních infekcí. Nejvhodnější doba pro odběr je ráno, kdy pacient ještě nejedl popřípadě ani nekouřil, sputum je v dolních cestách dýchacích nahromaděné, jelikož je ve spánku potlačen reflex kašle. V prvním ranním sputu lze při mikrobiologickém vyšetření prokázat nejvíce nahromaděných patogenních agens. Odběr vzorku by se měl provádět před zahájením ATB léčby. Pokud je pacient již antibiotiky léčen, musí tato skutečnost být uvedena na žádance. (14)

Aby se dosáhlo největšího expektoračního účinku je potřeba před vlastním odběrem pacienta řádně poučit o technice a době vykašlávání a o manipulaci se sputovkou. Pacient by si měl vypláchnout ústa čistou pitnou vodou, pokusit se o maximální možný nádech a poté se snažit vykašlávat v krátkých opakovaných nárazech přímo do sterilní plastické nádoby se širokým hrdlem, sputovky. (14) Vykašlaný sekret dýchacích cest se zachytí do řádně označené zkumavky, dle požadavků laboratoře. Je důležité zkontrolovat, zda se ve zkumavce nachází sputum. Vzorek může obsahovat sliny nebo nosní sekrety. V tom případě by se jednalo o nepurulentní sputum. Lze to poznat podle vazké konzistence a přítomnosti hnisavých vloček ve vzorku. Řádně označená zkumavka se zašle k mikrobiologickému nebo cytologickému vyšetření. Pokud pacient není schopen sputum vykašlat, provádí se bronchoskopie, chráněný stěr kartáčkem – bronchoalveolární laváž, výplach, aspirace. (19)

Odebraný vzorek se ihned odesílá do laboratoře s vyplněnou žádankou. Prodloužená doba transportu materiálu do laboratoře snižuje pravděpodobnost přežití málo odolných patogenů, způsobujících onemocnění DCD.

K nejčastějším chybám při odebírání vzorku patří nedodržování BOZP, pozdní odeslání materiálu do laboratoře, nedodržení podmínek daných laboratoří. Další chyba je nedostatečné poučení pacienta, kdy pacient sputum nevykašlává, spíše jej vyplivuje a ve vzorku se nachází sliny. (14)

1.2.2.2.2 Invazivní techniky odběru

Specifická bronchoskopie pro diagnostiku infekcí DCD není vysoká a to hlavně díky časté kontaminaci z HCD a také proto, že pacient je často vystaven zbytečně dalšímu riziku dekompenzace dýchání při samotném odběru vzorku. U ventilovaných pacientů se odebírají invazivně vzorky z plic, které jsou chráněné před kontaminací kolonizující mikroflórou přítomnou prakticky vždy v průdušnici pacienta s delší ventilační podporou (bronchoskopie je spojena s odebráním BAL nebo s chráněným kartáčkovým stěrem – PSB-protected specimen brush). (1, 3, 7, 9)

1.2.2.3 Preanalytická fáze v laboratoři

Po příjmu vzorku do laboratoře se zkontroluje jeho identifikace, která musí souhlasit se žádankou. Žádanka i vzorek se označí stejným identifikačním číslem. Pokud nelze provést laboratorní zpracování daného materiálu ihned, musí se vzorek správně uchovávat. Vzorky sputa 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 odebraného vzorku sputa. (11)

1.2.3 Analytická fáze

Samotné laboratorní vyšetření zahrnuje tzv. analytická fáze. Hlavním cílem je izolovat a identifikovat bakteriální etiologická agens odpovědné/á za infekce DCD. Bakterie jsou identifikovány a je provedeno vyšetření antibiotické citlivosti, které zaručuje nasazení efektivní léčby. (7)

1.2.3.1 Bakteriologické vyšetření vzorků sputa

Sputum je možné vyšetřovat převážně u dospělých pacientů, protože děti jej většinou nejsou schopny vykašlat. (35) U pacientů z primární a komunitní péče často nelze vzorek odebrat, protože není přítomen produktivní kašel.

Jedná se o sekret průdušek vykašlaný z dolních cest dýchacích, což je nehomogenizovaná, vazká hmota. Purulentní sputum bývá žluté, zelené nebo špinavě hnědé, ale barva sama o sobě necharakterizuje bakteriální infekci. (2, 4) Dolní cesty dýchací jsou sterilní na rozdíl od horních cest dýchacích, kde může být sekret kontaminován značným množstvím komenzálů, zejména mikroflórou orofaryngu. (1, 16).

Vzhledem k problémům kontaminace vzorků sputa z HCD bylo provedeno značné množství pokusů se snahou o co nejobjektivnější zhodnocení validity vzorků sputa na základě mikroskopie. Do dnešní doby je nejčastěji citovaným zdrojem metoda publikovaná Murray a Washington v roce 1975. Autoři této metody při hodnocení kvality sputa doporučovali vyřazení sputa z dalšího zpracování v případě výskytu

epitelií v počtu nad 10 při 100násobném zvětšení (tj. při zvětšení objektivu 10x, okuláru 10x). (1). Brzy však narazili na frustraci svých kolegů kliniků, kteří vyřazovali většinu přijatých vzorků sputa ze zpracování. Původní metoda tak byla nahrazena novou, kdy pro další kultivační zpracování sputa stačilo, když se ve světelném mikroskopu při 100násobném zvětšení vyskytovalo >25 polymorfonukleárních leukocytů nezávisle na počtu epitelálních buněk. (8) Od té doby byl koncept mikroskopického vyšetření sputa jako skrínigové metody, která rozhodovala o jeho dalším kultivačním zpracování uznáván mikrobiology, přesto na základě nejednotných kritérií. (1, 5, 6, 12, 16, 18, 30,35)

Tato situace přetrvává vesměs to dnešní doby. V České republice, kde zatím neexistují národní mikrobiologické standardy, se v mikrobiologických laboratořích používají většinou dvě metody kultivačního zpracování sekretu DCD. Jedná se o klasickou kultivační metodu neředěného sputa a o metodu kvantitativní kultivace sputa kombinované s jeho homogenizací.

Při použití klasické kultivační metody se zároveň s mikroskopickým vyšetřením v Gramově barvení, očkuje neředěný vzorek sputa na vybrané pevné kultivační půdy. Při kvantitativním zpracování sputa se primárně provádí mikroskopie, jež vyloučí kontaminované vzorky pocházející z horních cest dýchacích (HCD), a ty se již dále nezpracovávají. Kvantitativně se pak kultivují pouze purulentní vzorky s nízkým podílem dlaždicových epitelí, jež se před samotnou kultivací homogenizují. (16)

1.2.4 Post-analytická fáze

Pro správnou interpretaci mikrobiologického nálezu je nutná zkřížená interpretace porovnání mikroskopického a kultivačního vyšetření sputa. (7) Senzitivita a specifická kultivace je snížena kontaminací flórou, která kolonizuje HCD. Diagnostický přínos v mikroskopickém a kultivačním vyšetření sputa závisí především na správném odběru vzorku, na metodě zpracování a na převažujícím morfortypu nalazeném v Gramově barvení (7,1)

2 Cíle práce

Cílem mé práce je porovnání dvou metod bakteriologického zpracování sputa – klasické kultivační metody neředěného sputa a o metodu kvantitativní kultivace sputa kombinované s jeho homogenizací. Pokusím se zhodnotit, zda kvantitativní zpracování sputa je metoda zkvalitňující interpretaci výsledků v diagnostice respiračních onemocnění.

Předpokládám, že metoda kvantitativního zpracování sputa, kdy se zpracovávají kultivačně pouze vzorky purulentní s limitním podílem dlaždicových epitelů umožňuje klinickému mikrobiologovi kvalitnější interpretaci výsledků vyšetření.

3 Metodika

3.1 Charakteristika zpracovaného souboru

Klinické vzorky spontánně vykašlaného sputa pro bakalářskou práci byly přijaty a zpracovány na úseku Klinické mikrobiologie a ATB střediska (ÚKMAS), Centrálních laboratoří Nemocnice Strakonice, a.s. Preanalytická část - odběr vzorků- nebyla z logistických důvodů kontrolována, ale předpokládalo se díky úzké konzultační spolupráci s nemocničními odděleními, že sputa byla odebrána podle správných odběrových zásad od pacientů spontánním odkašláním do sterilní odběrové nádoby - sputovky. Soubor vyšetřovaných vzorků pocházel jak od pacientů z primární a komunitní péče tak i od hospitalizovaných pacientů nemocnice.

Vzorky byly průběžně zpracovávány v období od května do října 2012. Za dobu šesti měsíců bylo na ÚKMAS Centrálních laboratoří Nemocnice Strakonice, a.s. přijato celkem 266 vzorků sput, z nichž 230 bylo odebráno od hospitalizovaných pacientů a 36 pocházelo od pacientů z primární a komunitní péče

Vzorky tracheálního aspirátu (TAS) a bronchoalveolární laváže (BAL) do vyšetřovaného souboru vzorků zahrnuty nebyly.

Sputum pocházelo od pacientů s podezřením na respirační infekci DCD. Sputa byla odebrána ve většině případů před zahájením ATB terapie.

Hlavním cílem správně indikovaného (klinicky validního) vyšetření sputa bylo identifikovat etiologické agens odpovědné za infekci DCD.

3.2 Mikrobiologické vyšetření vzorků sput

Přijaté vzorky sput byly nejprve označeny laboratorním číslem automaticky generovaným laboratorním informačním systémem – VaxNt Janiga Labs. Vzorky z primární a komunitní péče byly před číselným kódem označeny písmenem T, vzorky od hospitalizovaných pacientů písmenem H.

Všechny vzorky byly zpracovány oběma porovnávanými metodami.

3.2.1 Klasická kultivační metoda

Zpracování neředěného sputa klasickou kultivační metodou zahrnuje dva kroky. Nejprve bylo provedeno mikroskopické vyšetření sputa Gramovým barvením. U každého vzorku byl proveden nátěr neředěného sputa na podložní sklíčko, po zaschnutí byl zafixován nad plamenem a obarven dle Grama v barvicím automatu Mirastainer II podle instrukce platné interní dokumentace laboratoře. Pro mikroskopické barvení se používala barvicí souprava - *Gram color modifikovaný bez fenolu –MERCK*

Zároveň s Gramovým barvením bez ohledu na výsledek mikroskopického vyšetření, byl vzorek sputa zpracován klasickou kultivační metodou podle platné interní dokumentace laboratoře mikrobiologie. Podle této instrukce bylo inokulum rozočkováno na následující kultivační půdy:

COLSB, ¼ HAEM, ½ UTI, 1/6 CAN2. Byly používány komerční půdy od firmy OXOID.

Naočkování na krevní (COLSB) a čokoládový agar (HAEM) byl dán do termostatu s vyšší tenzí CO₂; UTI a CAN2 do (běžného) termostatu. Vzorky byly inkubovány 24 hodin při teplotě 37°C. (11, 33)

Následující den byly narostlé kolonie identifikovány pomocí MALDI systému popř. doplňkových biochemických testů.

3.2.2 Kvantitativní zpracování sputa

Nejprve byl vzorek naředěn 2%ním broncholysem v poměru 1:1. Roztok broncholyse byl připraven v lékárně Nemocnice České Budějovice. Poté byl zhomogenizován na laboratorní třepačce nejméně 5 minut. Čím déle bylo sputum na třepačce, tím lepší byl výsledek homogenizace. Po 20 – 30 minutách třepání byl ze zhomogenizovaného materiálu zhotoven nátěr barvený dle Grama, tentokrát fixovaný methanolem, aby se zabránilo vzniku sraženin krystalové violeti. Poté byl zhotovený preparát hodnocen mikroskopicky ve 100násobném zvětšení (tj. při zvětšení objektivu

10x, okuláru 10x) a zjišťovaná přítomnost poměru buněčných elementů – dlaždicových epitelíí a leukocytů.

- 1) pokud se dlaždicové epitelie vyskytovaly v množství 10 a více v jednom zorném poli, bez leukocytů a za přítomnosti různých typů mikroorganismů bez převahy jednoho morfotypu, šlo o pravděpodobnou kontaminaci sputa bakteriemi z HCD a sputum se dále nezpracovávalo. (LEU +, EPI +)
- 2) pokud se v nátěru vyskytovalo více než 10 leukocytů v zorném poli a menší množství epitelíí , vzorek sputa byl dále zpracováván kvantitativně. (od LEU ++ a více)

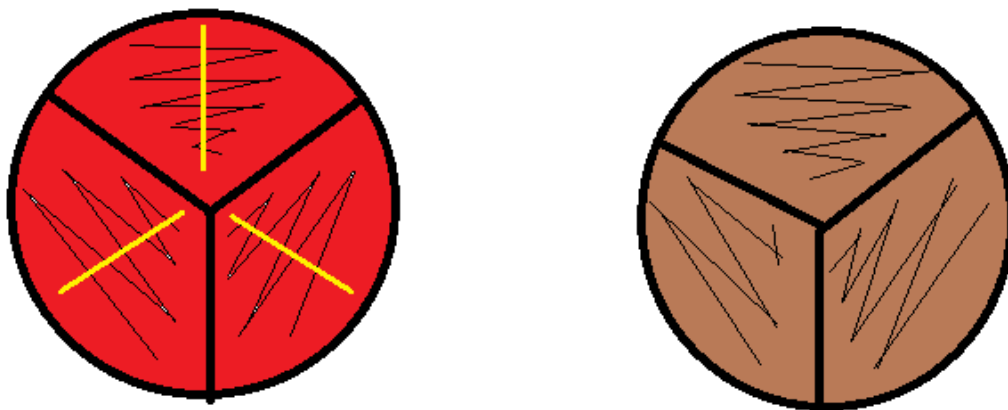
Zcela signifikantní mikroskopický nález svědčící pro pravděpodobnou infekci DCD byl takový, kdy kromě převahy leukocytů byla zhodnocena i převaha jednoho typu mikroba. Morfologie přítomných mikroorganismů a jejich kvantitativní poměry byly hodnoceny při pozorování imerzním objektivem (tj. při celkovém zvětšení 1000x).

Sputa neutropenických pacientů, pacientů s dg. J441 (CHOPN) a s dg.E840 (cystická fibróza) se nevyřazovala a zpracovávala se kvantitativně i bez ohledu na výsledek mikroskopického hodnocení.

Vybraná sputa vhodná ke kultivaci byla dále ředěna. Do 4 ml pufovaného fyziologického roztoku byl přidán 1 ml homogenizovaného sputa. Tím byla získána koncentrace 10^{-1} . Do první ze tří předem připravených zkumavek obsahujících 9,9 ml pufovaného roztoku bylo přidáno 0,1 ml naředěného sputa o koncentraci 10^{-1} , tím byla získána koncentrace 10^{-3} . Z této zkumavky se opět odebralo množství o objemu 0,1 ml, které bylo přeneseno Pasteurovou pipetou do další připravené zkumavky obsahující 9,9 ml pufovaného fyziologického roztoku. Tím bylo získáno ředění 10^{-5} . A stejným způsobem bylo připraveno i ředění 10^{-7} .

Kultivační půdy, COLSB (krevní agar) a HAEM (čokoládový agar), byly rozděleny na třetiny – viz. obr. č. 1 Na každou třetinu obou kultivačních půd byla vyočkována jednotlivá ředění 10 μ l kultivační kličkou. Ke každému vzorku pak náležely dvě

naočkované petriho misky. Na krevní agar byla ještě přidána čára kmene *Staphylococcus aureus* CCM 4223. Obě plotny byly poté inkubovány v termostatu při 37°C a při zvýšené tenzi CO₂.



Obr. č. 1 Naočkované kultivační půdy: Krevní agar, čokoládový agar

Po 24 hodinové inkubaci byly vzorky hodnoceny viz. tabulka č. 2 a jednotlivé kmene byly identifikovány klasickými biochemickými testy popř. pomocí systému MALDI TOF, podle postupů platné interní dokumentace laboratoře. (6, 16)

Tabulka č. 2 Hodnocení kvantitativně zpracovaného sputa

Návod k hodnocení kvantitativně zpracovaného sputa		
Ředění	Počet kolonií	Počet mikrobů/ml
10 ⁻³	100	10 ⁷
	10	10 ⁶
10 ⁻⁵	100	10 ⁹
	10	10 ⁸
10 ⁻⁷	100	10 ¹¹
	10	10 ¹⁰

Zdroj: Kunderová H., 2000

3.2.3 Mikroskopický preparát – diagnostické barvení dle Grama

Na základě tohoto barvení se rozlišují grampozitivní a gramnegativní bakterie. Grampozitivní bakterie jsou modré, protože si v procesu podrží komplex krystalové violeti s Lugolovým roztokem v bakteriální stěně. Gramnegativní bakterie se odbarví působením acetonu. Ty je potřeba následně dobarvit kontrastním barvivem, safarinem nebo zředěným fuchsinem. (22)

3.2.4 Použité kultivační půdy

COLSB – krevní agar obsahuje 5-10% defibrinované ovčí krve. Používá se k izolaci a kultivaci většiny mikrobů a podporuje průkaz zřetelných hemolytických zón.

HAEM – čokoládový agar obsahuje růstové faktory X a V, a je vhodný pro izolaci hemofilů, neisserií a meningokoků.

UTI – jedná se o chromogenní selektivně diagnostickou půdu. Slouží k diagnostice zejména gramnegativních tyček z čeledi *Enterobacteriaceae* i gramnegativních nefermentujících tyček

CAN2 – chromogenní selektivně diagnostická kultivační půda, sloužící k izolaci kvasinek. (31)

3.2.5 Používané biochemické testy k identifikaci izolovaných bakteriálních kmenů

Průkaz katalázy – Kataláza štěpí 3% roztok H_2O_2 na vodu a kyslík, což se projeví vznikem bublinek. Testem se odliší kataláza pozitivní stafylokoky a kataláza negativní streptokoky a enterokoky. (23)

CAMP test – využívá synergické reakce stafylokokového β -hemolyzinu s CAMP faktorem produkovaným *Streptococcus agalactiae*. Diagnostické médium je krevní agar, na kterém lze v pozitivním případě pozorovat zesílení hemolýzy motýlovitého tvaru. (20)

Test koagulace plazmy – slouží k rozlišení stafylokoků na stafylokoky koagulace pozitivní a koagulace negativní. Koagulace existuje volná nebo vázaná. Vázaná koagulace je vázaná na bakteriální stěnu a působí přímo na fibrinogen, který se pak sráží na povrchu stafylokoků. Po smíchání bakteriální suspenze s plazmou stafylokoky vytvoří shluky. (24)

Biochemický klín je určen k izolaci suspektních kolonií, gramnegativních tyček a k jejich rychlé předběžné identifikaci. (25)

OF test je určen pro rychlé rozlišení fermentativního a oxidativního metabolismu glukózy, založeném na modifikovaném Hugh Leifsonově mediu, tedy k rozlišení gramnegativních tyček z čeledi *Enterobacteriaceae* a nefermentujících tyček (př. *Acinetobacter*). (21)

Satelitový fenomén – Provádí se na diagnosticky selektivních půdách čokoládového agaru (HAEM). V okolí hemolyzujících druhů, např. *Staphylococcus aureus*, dochází vlivem lýzy erytrocytů k uvolnění heminu do média. Tyto bakterie také do svého okolí produkují NAD ve větším množství, než stačí enzymy degradovat. Růstové faktory V a X jsou tak dobře dostupné a hemofily rostou v okolí hemolyzujících bakterií ve formě drobných, průhledných kolonií. Dourčení druhu rodu *Haemophilus* se provádí porfyrinovým testem pomocí Kováčzova činidla. (26)

MALDI TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry – ionizace laserem za přítomnosti matrice-analýza doby letu). Tato technologie umožňuje velmi rychlou bakterií a hub oproti klasickým kultivačním metodám a biochemickým testům. Je založena na principu hmotnostní spektrometrie. Profil hmotnostních spekter u jednotlivých bakterií je druhově i kmenově specifický, a proto jej lze použít k identifikaci neznámých vzorků a identifikovat tak bakterie z 1 kolonie. (27)

3.2.6 Vlastnosti laboratorní metody

Z laboratorního hlediska přijatý materiál pocházel od dvou skupin lidí, a to od zdravých lidí a od nemocných. Za ideálních podmínek lze dosáhnout pozitivního výsledku u všech nemocných a negativního výsledku u všech zdravých lidí

ze zkoumané populace. Pro získání přehledu o vlastnostech metody byli pacienti rozděleni do čtyř skupin:

- a) TP – správně pozitivní pacienti
- b) FP – falešně pozitivní pacienti
- c) TN – správně negativní pacienti
- d) FN – falešně negativní pacienti

Z tohoto rozdělení lze vyjádřit a spočítat různé vlastnosti metody, a to senzitivitu, specificitu, efektivitu, pozitivní predikční hodnotu, negativní predikční hodnotu, prevalenci, pozitivní věrohodnost laboratorní zkoušky.

Senzitivita je ukazatel odhalující nemoc. Vyjadřuje, s jakou pravděpodobností bude mít nemocný pacient pozitivní výsledek. Senzitivita je definovaná jako podíl počtu nemocných s pozitivním testem a celkového počtu testovaných nemocných. Výsledek se uvádí v procentech

Specificita vyjadřuje pravděpodobnost negativního výsledku u zdravé osoby, je tedy možné zjistit schopnost metody vyloučit přítomnost nemoci. Specificita je definovaná jako podíl počtu zdravých osob s negativním výsledkem a celkového počtu testovaných zdravých jedinců. Výsledek se uvádí v procentech.

Efektivita ukazuje schopnost metody správně zařadit zdravé i nemocné jedince. Vyjadřuje pravděpodobnost pozitivních výsledků u nemocných a negativních výsledků u zdravých jedinců. Efektivita je definována jako podíl počtu všech správně zařazených jedinců ku počtu všech vyšetřovaných pacientů. Výsledek se uvádí v procentech.

Pozitivní predikční hodnota (PPH) udává schopnost metody najít nemocné mezi všemi jedinci s pozitivním testem. Je definovaná jako podíl nemocných osob s pozitivními výsledky a celkového počtu osob nemocných osob. Výsledek se uvádí v procentech.

Negativní predikční hodnota (NPH) určuje schopnost metody najít zdravé jedince mezi všemi jedinci s negativním testem. Je definována jako podíl zdravých osob s negativním testem a všech osob s negativním testem. Výsledek se uvádí v procentech.

Prevalence je definována jako počet existujících nemocí či zdravotních problémů ve vyšetřované skupině populace ve zvoleném časovém období. Vypočítá se podíl všech nemocných osob ve vyšetřované populaci v daném časovém intervalu a počet všech vyšetřovaných osob v daném časovém intervalu.

Pozitivní věrohodnost laboratorní zkoušky je definovaná jako podíl senzitivity a specificity. Ukazuje schopnost laboratorní zkoušky zachytit přítomnost nemoci při výsledku vyšším než je cut-off (hraniční) hodnota. Čím vyšší je LR+, tím je vyšší schopnost metody zachytit nemoc s co nejmenší chybou. Za použitelné se považují hodnoty $LR+ > 2,0$ (29)

4 Výsledky

Vzorky sput od pacientů z primární a komunitní péče

- A) Všechny vzorky byly zpracovány podle metodiky zpracovány klasickou kultivační metodou neředěného sputa viz. výsledková tabulka (Příloha č.2)
- B) Hodnocení mikroskopického vyšetření dle GRAMA vzorků spontánně vykašlaných sput u pacientů z primární a komunitní péče

Vzorky byly zpracovány mikroskopickým vyšetřením dle GRAMA na základě jehož vyhodnocení bylo rozhodnuto o jejich vyřazení nebo dalším zpracování kvantitativní metodou kultivace sputa.

Graf č. 1 Poměr zpracovávaných a vyřazených sput u pacientů z primární a komunitní péče (T-sput)

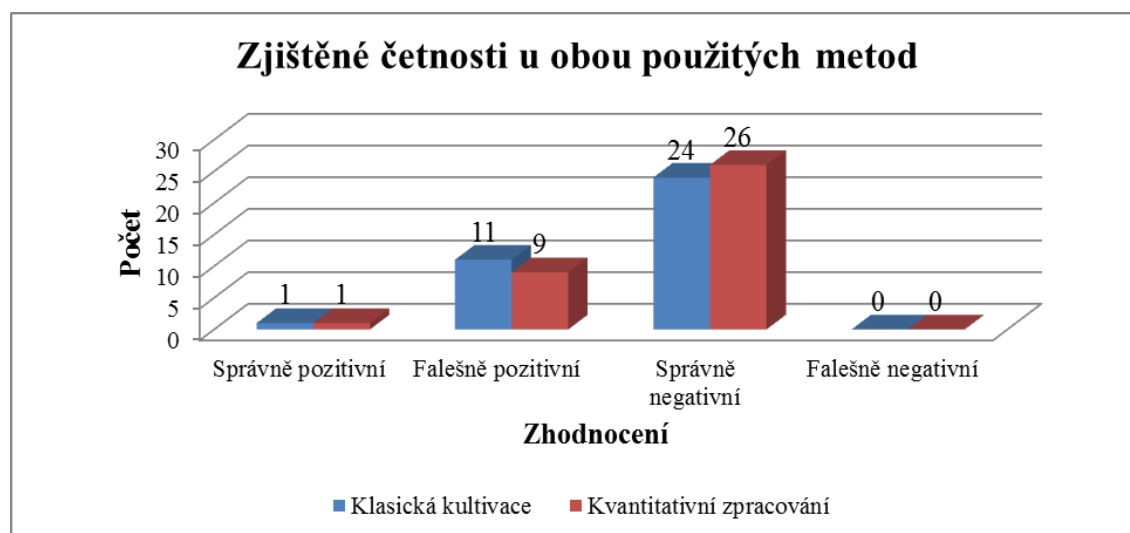


Zdroj: vlastní výzkum

Graf č. 1 ukazuje, že z celkového počtu 36 přijatých vzorků spontánně vykašlaného sputa od pacientů z primární a komunitní péče bylo na základě mikroskopického vyšetření v Gramově barvení zpracováno kvantitativní metodou 12 vzorků (33%). Do tohoto počtu byla započítána i sputa od pacientů s diagnózou J441 (2 vzorky) a E840 (2 vzorky), která byla zpracována kvantitativní metodou bez ohledu na výsledek mikroskopického vyšetření. 24 vzorků sput (67%) bylo vyřazeno, bez kvantitativního zpracování.

Hodnocení výsledků klasické kultivační metody neřaděného sputa a metody kvantitativního zpracování vzorků spontánně vykašlaných sput u pacientů z primární a komunitní péče

Graf č. 2 četnost zjištěných hodnot při použití obou metod zpracování vzorků sput



Zdroj: vlastní výzkum

V grafu č. 2 jsou uvedeny zjištěné četnosti kultivačních výsledků u obou použitých metod. Všechny 36 přijatých vzorků bylo zpracováno klasickou kultivační metodou. Za pozitivní nález byl označen vzorek s průkazem patogenního agens (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Branhamella catarrhalis*, jehož výsledek koreloval s klinickou diagnózou pacienta infekce DCD. U metody kvantitativního zpracování sputa byl za pozitivní nález označen každý vzorek s průkazem patogenního agens v ředění 10^{-5} a 10^{-7} . Charakteristiky obou metod byly navzájem porovnány.

Kvantitativní metodou bylo zpracováno 12 vzorků, 24 jich bylo vyřazeno na základě mikroskopického vyšetření dle GRAMA. Po porovnání výsledků kultivační metody s klinickým stavem pacienta byl z těchto 12 vzorků byl pouze 1 správně pozitivní a 11 falešně pozitivních. Vyřazených 24 sput bylo zařazeno mezi správně negativní. 1 bylo správně pozitivní, 9 falešně pozitivních a 26 správně negativních. Falešně negativní nebyl žádný vzorek.

Vypočítané klinické vlastnosti klasické kultivační metody a kvantitativní metody zpracování sputa od pacientů z primární a komunitní péče:

Tabulka č. 3 klinické vlastnosti obou laboratorních metod

	Klasická kultivace	Kvantitativní zpracování
Senzitivita	100%	100%
Specificita	69%	74%
Efektivita	69%	75%
PPH	3%	3%
NPH	100%	100%
Prevalence	3%	3%
Pozitivní věrohodnost laboratorní zkoušky (LR+)	3,18	3,89

Zdroj: vlastní výzkum

V tabulce č. 3 jsou uvedeny vypočítané hodnoty klinických vlastností klasické kultivační metody a kvantitativní metody zpracování sput odebraných pacientům z primární a komunitní péče. Senzitivita klasické kultivační metody pro tyto vzorky byla 100%, specificita dosáhla 69%, efektivita 69%, pozitivní Haemophilus hodnota 3%, negativní prediktivní hodnota 100% a pozitivní věrohodnost laboratorní zkoušky se rovnala 3,18.

Senzitivita kvantitativního zpracování sputa pro tyto vzorky byla 100%, specificita 74%, efektivita 75%, pozitivní predikční hodnota 3%, negativní predikční hodnota 100% a věrohodnost laboratorní zkoušky se rovnala 3,89. Prevalence se rovná hodnotě 3%.

Tabulka č. 4 Přehled vyskytujících se kmenů v jednotlivých ředěních

	Izolované kmeny	Nález v ředění		
		10^{-3}	10^{-5}	10^{-7}
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1		
2	<i>Catarrhalis influenzae</i>	1		
3	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	9		
4	<i>Aggregatibacter segnis</i>		1	
5	<i>Candida albicans</i>	2		

Zdroj: vlastní výzkum

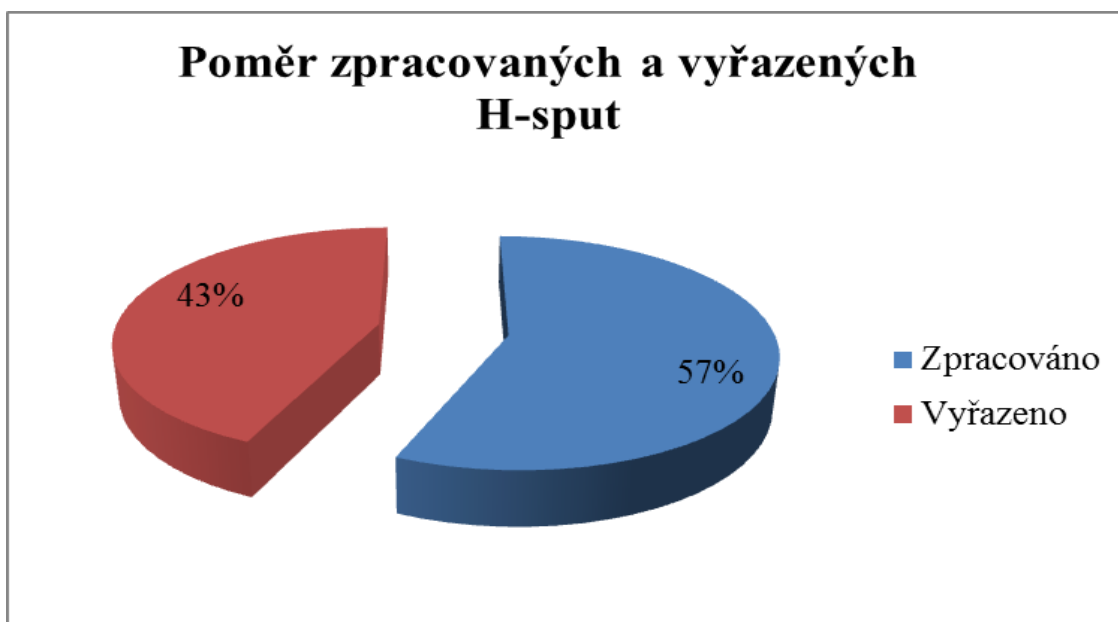
V tabulce č. 4 jsou uvedeny kmeny bakterií a kvasinek, které se podařilo izolovat.

Nejčastěji je zastoupený *Haemophilus parainfluenzae* v ředění 10^{-3} . V tomto ředění se dále vyskytli *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* a kvasinky zastoupené *Candidou albicans*. Z ředění 10^{-5} byl izolovaný *Aggregatibacter segnis*.

Hodnocení mikroskopického vyšetření dle GRAMA vzorků spontánně vykašlaných sput u hospitalizovaných pacientů

Vzorky byly zpracovávány mikroskopickým vyšetřením dle GRAMA na základě jehož vyhodnocení, bylo rozhodnuto o jejich vyřazení nebo dalším zpracování kvantitativní metodou kultivace sputa.

Graf č. 3 *Poměr zpracovávaných a vyřazených sput odebraných od hospitalizovaných pacientů (H-sput)*

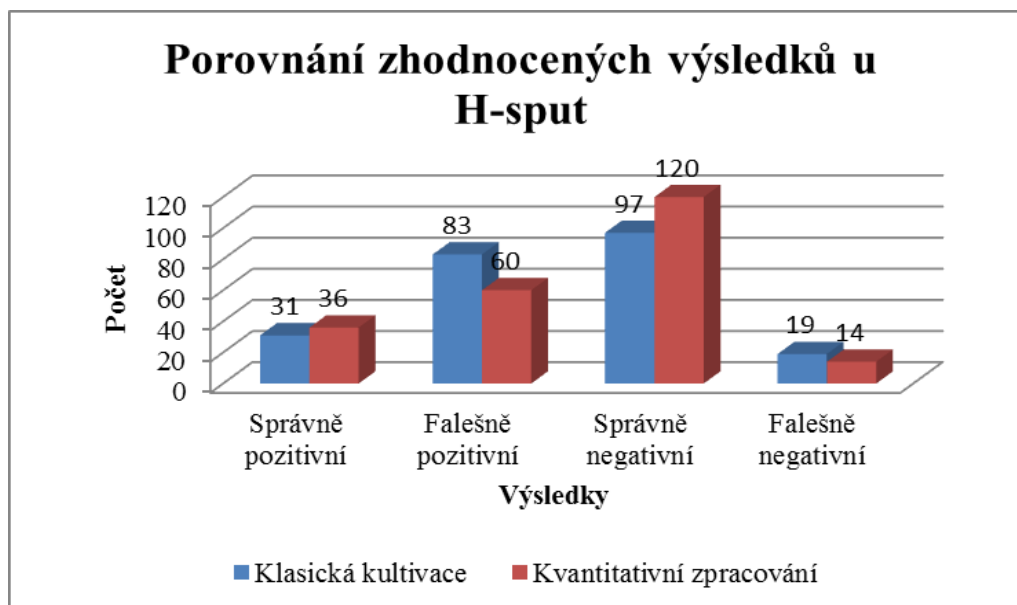


Zdroj: vlastní výzkum

Graf č. 3 ukazuje, že z celkového počtu 230 přijatých vzorků spontánně vykašlaného sputa od hospitalizovaných pacientů bylo na základě mikroskopického vyšetření v Gramově barvení zpracováno kvantitativní metodou 130 vzorků (57%). Do tohoto počtu byla započítána i sputa od pacientů s diagnózou J441 (62 vzorků), která byla zpracována kvantitativní metodou bez ohledu na výsledek mikroskopického vyšetření. Zbýlých 100 vzorků sput (43%) bylo vyřazeno.

Hodnocení výsledků klasické kultivační metody neřaděného sputa a metody kvantitativního zpracování vzorků spontánně vykašlaných sput u hospitalizovaných pacientů (H-sputa)

Graf. č. 4 četnost zjištěných hodnot při použití obou metod zpracování vzorků sput



Zdroj: vlastní výzkum

V grafu č. 4 jsou uvedeny zjištěné četnosti kultivačních výsledků. Všechny 230 přijatých vzorků bylo zpracováno oběma metodami. U klasické kultivační metody byl za pozitivní nález označen vzorek s průkazem patogenního agens, jehož výsledek koreloval s klinickou diagnózou pacienta infekce DCD za předpokladu správného odběru vzorku. U metody kvantitativního zpracování sputa byl za pozitivní nález označen každý vzorek s průkazem patogenního agens v ředění 10^{-5} a 10^{-7} . Výsledky obou metod byly navzájem porovnány.

Kvantitativní metodou bylo zpracováno 130 vzorků. 36 vzorků bylo správně pozitivních a 60 falešně pozitivních, 120 sput bylo zařazeno mezi správně negativní (patří sem i negativní zpracovávané vzorky s dg. J441) a 14 falešně negativních. Klasickou kultivační metodou byla zpracována všechna sputa. 31 vzorků bylo správně pozitivních, 83 falešně pozitivních a 97 správně negativních a 19 falešně negativních.

Vypočítané klinické vlastnosti pro klasickou kultivační metodu a kvantitativní zpracování sput odebraných hospitalizovaným pacientům:

Tabulka č. 5 klinické vlastnosti laboratorních metod

	Klasická kultivace	Kvantitativní zpracování
Senzitivita	62%	72%
Specificita	54%	67%
Efektivita	56%	68%
PPH	12%	14%
NPH	84%	90%
Prevalence	22%	22%
Pozitivní věrohodnost laboratorní zkoušky (LR+)	1,34	2,16

Zdroj: vlastní výzkum

V tabulce č. 5 jsou uvedeny vypočítané hodnoty klinických vlastností pro klasické kultivační metodu a kvantitativní metody zpracování sput odebraných hospitalizovaným pacientům. Senzitivita klasické kultivační metody pro tyto vzorky byla 62%, specificita 54%, efektivita 56%, pozitivní predikční hodnota 12%, negativní predikční hodnota 84% a pozitivní věrohodnost laboratorní zkoušky se rovnala 1,13.

Senzitivita kvantitativního zpracování sputa pro tyto vzorky byla 72%, specificita 67%, efektivita 68%, pozitivní predikční hodnota 14%, negativní predikční hodnota 90% a věrohodnost laboratorní zkoušky se rovnala 2,16. Prevalence se rovná 22%.

Přehled vyskytujících se kmenů v jednotlivých ředěních

Tabulka č. 6

	Izolované kmeny	Nález v ředění		
		10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷
1	<i>Branhamella catarrhalis</i> (BRCA)		1	1
2	<i>Serratia marcescens</i> (SEMA)		1	
3	kvasinky	29	3	
4	<i>Haemophilus influenzae</i> (HEIN)	16	2	3
5	<i>Escherichia coli</i> (ESCO)	4		
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KLPN)	1	1	1
7	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> (HEPA)	35		
8	<i>Staphylococcus aureus</i> (STAU)	3	1	1
9	Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (STAU-MRSA)	3		
10	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (SPPN)	3	1	
11	<i>Enterobacter cloacae</i> (ENCL)	2		
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PSAE)	1		
13	plísň	1		
14	<i>Klebsiella species</i> (KLSP)	2		
15	<i>Enterobacter species</i> (ENSP)	6	1	
16	<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATBA)	7	1	
17	<i>Morganella morganii</i> (MGMO)	2		
18	<i>Aggregatibacter segnis</i> (ABSE)	1	1	
19	<i>Streptococcus agalactiae</i> (SPAG)	1		

Zdroj: vlastní výzkum

V tabulce 6 jsou přehledně uvedeny veškeré mikroorganismy v jednotlivých ředěních, které se nám podařilo izolovat. V ředění 10⁻³ byl nečastěji zastoupen *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus influenzae* a kvasinky. V ředění 10⁻⁵ se objevil nejčastěji *Haemophilus influenzae* a kvasinky. Z ředění 10⁻⁷ se nám podařilo izolovat kmeny *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*.

Porovnání bakteriálních kmenů v horních a dolních cestách dýchacích

Graf č. 5



Zdroj: vlastní výzkum

Graf č. 5 ukazuje u vybraných mikroorganismů poměr mezi nálezy ve vyšší a nižší kvantitě. V horních cestách dýchacích byl nejčastěji nalezen *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus influenzae* a kvasinky, izolovaných z ředění 10^{-3} . V dolních cestách dýchacích byly izolovány kmeny *Haemophilus influenzae*, *Moxarella (Branhamella) catarrhalis*, a *Klebsiella pneumoniae*, izolovaných z ředění 10^{-5} a 10^{-7} .

5 Diskuse

Jak již bylo zmíněno na začátku této práce, infekce DCD jsou v celosvětovém měřítku jednou z hlavních příčin morbidit, a proto je velmi důležitá jejich včasná diagnostika a zahájení efektivní terapie. Je proto nutné a potřebné věnovat se této problematice jak z hlediska klinického, tak i laboratorního. Při podezření na infekci DCD lékař indikuje rentgenové vyšetření, odběr hemokultur, moči a spontánně vykašlaného sputa, které jsou následně zaslány k mikrobiologickému vyšetření. V mikrobiologické laboratoři je provedena značná část práce vedoucí k průkazu etiologického agens a v případě prokázání infekce i k určení ATB, která se indikují k cílené léčbě pacienta. Při zpracování vzorků sput však nezáleží pouze na laboratorní praxi. Musí se především předcházet nejčastějším chybám resp. preanalytickým vlivům, které způsobují, že pak výsledek může být neprávň vyhodnocený klinickým mikrobiologem. Je velmi důležité, aby zdravotnický personál i pacient byly náležitě poučeni o odběru vzorku, transportu a také uchování biologického materiálu v případě, že není možnost odebraný materiál ihned předat do mikrobiologické laboratoře.

V této práci jsem porovnávala dvě metody mikrobiologického vyšetření sputa, a to klasickou kultivační metodu neředěného sputa a kvantitativní zpracování sputa spojené s jeho homogenizací. Všech 266 přijatých vzorků sput pocházelo ze dvou hlavních skupin, od hospitalizovaných pacientů, nejčastěji z plicního a interního oddělení Nemocnice Strakonice, a.s., a od pacientů primární péče a komunity. Všechna sputa byla zpracována oběma metodami, jejich výsledky byly porovnány s klinickým stavem pacienta. Byly statisticky vyhodnoceny klinické vlastnosti, podle kterých je možno usuzovat s jakou přesností daná metoda pracuje.

Na základě mikroskopického vyhodnocení preparátu barveného dle Grama, popř. pouze dle diagnózy (v případě J441 a E840) bylo z přijatých 36 sput od pacientů z primární a komunitní péče 67% sput vyřazeno a 33% bylo zpracováno kvantitativní metodou. Ze sput pocházejících od hospitalizovaných pacientů bylo 57% zpracováno a 43% vyřazeno. Velký rozdíl mezi procentuálním počtem vyřazených u obou skupin pacientů přikládám především validitě přijatých vzorků. Vzorků odebraných

od pacientů z primární a komunitní péče bylo přijato za sledované období podstatně méně a nesplňovaly podmínky pro kvantitativní zpracování kombinované s homogenizací a ředěním sputa. Mezi nejčastější důvody vyřazení vzorku z analytického procesu patřil špatný odběr s převahou slin, nebo suspektní kontaminace orofaryngeální flórou. Vzorky sput však nelze vyřazovat pouze na základě mikroskopického vyšetření. Na zřetel se musí vzít i diagnóza pacienta, a zpracovávat všechna sputa od pacientů s cystickou fibrózou, exacerbací CHOPN, pacientů po chemoterapii, či pacientů s karcinomem plic. Vyřazením materiálu nevhodného pro kvantitativní zpracování došlo nejen ke zkrácení doby pro interpretaci výsledku, popřípadě dřívejšímu upozornění ošetřujícího lékaře na špatný odběr, ale i k ušetření spotřebovaného materiálu v laboratoři. U klasické kultivační metody byla zpracována všechna sputa bez ohledu na výsledek mikroskopie. Tím se u velké části pacientů prodloužila doba interpretace výsledku do druhého dne.

Po vyhodnocení souboru vzorků zpracovaných oběma metodami a jejich klinických vlastností jsem dospěla k závěru, že kvantitativní zpracování sput je vhodnější u obou skupin pacientů. Pracuje s lepší senzitivitou i specifitou, s vyšší pravděpodobností vyhledá mezi nemocnými zdravé jedince a mezi zdravými jedinci ty nemocné, než klasická kultivační metoda. Metoda kvantitativního zpracování sputa má i vyšší pozitivní věrohodnost laboratorní zkoušky. Zatímco klasická kultivační metoda nedosáhla na hranici věrohodnosti u sput odebraných od hospitalizovaných pacientů.

V 1 vzorku odebraného pacientovi z primární a komunitní péče byla potvrzena přítomnost patogenu - *Aggregatibacter segnis*, který patří k jednomu z nejčastějších původců respiračních infekcí. Toto infekční agens se vyskytovalo při kvantitativním zpracování vzorku v ředění 10^{-5} , a infekce dolních cest dýchacích byla potvrzena i klinicky. Při zpracovávání vzorků klasickou kultivační metodou byla izolovaná i další potencionální etiologické agens, ovšem respirační infekce u těchto pacientů nebyla prokázána. O signifikantní nález se jedná v případě, že je patogen nalezen v ředění 10^{-7} nebo 10^{-5} . V těchto ředění se podařilo izolovat u 6 pacientů etiologická agens u sput od hospitalizovaných pacientů. Jednalo se o *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus*

aureus, *Moxarella (Branhamela) catarrhalis* a *Klebsiella pneumoniae*. U těchto pacientů byla klinicky potvrzena infekce DCD. Nejčastěji se jednalo o pneumonii. V těchto případech, tedy podle hodnotících kritérií, laboratorní výsledek odrážel klinickou situaci. V ředění 10^{-5} , kdy se jedná o pravděpodobnou infekci dolních cest dýchacích byly nalezeny tyto bakterie: *Moxarella (Branhamela) catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia macescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter species*, nefermentující tyčky a kvasinky (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*). Tyto výsledky korelují i s údaji uvedenými v ESMID, pro nejčastější etiologická agens infekcí DCD. V ředění 10^{-3} byly nejčastěji izolovány *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus influenzae*, a kvasinky. Tímto se potvrzuje zejména hypotéza nálezu patogenu jako etiologického agens infekce DCD v závislosti na vyšším ředění.

Výsledky jsem porovnávala se studií Kunderové H., která byla provedena na Mikrobiologickém oddělení, Fakultní nemocnice Brno-Bohunice. V této studii bylo kvantitativní metodou zpracováno 3 243 sput. Sput vyřazených na základě mikroskopického vyšetření bylo 1 332, tedy 41%. Kvantitativně bylo zpracováno 1 911 sput, tedy 59%, při čemž u 29,5% byl prokázán patogen a u zbylých 29,5% byla přítomna pouze fyziologická mikroflóra. Výsledky se liší díky velkému rozdílu počtu přijatého materiálu a validitě přijatého materiálu. Kvalita odebíraného materiálu byla vidět u několika případů, kdy bylo do laboratoře zasláno špatně odebrané sputum, a žádný patogen v něm nebyl prokázán. Po zhodnocení klinických příznaků byl doporučen opakovaný odběr sputa, který už byl proveden pečlivěji, a laboratorními metodami se potvrdila respirační infekce.

V grafu č. 5 je na základě zjištěných informací porovnán výskyt bakterií pocházejících z horních cest dýchacích s výskytem patogenů z jinak sterilních dolních cest dýchacích. Z grafu je zřejmé že v dolních cestách dýchacích se vyskytují pouze patogenní kmeny kmeny bakterií, na rozdíl od horních cest dýchacích, které jsou osídleny komensálními mikroorganismy, nejčastěji *Haemophilus parainfluenzae*.

Po porovnání klasické kultivační metody a kvantitativního zpracování, jsem zjistila, že u 14 vzorků sput odebraných od hospitalizovaných pacientů došlo při kvantitativním

zpracování k falešně negativnímu výsledku. Důvodem bylo vyřazení materiálu po mikroskopickém vyhodnocení preparátu. V těchto případech nebyl na preparátu dostatečný počet leukocytů, ani převaha jednoho morfologického typu. K chybě mohlo dojít v preanalytické fázi, špatným odběrem nebo transportem vzorku. Při opakovaném odběru byl již patogen prokázán.

6 Závěr

Cílem mé práce bylo porovnání dvou metod bakteriologického zpracování spontánně vykašlaného vzorku sputa – klasické kultivační metody neředěného sputa a metody kvantitativní kultivace sputa kombinované s jeho homogenizací. Provedením praktické části této práce a vyhodnocením výsledků, jsem dospěla k závěru, že kvantitativní zpracování sputa je metodou zkvalitňující interpretaci výsledků v diagnostice infekcí DCD u pacientů hospitalizovaných i u pacientů z primární a komunitní péče. K tomu, aby laboratoř dosáhla co nejpřesnějších výsledků, tzn. co nejpřesnější korelace nálezu s klinickým stavem pacienta, je nutné zajistit v co nejvyšší kvalitě klinickou i technickou validitu vzorku. To se však jeví jako jeden z vážných problémů mikrobiologického vyšetření. Ze zhodnocených výsledků přijatého materiálu v této práci je patrné, že preanalytická fáze odběru sputa byla často podceňována. Při zabezpečení preanalytické fáze se správně zvolenou metodou v analytické fázi vede mikrobiologické vyšetření sputa ke správné diagnóze, cílené terapii a nedojde k poškození pacienta.

Mezi hlavní pozitivní stránky kvantitativního zpracování sputa patří především skutečnost, že výsledky negativních sput lze předběžně interpretovat ihned po mikroskopickém vyšetření dle Grama. Další výhodou interpretace nálezu při kvantitativním zpracování vzorku, u mikroskopicky validních sput, spočívá v několikanásobném ředění těchto vzorků. Pokud mikroorganismus naroste pouze v ředění 10^{-3} většinou se nejedná v dané situaci o původce infekce DCD. Pokud se kolonie mikroorganismů vyskytují i ve vyšších ředěních lze již usuzovat, že se jedná o infekci dolních cest dýchacích. Tuto předpověď metoda klasické kultivace neumožňuje. Její interpretace je často nepřesná, jelikož na základě klasického kultivačního zpracování vzorku nedokáže mikrobiolog s větší přesností rozeznat kolonizující suspektní patogeny a kmeny skutečně patogenní.

Myslím si, že implementace metody kvantitativního zpracování sputa na ÚKMAS Nemocnice Strakonice, a.s. může být přínosem v interpretaci bakteriálních infekcí DCD.

7 Seznam informačních zdrojů

1. BARTLETT John G. Diagnostic Tests for Agents of Community Acquired Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. 2011, č. 52(4): s. 296-304
2. BEDNÁŘ, M., et al., *Lékařská mikrobiologie*. Jihlava. Marvil. 1996. 558 s.
3. BENEŠ, J., *Infekční lékařství*, 1. vyd. Praha, Galén, 2009, s. 406-430 , ISBN 978-80-7262-644-1
4. BHATARCHARYA, A.K., Role of sputum cultures in diagnosis of respiratory tract infection. *Clinical medicine*. Lung India. 2006, č. 23; s. 20-24.
5. BUENVIAJE M.B. Quantitative Sputum culture and Gram Stain: Pulmonary Infection vs. Colonisation. *Philippine Journal of Microbiology and Infectious Diseases*. 1989, č.18 (1), s. 28-35.
6. DUBEN. J., Vyšetření infekcí dolních dýchacích cest. In DUBEN J, HAUSNER O., eds. *Vyšetření při bakteriálních onemocněních*. Praha: Avicentrum. 1986; 44-54 ISBN 73521-08/7-08-078-86
7. FREYMUTA, F., - IEVEN, M., - WALLET, F., Lower respiratory tract infections In: CORNAGLIA G., et al. *European Manual of Clinical Microbiology*, 1st edition. 2012; s. 153-161 ISBN 978-2-87805-026-4
8. GECKLER, R.W., et al. Microscopic and bacteriological comparison of paired sputa and transtracheal aspirates. *Journal of Clinical Mikrobiology*. 1977, č. 6: s. 396-399.
9. GOOSSENS, H., - IEVEN, M. Optimal sampling sites and methods for detection of pathogens possibly causing community – acquired lower respiratory tract infectious. *Journal of Clinic Mikrobiology*. 2009. č. 47, s. 21-31

10. IEVEN M., HOANG, VT, Upper respiratory tract infection, In: CORNAGLIA G., et al. *European Manual of Clinical Microbiology*, 1st edition, 2012, s. 145-152 ISBN 978-2-87805-026-4
11. I-M-20 Zpracování materiálu [2013] v: Interní dokumentace ÚKMAS-CL Nemocnice Strakonice, a.s. – Pracovní postupy
12. ISENBERG, H. D.: *Essential procedures for Clinical Microbiology*. Washington, American society for mikrobiology, 1998, pp.76 – 80 ISBN 1-55581-125-6
13. JINDRÁK V., - URBÁNKOVÁ, P., - NYČ, O., Antibiotika In: MAREK, J., et al.: *Farmakoterapie vnitřních nemocí*, 3. zcela přepracované vyd., Praha, Grada Publishing, 2005, s. 145-189, ISBN 80-247-0839-6
14. KELNAROVÁ. J. et al.: *Ošetrovatelství pro střední zdravotnické školy - 2. ročník*. 1. vyd. Praha. Grada Publishing. 2009. s. 105-108. ISBN 978-80-247-3106-3
15. KOLEK V. et al.: Klinické doporučení: Diagnostika a léčba komunitní pneumonie dospělých. Česká pneumologická a ftizeologická společnost a Společnost infekčního lékařství ČSL JEP. 2011. Dostupné z: <http://www.pneumologie.cz/odborne/doc/Pneumonie%20%20CAP%20doporuce%20postup%20pneumologie%20a%20infektologie%20verze%2017.3.2011.pdf>
16. KUNDEROVÁ, H.: Kvantitativní zpracování sputa jako metoda pro zlepšení diagnostiky infekcí dolních cest dýchacích. *Remedia-Klinická mikrobiologie* 2000; č. 4(1), s.16-18.
17. MICEK T.S. et al.: Health Care-Associated Pneumonia and Community-Acquired Pneumonia: a Single-Center Experience. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, roč. 51, č. 10, s. 3568 -3573.

18. MURRAY, P.R., - WASHINGTON J.A, Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clinic Proceedings*. 1975; č. 50: s. 339-344
19. PAUK, N. Moderní přístup k infekcím dolních dýchacích cest u dospělých. *Medicína pro praxi- přehledové články*. 2006, č. 5, s. 214-216.
20. P-M-09 CAMP test [2012] v: Interní dokumentace ÚKMAS-CL Nemocnice Strakonice, a.s. – Pracovní postupy
21. P-M-13 Průkaz fermentativního a oxidativního metabolismu glukózy [2012] v: Interní dokumentace ÚKMAS-CL Nemocnice Strakonice, a.s. – Pracovní postupy
22. P-M-14 Mikroskopický preparát – diagnostické barvení dle Grama [2012] v: Interní dokumentace ÚKMAS-CL Nemocnice Strakonice, a.s. – Pracovní postupy
23. P-M-21 Průkaz katalázy [2012] v: Interní dokumentace ÚKMAS-CL Nemocnice Strakonice, a.s. – Pracovní postupy
24. P-M-23 Test koagulace plasmy [2012] v: Interní dokumentace ÚKMAS-CL Nemocnice Strakonice, a.s. – Pracovní postupy
25. P-M-25 Biochemický klín [2012] v: Interní dokumentace ÚKMAS-CL Nemocnice Strakonice, a.s. – Pracovní postupy
26. P-M-30 Průkaz závislosti hemofilů na faktorech X a V [2012] v: Interní dokumentace ÚKMAS-CL Nemocnice Strakonice, a.s. – Pracovní postupy
27. P-M-72 Identifikace mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie metodou MALDI TOF na přístroji Microflex LT (Bruker Daltonics), pomocí softwaru flexControl s databází Maldi Biotyper [2013] v: Interní dokumentace ÚKMAS-CL Nemocnice Strakonice, a.s. – Pracovní postupy

28. PNEUMONIA GUIDELINES WORKING GROUP. Guidelines for Diagnosis and Management of Community and Hospital Acquired Pneumonia in Adults: Joint ICS/NCCP (I) Recommendations. *Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*. 2012 č. 54, s 267-281
29. RACEK J. et al. *Klinická biochemie*, 2. vyd, Praha, Galén, 2006, s. 33-45, ISBN 80-7262-324-9
30. *UK Standards for Microbiology Investigations – Investigation of Bronchoalveolar Lavage, Sputum and Associated Specimens* dostupné z: <http://www.hpa.org.uk/ProductsServices/MicrobiologyPathology/UKStandardsForMicrobiologyInvestigations/TermsOfUseForSMIs/AccessToUKSMIs/SMIBacteriology/>
31. VOTAVA, M. Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii, Brno, Hortus, 1999, s. 407 ISBN 80-238-5058-X
32. WILSON, M.J.B. - MARTIN D.E.: Quantitative sputum culture as a means of excluding false positive reports in the routine microbiology laboratory. *Journal of Clinical Pathology*, 1972; č. 25, s. 697-700.
33. YUHUA Z, et al. Analysis of the microbiota of sputum samples from patients with lower respiratory tract infections. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2010; č. 42, s. 754-761
34. ZIYADE, N. – YAGCI, A.: Improving sputum culture results for diagnosis of lower respiratory tract by saline washing. *Marmara Medical Journal*. 2010, roč. 23 č.1, s 30-36.
35. Žampachová, E.: Infekce dolních cest dýchacích z pohledu mikrobiologa. *Zdravotnické noviny, Příloha: Lékařské Listy*. 2009. č. 19, s. 21-23.

8 Klíčová slova

Infekce dolních cest dýchacích (DCD)

Kvantitativní zpracování sputa

Patogeny dolních cest dýchacích

Sputum

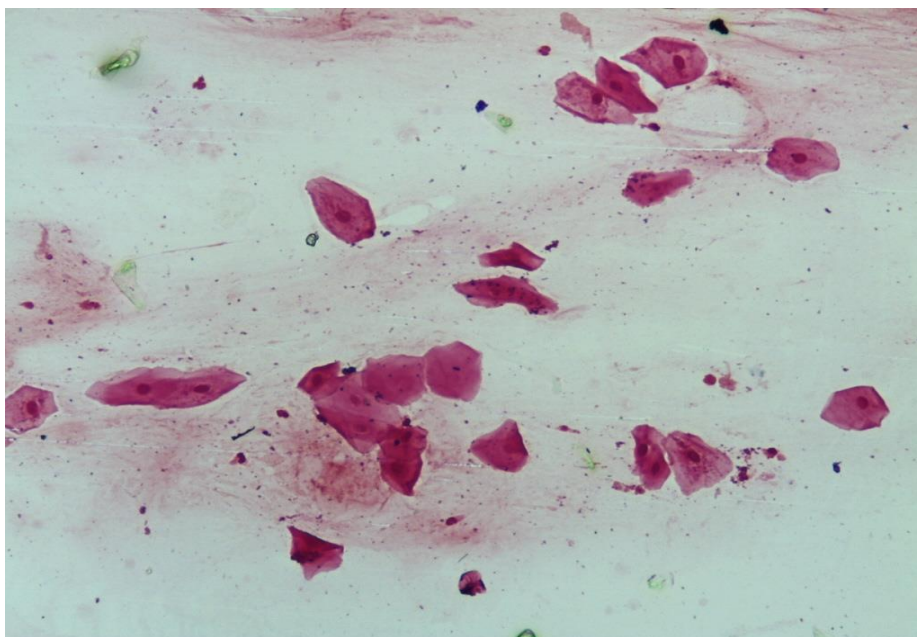
lower respiratory tract infections (LRTI)

quantitative sputum culture

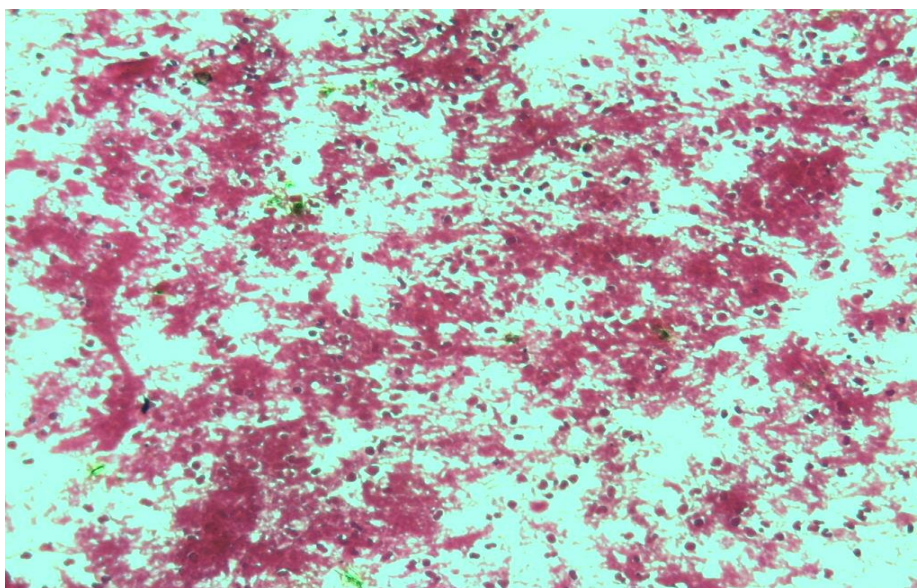
pathogens of LRT

sputum

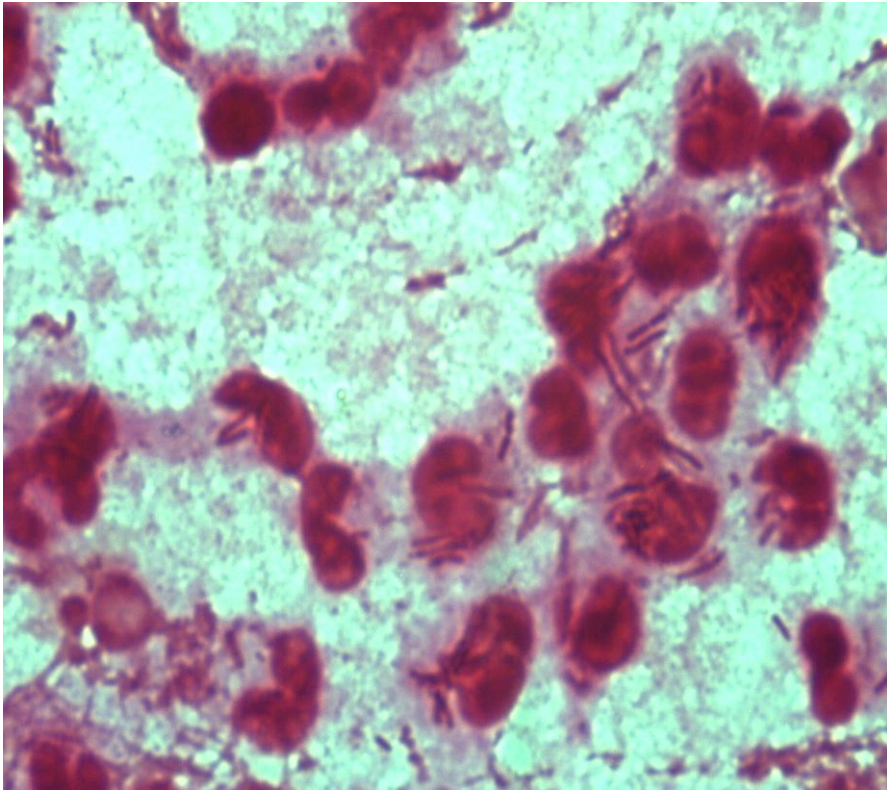
9 Přílohy



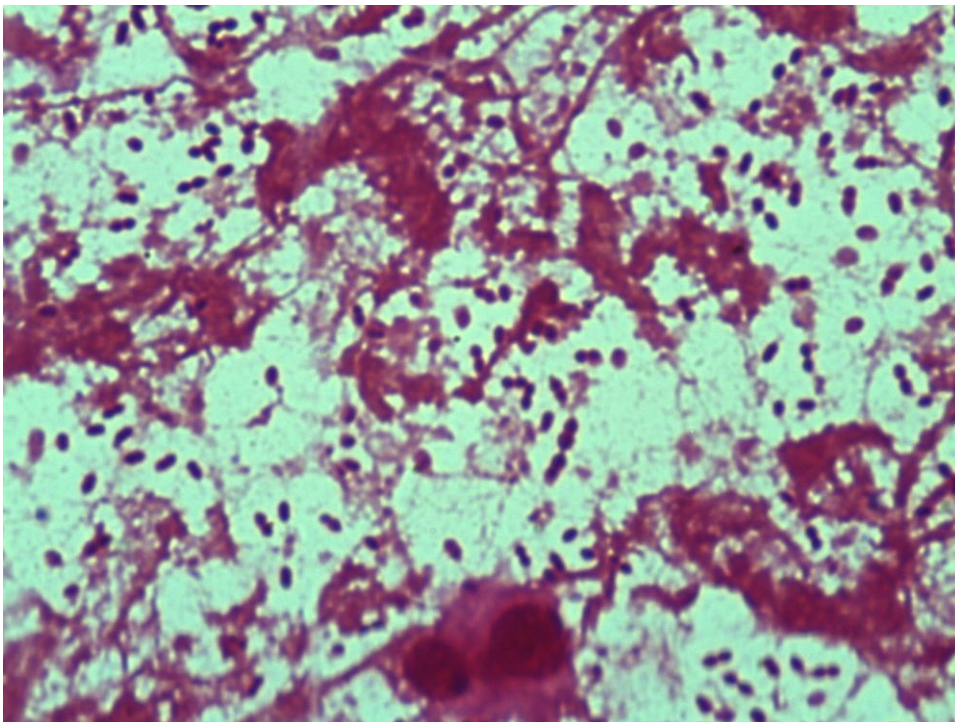
Obr. č. 2- Mikroskopický obraz vzorku sputa z HCD – zvětšení 10x10



Obr. č. 3 Mikroskopický obraz vzorku sputa z DCD s převahou jednoho morfolotypu – zvětšení 10x10



Obr. č.4 *Haemophilus influenzae* v purulentním sputu – imerzní objektiv: zvětšení 100x10



Obr. č. 5 *Streptococcus pneumoniae* v purulentním sputu – imerzní objektiv zvětšení:100x10

Výsledky klasické kultivační metody a kvantitativního zpracování sputa (vzorky od hospitalizovaných pacientů)

		Preparát			Klasická Kultivace	Kvantitativní zpracování	DG.	ODD.
	č. vzorku	LEU	EPI	závěr	(KA, CHOC, URI, CANDI)	(KA, CHOC)		
1	H0175416	(+)	(+)	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., KLSP mukosní (+)	X	J158	TRN
2	H0175489	2+	2+	X	běžná orof.fl.+kvas	SPVI, STKN,kvasinky (-3)	J158	TRN
3	H0175517	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl, HEIN, hem.ESCO	HEIN (-5), hem.ESCO(-3)	I509	INT
4	H0175581	+	+	X	běžná orof.fl.+kvas	SPVI, STKN,kvasinky (-3)	J441	TRN
5	H0175609	3+	2+	purulentní sputum	běžná orof.fl, HEIN	HEIN (-3)	R042	TRN
6	H0175610	3+	-	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas., KLPN mukosní, HEPA	KLPN mukosní (-7), HEPA (-3)	J158	TRN
7	H0175638	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl, HEPA	běžná orof.fl, HEPA (-3)	J441	TRN
8	H0175639	(+)	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl, ENCL	X	R060	INT
9	H0175667	2+	+	X	běžná orof.fl, HEIN, ENLU(+)	HEIN (-3), ENLU (-3)	I509	INT
10	H0175699	3+	2+	purulentní sputum	HEIN	HEIN (-3)	J841	TRN
11	H0175801	2+	(+)	X	STAU, HEPA, HEIN, CAAL	STAU , HEPA, HEIN, CAAL (-3)	E840, ca, po chemote r	TRN
12	H0175816	3+	-	purulentní sputum	běžná orof.fl, SPPN(++), HEPA	SPPN (-5)	J441	TRN
13	H0175828	-	2+	X	běžná orof.fl.+kvas, ENCL	ENCL (-3)	J441	TRN
14	H0175829	-	-	převažují sliny	X	X	J158	TRN
15	H0175830	-	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	R91	TRN

16	H0175907	-	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN
17	H0175908	-	+	převažují sliny	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN
18	H0175933	(+)	3+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	R509	INT
19	H0175961	+	3+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl,Enterobacter aerogenes (+)	X	J158	TRN
20	H0175979	+	+	X	SPPN mukosní, HEPA	X	J159	TRN
21	H0176000	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN
22	H0176003	2+	(+)	X	běžná orof.fl.+kvas., SPPN v S fázi	SPPN (-3)	G410	TRN
23	H0176039	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas., SPPN v S fázi	SPPN (-3)	K30	INT JIP
24	H0176174	(+)	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., ATBA (++)	X	I499	INT
25	H0176205	+	3+	X	běžná orof.fl.+kvas.	kvasinky (-3)	J441	TRN
26	H0176251	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas., HEIN	HEIN (-3)	J158	TRN
27	H0176281	+	3+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN
28	H0176312	4+	2+	purulentní sputum	STAU (+++)	STAU (-7)	J168	TRN
29	H017313	3+	2+	purulentní sputum	STAU, CATR	STAU (-5), CATR (-5)	J158, ca plic	TRN
30	H0176326	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	X	J158	TRN
31	H0176386	2+	2+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	I501	TRN
32	H0176387	-	-	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.	X	J158	TRN
33	H0176396	3+	-	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas., + plísně	kvasinky (-3), plísně (-3)	J441	TRN
34	H0176507	-	-	převažují sliny	X	X	J158	TRN
35	H0176516	-	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN

37	H0176540	-	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., ESCO, KLSP	X	J158	TRN
38	H0176592	-	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J158, ca	monie z
39	H0176618	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEIN	HEIN (-3)	J441	TRN
40	H0176693	+	+	X	běžná orof.fl., HEIN	HEIN (-3)	hronická l	TRN
41	H0176757	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas.	X	J189	TRN
42	H0176758	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	X	J158	TRN
43	H0176781	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	R060	INT
44	H0176796	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.	X	Z201	TRNAME
45	H0176804	+	2+	HCD	běžná orof.fl., PAMU	X	J209	TRN
46	H0176816	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	A160	TRN
47	H0176915	+	(+)	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN
48	H0176916	+	-	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	R074	INT
49	H0176954	-	+	X	běžná orof.fl.	SPVI, STKN,NESP	J441	TRN
50	H0177020	2+	+	X	běžná orof.fl., ENSP, HEPA	ENSP (-3), HEPA(-3)	J441	TRN
51	H0177058	+	+	X	běžná orof.fl.	běžná orof.fl.	J441	TRN
52	H0177059	+	+	X	běžná orof.fl.	X	J158	TRN
53	H0177111	+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEIN	HEIN (-3)	J441	TRN
54	H0177155	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl., ATBA, HEPA	ATBA (-3), HEPA (-3)	J158	TRN
55	H0177177	-	+	X	běžná orof.fl., MGMO	MGMO (-3)	C434	TRN
56	H0177232	4+	-	purulentní sputum	běžná orof.fl., MGMO	MGMO(-3)	C434	TRN
57	H0177300	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEIN	X	J158	TRN
58	H0177406	(+)	2+	X	běžná orof.fl.+kvas.	kvasinky (-3)	J441	TRN
59	H0177519	4+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl., HEIN	HEIN (-3)	E840	TRN
60	H0177545	2+	+	X	běžná orof.fl., HEPA	HEPA (-3)	K30	TRN

61	H0177565	(+)	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.,hem.ESCO, STAU(+)	X	J209	TRN
62	H0177566	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.,ATBA	X	J209	TRN
63	H0177607	-	+	susp.kont.orof.fl.	SPDY, PSAE, PRMI	X	I610	ODN
64	H0177611	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., ESCO-hem.	X	J158	TRN
65	H0177621	3+	-	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas.,ATBA,ABSE	ATBA (-3), ABSE (-3)	J209	TRN
66	H0177665	-	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J209	TRN
67	H0177721	-	-	převažují sliny	X	X	J158	TRN
68	H0177722	-	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.	X	J158	TRN
69	H0177723	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J441	TRN
70	H0177752	+	-	X	Streptococcus viridans	SPVI (-3)	J441	TRN
71	H0177764	+	+	X	běžná orof.fl., ATBA	ATBA (-3)	J441	TRN
72	H0177956	-	3+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	R509	INT
73	H0177973	3+	2+	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas., ENCL, HEPA, kvasinky (+++)	ENCL (-3), HEPA (-3), kvasinky (-3)	J441	TRN
74	H0177974	2+	+	X	běžná orof.fl., HEPA	HEPA (-3)	J441	TRN
75	H0178014	-	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J441	TRN
76	H0178015	-	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., PSAE (+)	X	J441	TRN
77	H0178024	2+	+	X	běžná orof.fl., STAU (+), HEPA	STAU (-3), HEPA (-3)	M455	INT
78	H0178051	2+	+	X	běžná orof.fl.	SPVI, NESP, STKN	R91	TRN
79	H0178062	-	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.	X	E118	INT
80	H0178063	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.	SPVI, NESP, STKN	J441	TRN
81	H0178064	3+	-	X	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, NESP, kvasinky	J158	TRN
82	H0178077	3+	-	purulentní sputum	SPAG, STAU (+)	SPAG (-3), STAU (-3)	J952	ARO
83	H0178081	2+	-	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J441	TRN
84	H0178180	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., HEIN	X	J158	TRN
85	H0178215	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas., HEIN (+++)	HEIN (-7)	J158	TRN

86	H0178216	2+	+	X	běžná orof.fl.	SPVI, NESP	J209	TRN
87	H0178279	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN
88	H0178376	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN
89	H0178468	(+)	+	X	běžná orof.fl.	SPVI, NESP	J441	TRN
90	H0178477	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, NESP, kvasinky(-3)	J441	TRN
91	H0178602	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.	X	J039	TRN
92	H0178603	+	+	X	běžná orof.fl.	SPVI, NESP	J441	TRN
93	H0178677	+	(+)	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	R060	TRN
94	H0178749	+	+		běžná orof.fl., ENAS	ENAS (-3)	J441	TRN
95	H0178769	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	R060	TRN
96	H0178813	2+	2+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J158	TRN
97	H0178814	(+)	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.	X	J209	TRN
98	H0178815	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN
99	H0178816	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl., ATBA (+++), ABSE	ATBA (-3), ABSE (-5)	J158	TRN
100	H0179020	-	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., ENSP, ATBA	X	J158	TRN
101	H0179063	-	2+	HCD	běžná orof.fl.+kvas.	X	J40	TRN
102	H0179110	2+	2+	X	běžná orof.fl., HEIN, CAAL	HEIN (-3), CAAL (-3)	J441	TRN
103	H0179277	2+	+		běžná orof.fl., HEIN	HEIN (-3)	J158	TRN
104	H0179283	-	-	převažují sliny	X	X	R05	TRN AME
105	H0179359	(+)	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN
106	H0179461	(+)	2+	X	běžná orof.fl.	X	J158	TRN
107	H0179524	3+	2+	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, STKN, kvasinky (-3)	J158	TRN
108	H0179533	+	-	X	běžná orof.fl., STAU (+++), ENCL	X	J952	INT JIP
109	H0179569	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.	SPVI, NESP,	J441	TRN
110	H0179682	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas., HEIN (+++)	HEIN (-7), kvasinky (-3)	J159	TRN

111	H0179683	+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEIN	HEIN (-3)	J441	TRN
112	H0179695	3+	+	X	běžná orof.fl., HEPA, CAAL	HEPA (-3), CAAL (-3)	C341, ca plic	TRN
113	H0179749	(+)	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., SEMA	X	R509	INT
114	H0179985	-	2+	X	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, NESP, kvasinky (-3)	J441	TRN
115	H0180047	-	+	převažují sliny	X	X	K580	INT
116	H0180160	(+)	2+	X	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, NESP, kvasinky (-3)	J441	TRN
117	H0180198	(+)	-	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J418	TRN
118	H0180499	+	+	X	běžná orof.fl., SEMA, KLOX	SEMA (-5), KLPN (-3)	J441	TRN
119	H0180500	-	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN
120	H0180547	-	(+)	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas. , HEPA	X	J158	TRN
121	H0180574	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., ESCO hem. (+)	X	I259	INT
122	H0180622	+	+	HCD	běžná orof.fl.+kvas., ESCO (+), HEIN	ESCO (-3), HEIN (-5)	J441	TRN
123	H0180656	-	2+	HCD	běžná orof.fl.+kvas., ENSP, KLSP	X	R042	TRN
124	H0180657	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., ENAS	ENAS (-3)	J441	TRN
125	H0180685	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl., ESCO	ESCO (-3)	I460	INTJIP
126	H0180754	-	+	X	Candida albicans (+++)	X	J960	ARO
127	H0180797	-	-	převažují sliny	X	X	J441	TRN
128	H0180836	2+	+	X	běžná orof.fl., HEIN	HEIN (-3)	J069	LPPS
129	H0180837	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J441	TRN
130	H0180848	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	R91	TRN
131	H0180867	-	-	převažují sliny	X	X	J209	TRN
132	H0180879	-	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas. , HEIN	X	R091	TRN
133	H0180891	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas. , HEIN	HEIN (-3)	J158	TRN
134	H0180969	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl., BRCA (+++), ENSP, ATBA	BRCA (-7), ENSP (-3), ATBA (-3)	J180	TRN
135	H0181015	-	3+	X	běžná orof.fl.+kvas. , KLSP (+++)	X	J158	TRN

136	H0181070	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.	X	J158	TRN
137	H0181102	-	-	převažují sliny	X	X	C900	
138	H0181120	3+	+	Purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas., HEIN	HEIN (-7)	J441	TRN
139	H0181137	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J441	TRN
140	H0181159	+	+	X	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, STKN, kvasinky (-3)	J441	TRN
141	H0181388	+	(+)	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., ENCL, KLPN, ESCO	X	A46	DZNI AV
142	H0181409	(+)	+	X	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, STKN, kvasinky (-3)	J441	TRN
143	H0181574	-	2+	X	běžná orof.fl.+kvas., ESCO hem.kmen, HEPA	X	far. Flóra	TRN
144	H0181721	3+		X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3), kvasinky (-3)	J209	HIRAME
145	H0181740	2+	2+	X	běžná orof.fl.+kvas, ATBA, HEPA	ATBA (-3), HEPA (-3)	J158	HIRAME
146	H0181835	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., PASE (+), HEPA	X	J180	TRN
147	H0181869	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas, ENSP, HEPA	X	J189	TRN
148	H0181891	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., ENSP	X	J158	TRN
149	H0181902	2+	-	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas, ENCL(++)	ENCL (-5)	I500	INTJIP
150	H0181956	-	-	převažují sliny	X	X	J448	TRN
151	H0182070	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	X	R042	TRN
152	H0182235	3+	-	X	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, STKN, kvasinky (-3)	J441	TRN
153	H0182295	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA	X	D682	TRN
154	H0182402	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., KLPN (+), HEPA	X	J158	TRN
155	H0182454	4+	-	purulentní sputum	běžná orof.fl., BRCA (+++), HEIN (+++)	BRCA (-7), HEIN (-7)	I48	INT
156	H0182577	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEIN (++)	HEIN (-5)	J209	TRN
157	H0182668	(+)	(+)	X	běžná orof.fl.	SPVI, STKN	J441	TRN
158	H0182763	2+	2+	X	běžná orof.fl., STHA (++), CAAL	STHA (-5), CAAL (-5)	I48	INT
159	H0182781	3+	2+	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas., SPPN v S fázi , HEPA	SPPN v S fázi (-5), HEPA (-3)	J441	TRN
160	H0182809	3+	2+	purulentní sputum	běžná orof.fl., STHA (++), CAAL	STHA (-5), CAAL (-5)	J441	TRN

161	H0182810	2+	3+	X	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, STKN, kvasinky (-3)	J158	TRN
162	H0182875	3+	2+	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas., KLPN (+), CAAL	KLPN (-5), CAAL (-3)	J158	TRN
163	H0182917	3+	-	purulentní sputum	běžná orof.fl., ATBA, STMA (+)	ATBA (-3), STMA (-3)	J158	TRN
164	H0182918	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl., COSP	COSP (-3)	J209	TRN
165	H0182919	+	2+	C	běžná orof.fl., hem.ESCO, KLSP	X	J209	TRN
166	H0182945	3+	2+	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas.,SPDY (G),HEPA	SPDY (G) (-3)	J312	TRN
167	H0183008	(+)	(+)	X	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, STKN, kvasinky (-3)	J441	CHIR
168	H0183039	+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	X	J158	TRN
169	H0183076	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J209	TRN
170	H0183077	-	2+	X	běžná orof.fl.+kvas., ATBA (+)	SPVI, STKN, ATBA (-3),kvasinky (-3)	J441	TRN
171	H0183085	(+)	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., ATBA (+)	X	J209	TRN
172	H0183086	2+	+	X	běžná orof.fl., HEPA	HEPA (-3)	R042	TRN
173	H0183106	3+	(+)	purulentní sputum	běžná orof.fl., HEPA	HEPA (-5)	J158	TRN
174	H0183134	(+)	(+)	susp.kont.orof.fl.	Norm. orofar. Flóra	X	J158	TRN
175	H0183135	(+)	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J441	TRN
176	H0183136	-	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., ENSP, ATBA	X	R91	TRN
177	H0183153	+	+	X	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, STKN, kvasinky (-3)	J441	TRN
178	H0183192	2+	+	X	běžná orof.fl.	X	J209	TRN
179	H0183193	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., ESCO	X	K30	INT
180	H0183242	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN
181	H0183253	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., ENSP	ENSP (-3)	J418	TRN
182	H0183319	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., ATBA	X	J158	TRN
183	H0183364	(+)	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., ENSP (+)	X	J418	TRN
184	H0183527	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA	X	J180	TRN
185	H0183542	2+	+	X	běžná orof.fl., HEPA, HEIN	HEIN (-3), HEPA (-3)	K30	INT

186	H0183577	+	2+	X	běžná orof.fl., HEPA	SPVI, STKN, HEPA (-3)	J441	TRN
187	H0183638	2+	+	X	běžná orof.fl., BRCA, HEPA	BRCA (-5), HEPA (-3)	J441	TRN
188	H0183657	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., RAOR	X	J158	TRN
189	H0183708	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., ATBA	X	J209	TRN
190	H0183709	(+)	2+	X	běžná orof.fl.+kvas.	kvasinky (-3)	J441	TRN
191	H0183710	-	3+	X	běžná orof.fl.+kvas.	kvasinky (-3)	J441	TRN
192	H0183755	2+	2+	X	běžná orof.fl.+kvas.	kvasinky (-3)	J209	TRN
193	H0183772	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl., HEPA	SPVI, STKN, NESP, HEPA (-3)	J158	INT
194	H0183800	2+	+	X	běžná orof.fl.	SPVI (-3)	J158	TRN
195	H0183835	-	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J158	TRN
196	H0183874	3+	-	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, STKN, kvasinky (-3)	J158	TRN
197	H0183903	2+	+	X	běžná orof.fl., HEPI	HEPI (-3)	J209	TRN
198	H0183904	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J189	TRN
199	H0183970	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., SPPN v S fázi (+++), HEPA	SPPN v S fázi (-3), HEPA (-3)	I214	INT
200	H0184003	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl., KLPN (++), HEPA	KLPN (-5), HEPA (-3)	J158	TRN
201	H0184013	-	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA	X	R05	TRNAME
202	H0184014	-	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEIN	X	R074	TRN
203	H0184045	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas.	SPVI, STKN, kvasinky (-3)	far. Flóra + kvasin	
204	H0184052	-	+	X	běžná orof.fl.+kvas., KLSP (+), HEPA	kvas.(-3), KLSP (-3), HEPA (-3)	J441	TRN
205	H0184084	-	-	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., KLOX (++)	X	J158	TRN
206	H0184126	+	2+	X	běžná orof.fl.+kvas., PSAE, STAU MRSA	STAU-MRSA (-3), PSAE (-3)	J441	TRN

207	H0184175	+	+	X	běžná orof.fl., ENSP (++) . ATBA	ENSP (-5), ATBA (-3)	J441	TRN
208	H0184176	+	+	X	běžná orof.fl.+kvas.	kvasinky (-3)	J441	TRN
209	H0184208	+	+	X	běžná orof.fl., HEPA	X	J189	TRN
210	H0184235	2+	+	X	běžná orof.fl.+ kvas.,, STHA (++)	STHA (-5), CAAL (-5)	J441	TRN
211	H0184236	+	+	X	běžná orof.fl.+kvas.	kvasinky (-3)	J441	TRN
212	H0184300	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., ATBA (+++)	ATBA (-5)	J189	TRN
213	H0184324	2+	+	X	běžná orof.fl.	SPVI, STKN, NESP	J158	TRN
214	H0184337	2+	2+	X	běžná orof.fl., HEPA	HEPA (-3)	J209	TRN
215	H0184338	(+)	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., STKN, CASP	X	J189	TRN
216	H0184339	(+)	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., HESP	X	J441	TRN
217	H0184381	-	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA	X	R060	TRN
218	H0184393	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas.	kvasinky (-3)	J189	TRN
219	H0184453	-	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas.	X	J189	TRN
220	H0184498	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., STHO	STHO (-3), kvasinky (-3)	I501	INTJIP
221	H0184556	-	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA	X	R042	TRN
222	H0184557	+	2+	X	běžná orof.fl.+kvas., KLSP (+), HEPA	KLSP (-3), HEPA (-3)	J441	TRN
223	H0184558	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl.+kvas.	kvasinky (-5)	J209	TRN
224	H0184594	2+	+	X	běžná orof.fl.	SPVI, STKN, NESP	J159	TRN
225	H0184607	(+)	+	susp.kont.orof.fl.	STHA, CASP	X	J158	TRN
226	H0184689	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., ATBA	X	J209	TRN
227	H0184732	2+	2+	X	běžná orof.fl., HEPA	HEPA (-3)	J441	TRN
228	H0184733	+	+	X	běžná orof.fl., HEPA, hem. ESCO, PASP	hem. ESCO, HEPA, PASP	J441	TRN
229	H0184840	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., KLSP	X	J189	TRN
230	H0184942	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., ATBA(+++)	X	J158	TRN

Výsledky klasické kultivační metody a kvantitativního zpracování sputa (vzorky od pacientů z primární a komunitní péče)

	č. vzorku	Preparát			Klasická Kultivace	Kvantitativní zpracování	DG.
		LEU	EPI	závěr	(KA, CHOC, URI)	(KA, CHOC)	
1	T020972	-	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., HESP	X	J398
2	T0209287	2+	-	X	běžná orof.fl., KLPN (+)	KLPN (-3)	J40
3	T0209296	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA	X	J189
4	T0209513	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA	X	J459
5	T0209736	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA	X	J209
6	T0209847	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	X	J029
7	T0210338	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEIN	HEIN (-3)	J042
8	T0210670	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA	X	J029
9	T0210807	+	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	X	J189
10	T0210913	-	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.	X	J042
11	T0211046	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA	X	J039
12	T0211414	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J189
13	T0211430	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J209
14	T0211783	3+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J042
15	T0212103	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA (+)	Nezpracováno	J189
16	T0212558	+	+	X	běžná orof.fl.	SPVI, STKN, NESP	J441
17	T0212575	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEIN	X	J189
18	T0212769	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl., HEPA	HEPA (-3)	J039
19	T0213463	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	X	J012

20	T0213660	+	+	X	běžná orof.fl.+kvas.	X	J441
21	T0214166	3+	+	purulentní sputum	běžná orof.fl., HEPA, ABSE (++)	ABSE (-5), HEPA (-3)	J189
22	T0214875	2+	+	X	běžná orof.fl., HEPA	Haemophilus parainfluenzae	Z008
23	T0215344	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEIN	X	J029
24	T0215452	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA (+)	X	J209
25	T0216023	(+)	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA, KLOX (+)	X	J189
26	T0216594	(+)	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEIN	X	J189
27	T0216632	(+)	2+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	X	J209
28	T0216964	+	+	X	běžná orof.fl.	X	C61
29	T0217147	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA	X	J209
30	T0217234	+	+	X	běžná orof.fl., HEPA, CAAL (+)	CAAL (-3), HEPA (-3)	E840
31	T0217391	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., HEIN (+)	X	J209
32	T0217492	(+)	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	X	J209
33	T0217493	+	+	X	běžná orof.fl., CAAL (+)	CAAL (-3)	E840
34	T0217691	+	+	susp.kont.orof.fl.	běžná orof.fl., HEPA	X	J040
35	T0218101	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J189
36	T0218793	2+	+	X	běžná orof.fl.+kvas., HEPA	HEPA (-3)	J042